



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Centro de Investigación Príncipe Felipe

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS

**Efectos de la hiperamonemia y la encefalopatía  
hepática sobre la conectividad neuronal en cerebro  
de pacientes cirróticos y modelos animales.  
Implicaciones terapéuticas**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

**Raquel García García**

Dirigida por:

**Carmina Montoliu**

**Vicente Felipo**

**Cristina Forn**

**Valencia, julio 2018**



PRINCIPE FELIPE  
CENTRO DE INVESTIGACION

VICENTE FELIPO ORTS, Doctor en Ciencias Químicas (Bioquímica), Investigador Jefe del Laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigación Príncipe Felipe,

CARMINA MONTOLIU FELIX, Doctora en Ciencias Biológicas, Investigadora Jefa del Laboratorio de Deterioro Neurológico del Instituto de Investigación Sanitaria de Valencia (INCLIVA) y Profesora del departamento de Histología de la Universidad de Valencia,

CRISTINA FORN FRIAS, Doctora en Psicología, Investigadora del Laboratorio de Neuropsicología y Neuroimagen Funcional de la Universidad de Jaume I,

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por D<sup>a</sup> Raquel García García, titulada “Efectos de la hiperamonemia y la encefalopatía hepática sobre la conectividad neuronal en cerebro de pacientes cirróticos y modelos animales. Implicaciones terapéuticas”, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

En Valencia, julio de 2018.

Dr. Vicente Felipo

Dra. Carmina Montoliu

Dra. Cristina Forn



## *A mis padres*

"Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano" Isaac Newton

"Tienes un corazón valiente, ten el valor de hacerle caso" Breveheart

# AGRADECIMIENTOS

Era cuestión de tiempo que todo encajara para poderse entender. Nada de lo que había pasado, en un principio inconexo y carente de sentido, se podía entender si no era en su conjunto, sin la existencia de una conectividad esencial entre todas y cada una de las personas que habían formado parte de una red sin cuya actividad esta tesis no habría sido posible. Todos habéis promovido una diferenciación y una especialización, induciendo transformaciones continuas que han permitido el reajuste del sistema y con ello el de mi propio pensamiento y forma de ser, haciendo que hoy sea quien soy. Gracias a todos por ello.

**Vicente.** Gracias por permitir que pudiera hacer esta tesis en tu laboratorio y que haya podido aprender tanto.

**Cristina.** He aprendido mucho de ti. Gracias por tu espíritu crítico y profesional. Siempre haciéndome ver que las cosas pueden estar bien hechas y a la vez ser claras y que deben ser justas.

**Carmina.** A ti te tengo que agradecer que hayas sido no sólo mi directora de tesis, si no mi amiga. Quien tenga la fortuna de serlo, sabe que tú eres de las que luchan y escuchan, defienden con todos los recursos que tienen y sobre todo de las que comprenden. Gracias por tus consejos, por animarme y alabarme en tantísimas ocasiones, y valorarme tanto.

**Amparo.** No sólo te debo la portada de mi tesis, te debo tantísimas horas estudiando a mi lado de tantas cosas de las que no teníamos ni idea... pero al final ¡Qué bonitos nos quedan los artículos Amparo!

**Alba.** Tú que me has acompañado a hacer negocios fraudulentos desde la inocencia más ignorante. Que has vestido de uniforme a mi lado, que me enseñaste a pedir *gin tonics* a las cuatro de la tarde con la elegancia necesaria para que no se notase lo mucho que lo necesitábamos. Mi compañera y amiga, la persona con más LTP que conozco, siempre serás ejemplo de todas las modalidades cognitivas y sobre todo de mi atención selectiva-sostenida (¡¡¡¡ROJO, AZUL, AZUL, AMARILLO, VERDE, VERDE!!!!)

**Azahara.** No importa el estado en el que se encuentren nuestras vidas, que tus pensamientos y los míos siempre estarán sincronizados en todas las bandas de frecuencia. Contigo tuve una conexión directa, serás siempre mi neurona espejo y mi flor entre neuronas para toda la vida.

**Javier.** Nunca antes se había descrito una respuesta *mismatch negativity* tan amplia como la que tú produjiste en todas las células de mi cuerpo el primer momento en que te vi. Ninguna de mis predicciones encajaba con tu ser, despertando en mí una atención como nunca antes nadie lo había hecho. Te convertiste en mi compañero de vida, la persona que me arropa desde lejos, la que me recoge y la que me eleva y la que me mira con más admiración. Encaja todo tanto, que si fueras un experimento te repetiría, porque no es posible obtener resultados tan perfectos.

**Carmen.** Mi compañera y hermana de viaje desde siempre. Tú que me has visto caerme tantas veces y me has levantado tantas miles más, lo has hecho siempre desde el principio y sé que lo harás hasta el final. Eres por excelencia mi red de saliencia, destacando siempre que es lo realmente importante. Sabes poner orden cuando reina la entropía, eres raciocinio cuando nada tiene sentido. Porque si algo no es justo no es justo y si te roban el coche, cogemos a los malos. Pero cuando nada se puede entender, cuando todo el mundo está loco y no hay lógica ninguna que se pueda aplicar, siempre somos tú una tirita y yo una gasa para curarnos las heridas y activar la máquina del tiempo que nos permite alejarnos de la gente normal.

**Mar.** El agua saladita que cura mis heriditas. Hermana, de ti aprendí lo que es ser libre y lo importante que es serlo para que los demás lo sean. Eres mi *Default Mode Network*, permitiendo que mi cerebro vuele alto y libre, que no se pregunte si hay fronteras, que tenga el valor para ver lo bonita que es la vida, que sueñe sin restricciones ni posesiones y sobre todo que se permita ser feliz. Me brindaste a tu familia que se convirtió en la mía, tu madre **M<sup>a</sup> José** me cuidó como una hija y nunca antes había querido tanto a dos niños como quiero a **Lucas y Nara**.

**Paco y Clara.** Mis personas preferidas en este mundo. A vosotros os debo todo, porque sois vosotros los responsables del potencial de acción que ha permitido la transmisión del conocimiento y me ha convertido, con el mejor ejemplo, en la persona en la que soy. He tenido la inmensa fortuna de tener como padres a las personas con el mayor valor humano que he conocido y siento que nunca nadie me podrá querer tanto como vosotros los hacéis. Y el resto de mi familia, que rompe todo mi escepticismo y es que ellos sin usar ningún medicamento, curan: **Mari, Paco, Julio, Jose, Rosa y Carmen**, juntos formamos el más perfecto enlace, irrompible y por siempre.

**Lucas.** La Paz que siempre calma mis delirios. Sé que estás en contra, que compartes más el "cui cui natural y lo entenderás" pero tus consejos causan en mí siempre, el efecto benzodiazepínico que espero. Eres el cerebro que elegiría si se pudiera, de las personas más nobles y más inteligentes que conozco. Gracias por ser el *freaky* científico que ha caminado a siempre a mi lado y ha escondido mi fuego Valirio. Si alguna vez tengo dragones, uno será para ti seguro.

**Belén.** Beleniwi, tú sabes lo que es aprovechar 5 minutos de *timer* para echar un siesta, la búsqueda desesperada de una rata perdida, estar al borde del abismo y sentir que solo abandonar sería un buen final. Pero con lo que me quedo amiga, es que eso lo aprendiste conmigo y que al final lo mejor de todo aquello fue haberte conocido.

**Marta.** Mi cuidadora por excelencia, siempre mimando mis resultados y aconsejándome, y no sólo de estadística, si no de cosas de la vida. Cómo me encanta hablar contigo del mundo para reventarlo. Siempre serás una mujer y una científica para mí de referencia. Si alguna vez tengo amnesia y decido volver a hacer una tesis, quiero que sea contigo.

**Vicent Teruel.** Mi causalidad bidireccional preferida. Gracias por enseñarme tanto y gracias por hacer siempre que nuestras conversaciones tuvieran un *feedback* infinito. De verdad que es así como siempre me había imaginado la ciencia y me encanta. Llegamos a profundizar

tanto en nuestras conversaciones que si Platón pasara por nuestro lado se sentaría a tomar un café con nosotros. Siempre tendrás el título de *cum laude* como profesor y como persona.

Gracias a todos aquellos compañeros de trabajo que se han convertido en amigos y a los que admiro: **Paqui**, la primera en introducirme en este mundo y la que lo ha hecho con más cariño. **Vite**, luchador e inteligente, siempre transmitiendo alegría y amistad. **Ana**, mi anastomosa bonita que desvía lo tóxico para otro lado y es ejemplo de mujer en todos los sentidos, eres tú mi artista preferida. **Domingo**, siempre trayéndome los mejores dulces en los momentos de bajón y las las historias con la más rica ponzoña. **Sherry**, el bombón más dulce del I06, eres tan bonita por dentro como por fuera amiga. Al resto de compañeros **Andrea**, **Tiziano**, **Michele** y los muchos que han pasado por aquí, siempre dispuestos a ayudarme y escucharme. A **mis chicas de la limpieza** que siempre me alagan con piropos bonitos, me han mimado y me han escuchado. Vosotras más que nadie me habéis visto marchita allí abajo y sólo vosotras sois capaces de hacer que en un sótano también puedan crecer flores.

A TODOS VOSOTROS, GRACIAS.



|  |           |
|--|-----------|
| <b>1.INTRODUCCIÓN</b>  | <b>13</b> |
| <b>1.1 CIRROSIS HEPÁTICA</b>   | <b>14</b> |
| <b>1.1.1 Epidemiología</b>   | <b>15</b> |
| <b>1.1.2 Estadios de la cirrosis</b>   | <b>15</b> |
| <b>1.1.3 Alteraciones asociadas a la cirrosis</b>                              | <b>16</b> |
| 1.1.3.1 Hiperamonemia y cirrosis   | 17        |
| 1.1.3.2 Inflamación y cirrosis   | 18        |
| <b>1.2 ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA</b>  | <b>20</b> |
| <b>1.2.1 Encefalopatía hepática mínima</b>                                     | <b>21</b> |
| <b>1.2.2 Alteraciones neurológicas</b>   | <b>21</b> |
| 1.2.2.1 Alteraciones neuropsiquiátricas  | 21        |
| 1.2.2.2 Alteraciones cognitivas  | 23        |
| 1.2.2.3 Alteraciones motoras   | 24        |
| <b>1.2.3 Factores que contribuyen a la aparición de Encefalopatía Hepática</b> | <b>26</b> |
| 1.2.3.1 Hiperamonemia  | 26        |
| 1.2.3.2 Inflamación  | 27        |
| ■ Sinergia entre hiperamonemia e inflamación                                   | 27        |
| ■ Neuroinflamación   | 29        |
| 1.2.3.3 Alteraciones en la neurotransmisión                                    | 30        |
| <b>1.3 NEUROFISIOLOGÍA EN LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA</b>                        | <b>32</b> |
| <b>1.3.1 El electroencefalograma</b>   | <b>33</b> |
| 1.3.1.1 Alteraciones en el EEG en la Encefalopatía Hepática                    | 35        |
| 1.3.1.2 Cambios menores en el EEG: implicaciones patológicas                   | 36        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1.3.2 Potenciales evocados</b>   | <b>37</b> |
| 1.3.2.1 Potenciales evocados auditivos  | 39        |
| 1.3.2.2 Mismatch negativity   | 48        |
| ■ Mecanismo de la generación de MMN   | 49        |
| ■ Áreas implicadas en la generación de MMN  | 52        |
| ■ Receptores implicados en la generación de MMN   | 53        |
| ■ MMN y encefalopatía hepática  | 54        |
| <b>1.4 RESONANCIA MAGNÉTICA EN ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA</b>                                     | <b>55</b> |
| 1.4.1 Introducción general de las técnicas de neuroimagen                                     | 55        |
| ■ Resonancia magnética estructural  | 55        |
| ■ Resonancia magnética funcional  | 59        |
| 1.4.2 Antecedentes previos de neuroimagen en encefalopatía hepática                           | 62        |
| <b>2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>  | <b>75</b> |
| <b>3.MATERIAL Y MÉTODOS</b>   | <b>79</b> |
| <b>3.1 MODELO ANIMAL DE HIPERAMONEMIA SIN FALLO HEPÁTICO</b>                                  | <b>80</b> |
| <b>3.1.1. Modelo de hiperamonemia crónica en ratas</b>  | <b>80</b> |
| <b>3.1.2. Obtención de potenciales evocados y registros electroencefalográficos</b>           | <b>80</b> |
| 3.1.2.1 Cirugía estereotáxica para la inserción de electrodos en ratas                        | 80        |
| 3.1.2.2 Sistema de estimulación y adquisición   | 81        |
| 3.1.2.3 Análisis de los datos   | 85        |
| ■ Medidas MMN   | 85        |
| ■ Análisis espectral del potencial de campo local (LFP)                                       | 86        |
| ■ Medidas de sincronización   | 87        |
| ■ Tratamiento estadístico   | 88        |
| <b>3.1.3 Expresión en membrana de receptores NMDA y GABA</b>                                  | <b>89</b> |
| <b>3.1.4 Análisis de glutamato y GABA extracelular en hipocampo por microdiálisis in vivo</b> | <b>89</b> |
| <b>3.2 PACIENTES CON ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA</b>  | <b>92</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>3.2.1 Extracción de la sangre</b>  | <b>93</b>  |
| 3.2.1.1 Determinación de GMPc   | 93         |
| 3.2.1.2 Determinación de citocinas pro-inflamatorias                                  | 94         |
| ■ Determinación de interleucina 18 en suero   | 94         |
| ■ Determinación de interleucina 6 en suero  | 94         |
| 3.2.1.3 Determinación de amonio en sangre   | 95         |
| <b>3.2.2 Valoración de la función cognitiva en los participantes</b>                  | <b>95</b>  |
| ■ Batería PHES  | 96         |
| ■ Test Stroop de colores y palabras   | 98         |
| ■ Test d2   | 99         |
| ■ Symbol Digit Modalities Test (SDMT)   | 101        |
| ■ Subtest de dígitos directos e inversos  | 102        |
| ■ Subtest de letras y números   | 103        |
| ■ Test de aprendizaje verbal España Complutense (TAVEC)                               | 104        |
| <b>3.2.3 Valoración de las funciones motoras</b>                                      | <b>105</b> |
| ■ Tests de coordinación bimanual  | 106        |
| ■ Tests de coordinación visuo-motora  | 106        |
| <b>3.2.4 Adquisición de las imágenes de Resonancia Magnética</b>                      | <b>106</b> |
| 3.2.4.1 Análisis del volumen de sustancia gris y conectividad funcional en redes ICA  | 107        |
| ■ Morfometría basada en voxel   | 107        |
| ■ Conectividad funcional basada en análisis de componentes independientes             | 107        |
| ■ Análisis estadístico  | 108        |
| 3.2.4.2 Análisis del volumen de sustancia gris y conectividad funcional del hipocampo | 109        |
| ■ Análisis de imágenes morfométricas del hipocampo                                    | 109        |
| ■ Conectividad funcional basada en voxel-semilla                                      | 110        |
| ■ Análisis estadístico  | 110        |

## **4.RESULTADOS** **113**

### ALTERACIONES EN LA CONECTIVIDAD FUNCIONAL EN MODELOS ANIMALES.....114

#### **4.1 El potencial MMN en ratas hiperamonémicas** **114**

|   |            |
|---|------------|
| 4.1.1 Amplitud del pico máximo del potencial MMN  | 114        |
| 4.1.2 Área bajo la curva del potencial MMN  | 115        |
| 4.1.3 Frecuencia dominante  | 115        |
| 4.1.4 Media de las desviaciones estándar (mstd)   | 116        |
| 4.1.5 Entropía  | 116        |
| <b>4.2 Análisis de los potenciales locales de campo durante la estimulación auditiva en ratas hiperamonémicas</b> | <b>117</b> |
| 4.2.1 Media de la energía espectral normalizada en la banda de interés  | 117        |
| 4.2.2 Coherencia  | 118        |
| ■ Frecuencia dominante en la coherencia   | 118        |
| ■ Coherencia en la banda de frecuencia dominante  | 119        |
| 4.2.3 Causalidad funcional de Wiener-Granger  | 120        |
| ■ Frecuencia dominante de la relación de causalidad entre las áreas   | 120        |
| ■ Causalidad directa e inversa. ¿Qué sentido predomina durante la generación de la respuesta MMN?                 | 121        |
| ■ Ratio de causalidad neta durante la respuesta MMN   | 124        |
| <b>4.3 Análisis de los potenciales locales de campo en condiciones basales en ratas hiperamonémicas</b>           | <b>127</b> |
| 4.3.1 Media de la energía espectral normalizada en la banda de interés  | 127        |
| 4.3.2 Coherencia en condiciones basales   | 128        |
| ■ Frecuencia dominante en la coherencia   | 128        |
| ■ Coherencia en la banda de frecuencia dominante  | 129        |
| 4.3.3 Causalidad funcional de Wiener-Granger en condiciones basales   | 130        |
| ■ Frecuencia dominante de la relación de causalidad entre las áreas   | 130        |
| ■ Causalidad directa e inversa. ¿Qué sentido predomina en condiciones basales?                                    | 131        |
| ■ Ratio de causalidad neta en condiciones basales   | 134        |
| <b>4.4 El potencial MMN en ratas hiperamonémicas tratadas con Ibuprofeno</b>                                      | <b>136</b> |
| 4.4.1 Amplitud del pico máximo del potencial MMN  | 136        |
| 4.4.2 Área bajo la curva del potencial MMN  | 137        |
| 4.4.3 Frecuencia dominante  | 137        |
| 4.4.4 Media de las desviaciones estándar (mstd)   | 139        |
| 4.4.5 Entropía  | 140        |



|   |            |
|---|------------|
| <b>4.5 Análisis de los potenciales locales de campo durante la estimulación auditiva en ratas hiperamonémicas tratadas con Ibuprofeno</b> | <b>141</b> |
| 4.5.1 Media de la energía espectral normalizada en la banda de interés  | 141        |
| 4.5.2 Coherencia  | 143        |
| ■ Frecuencia dominante en la coherencia   | 143        |
| ■ Coherencia en la banda de frecuencia dominante  | 144        |
| 4.5.3 Causalidad funcional de Wiener-Granger  | 145        |
| ■ Frecuencia dominante de la relación de causalidad entre las áreas   | 145        |
| ■ Causalidad directa e inversa. ¿Se restaura la comunicación durante la respuesta MMN con el Ibuprofeno?                                  | 146        |
| ■ Ratio de causalidad neta en ratas tratadas con Ibuprofeno   | 148        |
| <b>4.6 Análisis de los potenciales locales de campo en ratas hiperamonémicas tratadas con Ibuprofeno en condiciones basales</b>           | <b>151</b> |
| 4.6.1 Media de la energía espectral normalizada en la banda de interés  | 151        |
| 4.6.2 Coherencia en condiciones basales   | 152        |
| ■ Frecuencia dominante en la coherencia   | 153        |
| ■ Coherencia en la banda de frecuencia dominante  | 154        |
| 4.6.3 Causalidad funcional de Wiener-Granger  | 155        |
| ■ Frecuencia dominante de la relación de causalidad entre las áreas   | 155        |
| ■ Causalidad directa e inversa. ¿Se restaura la comunicación basal con el Ibuprofeno?   | 156        |
| ■ Ratio de causalidad neta en ratas tratadas con Ibuprofeno en condiciones basales  | 159        |
| <b>ALTERACIÓN EN LA NEUROTRANSMISIÓN EN MODELOS ANIMALES</b>  | <b>161</b> |
| <b>4.7 Expresión en membrana de receptores de glutamato y GABA</b>  | <b>161</b> |
| <b>4.8 Análisis de glutamato y GABA extracelular en hipocampo por microdiálisis in vivo</b>   | <b>162</b> |
| <b>RESUMEN DE LOS RESULTADOS EN MODELOS ANIMALES</b>  | <b>165</b> |
| ■ Respuesta MMN y conectividad funcional durante la estimulación auditiva en rata anestesiada. Efecto del Ibuprofeno                      | 165        |
| ■ Conectividad funcional en rata despierta en condiciones basales. Efecto del Ibuprofeno  | 166        |
| ■ Alteración en la neurotransmisión en la hiperamonemia crónica. Efecto del Ibuprofeno  | 167        |
| <b>PACIENTES CON ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA</b>  | <b>169</b> |
| <b>4.9 Etiología y datos demográficos</b>   | <b>169</b> |
| <b>4.10 Parámetros bioquímicos</b>  | <b>169</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>4.11 ESTUDIO 1:</b>   | <b>170</b> |
| ANÁLISIS DEL VOLUMEN DE SUSTANCIA GRIS Y CONECTIVIDAD FUNCIONAL EN REDES ICA Y SU RELACIÓN CON LAS ALTERACIONES COGNITIVAS EN LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA .....                        | 170        |
| 4.11.1 Evaluación de la capacidad cognitiva y coordinación motora  | 170        |
| ■ Alteraciones cognitivas  | 170        |
| ■ Atención selectiva   | 171        |
| ■ Atención selectiva-sostenida y concentración mental  | 171        |
| ■ Memoria de trabajo   | 171        |
| ■ Coordinación motora  | 171        |
| <b>4.11.2 Análisis de las alteraciones cerebrales por Resonancia Magnética</b>   | <b>173</b> |
| ■ Disminución del volumen de sustancia gris en la encefalopatía hepática mínima  | 173        |
| ■ Relación entre la atrofia de sustancia gris y la cognición   | 175        |
| ■ Correlación de la reducción de sustancia gris con parámetros bioquímicos alterados en la encefalopatía hepática mínima   | 176        |
| ■ Los pacientes con encefalopatía hepática mínima muestran una disminución de la conectividad funcional en estado de reposo  | 177        |
| ■ Correlaciones entre la conectividad funcional y los parámetros bioquímicos y cognitivos  | 179        |
| ■ Precisión diagnóstica de las alteraciones en el volumen de sustancia gris y en la conectividad funcional para la detección de la encefalopatía hepática mínima                     | 180        |
| <b>4.12 ESTUDIO 2:</b>   | <b>182</b> |
| ANÁLISIS DEL VOLUMEN DE SUSTANCIA GRIS Y CONECTIVIDAD FUNCIONAL DEL HIPOCAMPO Y SU RELACIÓN CON LAS ALTERACIONES EN EL APRENDIZAJE Y MEMORIA CON ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA ..... | 182        |
| ■ Aprendizaje, memoria y reconocimiento verbal a largo plazo   | 182        |
| ■ Análisis de correlación entre el rendimiento en la memoria, el deterioro cognitivo y los parámetros bioquímicos  | 183        |
| ■ Volumen de las subregiones del hipocampo   | 184        |
| ■ Análisis de correlación entre el volumen de las regiones del hipocampo, la memoria y los parámetros bioquímicos  | 185        |
| ■ Análisis de conectividad funcional en las subregiones del hipocampo  | 187        |
| ■ Análisis de correlación de la conectividad funcional con la memoria, el deterioro cognitivo y los parámetros bioquímicos   | 190        |

## **5. DISCUSIÓN** **193**

## **5.1 MMN EN HIPERAMONEMIA CRÓNICA. EFECTO TERAPÉUTICO DEL IBUPROFENO 194**

- Alteración de la respuesta MMN en ratas con hiperamonemia crónica. Aumento jerárquico del procesamiento auditivo y papel del hipocampo 196
- Disminución de la respuesta en CA1 del hipocampo en hiperamonemia. Implicaciones de la neurotransmisión GABAérgica 197
- Implicaciones de la alteración de la neurotransmisión glutamatérgica en la disminución de la respuesta MMN en el hipocampo en hiperamonemia 200
- Implicación de la actividad cerebral en el rango de frecuencias de la banda delta en el procesamiento auditivo y en la hiperamonemia crónica 203
- Conectividad funcional y efectiva: alteración de la coherencia y causalidad en la hiperamonemia crónica 205

## **5.2 PACIENTES CON ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA 212**

### **5.2.1 ESTUDIO 1: 212**

ANÁLISIS DEL VOLUMEN DE SUSTANCIA GRIS Y CONECTIVIDAD FUNCIONAL EN REDES ICA Y SU RELACIÓN CON LAS ALTERACIONES COGNITIVAS EN LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA .....212

### **5.2.2 ESTUDIO 2: 218**

ANÁLISIS DEL VOLUMEN DE SUSTANCIA GRIS Y CONECTIVIDAD FUNCIONAL DEL HIPOCAMPO Y SU RELACIÓN CON LAS ALTERACIONES EN EL APRENDIZAJE Y MEMORIA CON ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA .....218

## **6. CONCLUSIONES 223**

MODELOS ANIMALES.....224

PACIENTES CON EHM.....225

## **7. BIBLIOGRAFÍA 227**

# ABREVIATURAS

---

ALFF = *Amplitude of Low Frequency Fluctuations*

AU1 = corteza auditiva primaria

BDL= biliar duct ligation

BOLD = *Blood Oxygenation Level Dependent Contrast*

CA = *cornu ammonis*

CF-er = conectividad funcional en estado de reposo

CIC = colículo inferior

dHb = desoxihemoglobina

DMN = *Default Mode Network*

EEG= electroencefalograma

EH = encefalopatía hepática

FLAIR = *Fluid- Attenuated Inversion Recovery*

GMPc = guanosín monofosfato cíclico

HA= hiperamonemia

Hb = hemoglobina

HDR = *Hemodynamic Response*

ICA = *Independent Component Analysis*

IL = interleucina

LPS = lipolisacárido

PCS = porto-cava shunt

PE = potencial evocado

PEA = potencial evocado auditivo

PEACS = potenciales evocados auditivos de latencia tardía o de corteza

PEALM = potenciales evocados auditivos de latencia media

PEATC = potenciales evocados auditivos del tronco cerebral

PEM = potencial evocado motor

PESS = potencial evocado somatosensorial

PET = tomografía por emisión de positrones

PEV = potencial evocado visual

RAD = red de atención dorsal

RAV = red de atención ventral

ReHo = *Regional Homogeneity*

RFPI= red frontoparietal izquierda

RGB = red de los ganglios basales

RM = resonancia magnética

RS = red de saliencia

RSM = red sensitivo-motora

TNF $\alpha$  = factor de necrosis tumoral alpha

VBM = *Voxel Based Morphometry*



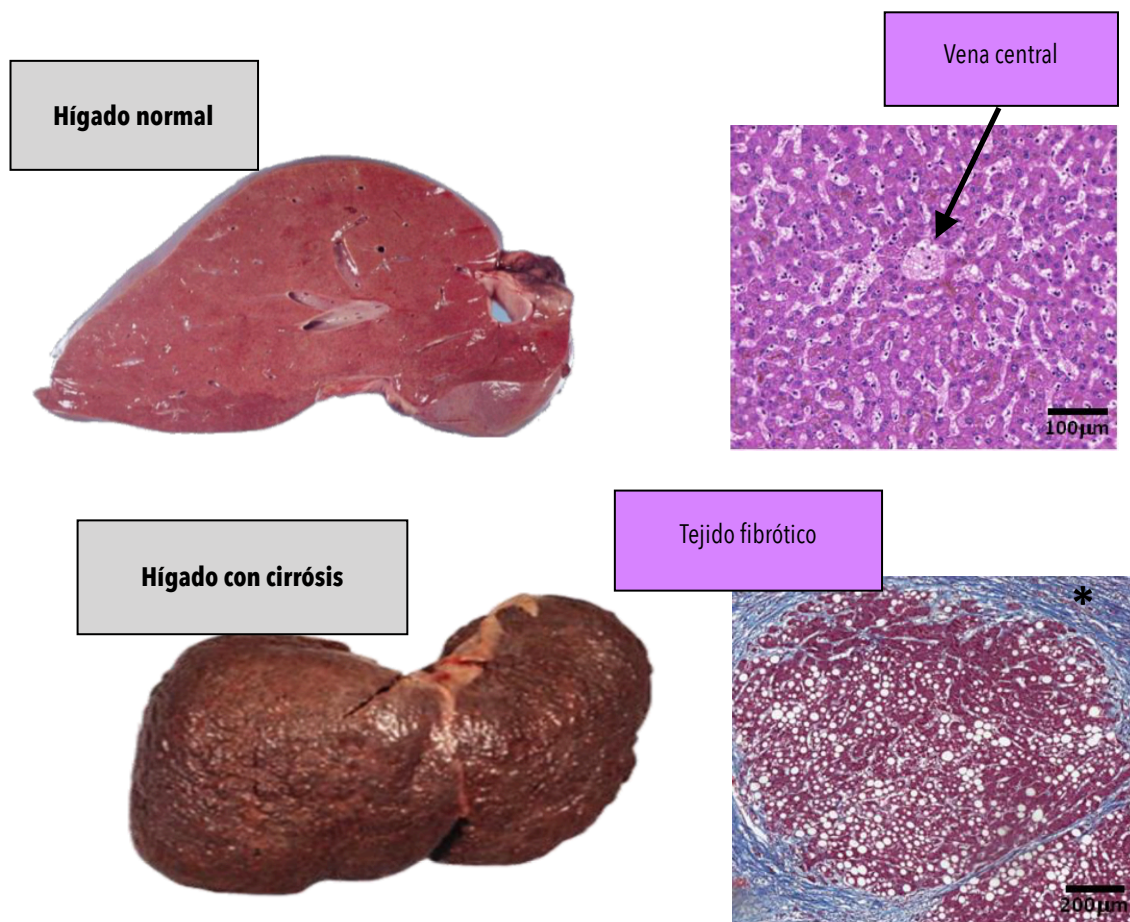


# 1.INTRODUCCIÓN

## 1.1 CIRROSIS HEPÁTICA

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

En la práctica clínica, el diagnóstico de la cirrosis se establece en base a una biopsia hepática con presencia de nódulos de regeneración, o por combinación de datos clínicos (indicios de cirrosis), analíticos (hiperbilirrubinemia, transaminasas elevadas...) y de ultrasonidos (Fibroscan®) característicos de esta patología.



**Figura 1:** Vista macroscópica y microscópica de un hígado normal y un hígado cirrótico. Hematoxilina-eosina (10x) de un sujeto con hígado sano: El contorno y la superficie del hígado sano son lisos y el tejido hepático está organizado en lóbulos ordenados alrededor de un vena central. Tinción tricrómica (5x) que ilustra la cirrosis (asterisco) en una biopsia hepática: El contorno y la superficie del hígado cirrótico son nodulares e irregulares con alteración de la arquitectura normal por bandas fibrosas y nódulos de tejido de regeneración. Imágenes obtenidas de pacientes cirróticos del laboratorio de Neurobiología CIPIF.



### 1.1.1 Epidemiología

Según datos recientes, en Estados Unidos se produjeron unas 38.000 muertes por enfermedad hepática crónica y cirrosis en el 2014, lo que supuso un 1,5% del total de muertes anuales (Kochanek et al., 2016). En España, de acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Estadística (<http://www.ine.es/>) el número de defunciones por esta causa ha disminuido considerablemente, pasando de unos 6.000 casos anuales en el año 2000 a unos 4.925 casos en el año 2018, lo que supone un 1,16% de las muertes anuales.

En Europa y Estados Unidos la prevalencia de la cirrosis hepática es de alrededor de 250 casos anuales por cada 100.000 personas. En España se estima una prevalencia de entre el 1 y el 2% de la población y es más frecuente en hombres a partir de los 50 años (Ayala, 2012). Sin embargo, existen varios factores que hacen pensar que la prevalencia de esta patología es mayor (Schuppan y Afdhal, 2008), ya que hay causas de enfermedad hepática que pueden no ser diagnosticadas, como las infecciones crónicas por virus B y C, o la esteatohepatitis. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la cirrosis en su fase compensada, es indetectable durante largos periodos de tiempo.

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

### 1.1.2 Estadios de la cirrosis

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

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

- La clasificación **Child-Pugh** (Child y Turcotte, 1964; Pugh et al., 1973) de severidad de enfermedad hepática se realiza teniendo en cuenta el grado de ascitis, las concentraciones plasmáticas de bilirrubina y albúmina, el tiempo de protrombina, y el grado de encefalopatía, como se resume en la Tabla 1A. Es la más utilizada y permite clasificar la gravedad, riesgo quirúrgico y el pronóstico global. Una puntuación total de 5-6 es considerada grado A (enfermedad bien compensada); 7-9 es grado B (compromiso

funcional significativo); y 10-15 es grado C (enfermedad descompensada). Estos grados se correlacionan con la supervivencia del paciente al año y a los 2 años (Tabla 1B).

**TABLA 1:** A) Escala Child-Pugh y B) su correlación con el índice de supervivencia.

| A | PARÁMETROS                                     | Puntos asignados |           |           |
|---|--|------------------|-----------|-----------|
|   |  | 1                | 2         | 3         |
|   | <b>Ascitis</b>                                 | Ausente          | Leve      | Moderada  |
|   | <b>Bilirrubina, mg/dl</b>                      | <= 2             | 2-3       | >3        |
|   | <b>Albúmina, g/dl</b>                          | >3,5             | 2,8-3,5   | <2,8      |
|   | <b>Tiempo de protombina</b>                    |                  |           |           |
|   | *Segundos sobre el control                     | 1-3              | 4-6       | >6        |
|   | *INR ( <i>International Normalized Ratio</i> ) | <1,8             | 1,8-2,3   | >2,3      |
|   | <b>Encefalopatía</b>                           | No               | Grado 1-2 | Grado 3-4 |

| B | Grado                                 | Puntos | Supervivencia al año (%) | Supervivencia a los 2 años (%) |
|---|---------------------------------------|--------|--------------------------|--------------------------------|
|   | A= enfermedad bien compensada         | 5-6    | 100                      | 85                             |
|   | B= compromiso funcional significativo | 7-9    | 80                       | 60                             |
|   | C= enfermedad descompensada           | 10-15  | 45                       | 35                             |

□ El índice **MELD**, del inglés *Model for End-stage Liver Disease*, (Kamath et al., 2001) es un índice pronóstico de la cirrosis en su fase avanzada que se aplica principalmente para la priorización de trasplantes hepáticos de pacientes. Se calcula considerando los niveles de bilirrubina, INR y creatinina:

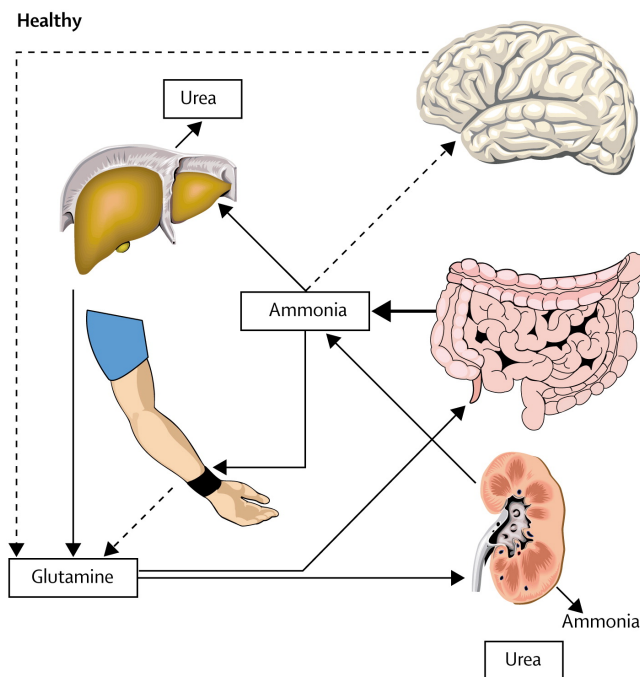
$$\text{MELD} = 9,6 \times [\text{Ln creatinina (mg/dl)}] + 3,8 [\text{Ln bilirrubina (mg/dl)}] + 11,2 [\text{Ln INR}] + 6,4$$

### 1.1.3 Alteraciones asociadas a la cirrosis

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

### 1.1.3.1 Hiperamonemia y cirrosis

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



**Figura 2:** Esquema del tráfico interorgánico del amonio (del inglés, *ammonia*) en individuos sanos (del inglés, *healthy*). El amonio se produce principalmente en el intestino a partir de las proteínas de la dieta, la desaminación de glutamina (del inglés, *glutamine*) a través de la vía de la glutaminasa y la acción bacteriana del colon. También se produce en el riñón a partir de glutamina por la vía de la glutaminasa. En individuos sanos el amonio se metaboliza a urea predominantemente en el hígado. Parte del amonio se incorpora en glutamina en el hígado, el músculo esquelético y el cerebro. En pacientes con cirrosis los niveles circulantes de amonio aumentan porque la capacidad de síntesis de urea del hígado se reduce. Figura extraída y modificada de Shawcross et al., 2005.

Normalmente, el amonio es detoxificado en el hígado mediante el ciclo de la urea y es eliminado en la orina. En tejidos como el cerebro y el músculo, el amonio se detoxifica por incorporación en glutamina, que se transporta al hígado, donde la glutaminasa la escinde en glutamato y amonio para, finalmente, eliminarse por el ciclo de la urea.

En enfermedades hepáticas, como la cirrosis, el amonio no es eliminado eficientemente, aumentando así sus niveles tanto en sangre como en cerebro, actuando como agente neurotóxico. Datos experimentales y clínicos apoyan que la HA juega un papel esencial en el desarrollo de la encefalopatía hepática (EH) (Felipo et al., 2012).

### 1.1.3.2 Inflamación y cirrosis

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

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

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

El hígado regula la homeostasis del sistema inmune a través de dos mecanismos:

1. Vigilancia antimicrobiana a través de diferentes células presentadores de antígeno residentes (células de Kupffer, células endoteliales sinusoidales y células dentríticas) y de linfocitos (T, B, NK y NKT) que se organizan de manera específica para maximizar la detección de patógenos y agentes nocivos, tanto sistémicos como derivados del intestino (Jenne y Kubes, 2013).
2. Síntesis de moléculas solubles, principalmente por los hepatocitos, necesarias para una respuesta inmune eficaz, que normalmente se sintetizan y secretan en respuesta a diferentes citoquinas proinflamatorias: proteínas del sistema de complemento, proteína C reactiva, proteína de unión a lipopolisacáridos, proteína de fase aguda, etc. (Racanelli y Rehermann, 2006).

Cuando un agente tóxico entra en la circulación portal, es reconocido por las células de vigilancia antimicrobiana del hígado. Si los niveles de agente extraño son elevados, estas células hepáticas van a liberar citocinas inflamatorias y quimio-atrayentes para reclutar neutrófilos y otras células mediadoras de la inflamación. Los neutrófilos son células que participan en la respuesta inmunitaria temprana a través de la fagocitosis de los agentes extraños y la eliminación de éstos mediante reacciones oxidativas con especies reactivas de oxígeno. Las especies reactivas de oxígeno, no sólo consiguen eliminar los microorganismos invasores, si no que también producen daño en los tejidos circundantes.

Cuando se produce el daño hepático, las células de Kupffer también se activan y liberan mediadores inflamatorios, incluyendo citocinas proinflamatorias, como el TNF $\alpha$  (factor de

necrosis tumoral alpha), interleucinas (IL) como IL-1 $\beta$ , IL-6 o IL-12, ion superóxido, óxido nítrico, eicosanoides, quimiocinas y enzimas proteolíticas, produciendo un aumento de la citotoxicidad (Neuman et al., 2015). Además, atraen a células del sistema periférico mediante quimiocinas como la familia del MIP (*macrophage inflammatory protein*) que van a conducir hacia el tejido inflamado células con función fagocítica, como neutrófilos, y otras que van a aumentar el ambiente proinflamatorio y citotóxico como monocitos y linfocitos, con el fin de controlar la infección o agente causante del daño hepático (Kolios et al., 2006).

Es difícil delinear en pacientes cirróticos si la causa de la inflamación es debida al daño de los hepatocitos o a la presencia de una infección local o sistémica, especialmente en aquellos pacientes con insuficiencia hepática con niveles bajos de endotoxemia debido a una traslación bacteriana a la circulación portal a través de las paredes del intestino (Bode et al., 1987).

Tanto en el fallo hepático agudo como en el crónico se produce una disminución de la función inmunosupresora del hígado. Esto hace que los pacientes sean más susceptibles al desarrollo de infecciones, lo que empeora el curso clínico de la enfermedad, pudiendo producir fallo orgánico y llegar incluso a la muerte (Wasmuth et al., 2005; Antoniades et al., 2008). Se considera que la causa de aumento de la susceptibilidad a infecciones en la cirrosis es multifactorial. Se sabe que en hígado cirrótico se produce una disfunción fagocítica en neutrófilos, disminución de la actividad de las NK, expansión del TNF $\alpha$  por parte de los monocitos y un aumento de citocinas proinflamatorias (Lario et al., 2013, Girón-González et al., 2004).

Por otro lado, la respuesta inflamatoria debe ocurrir de forma controlada a través de la liberación de mediadores anti-inflamatorios que previenen el exceso de inflamación. Cuando la homeostasis de la respuesta inflamatoria está alterada (hay un exceso de respuesta inflamatoria sistémica o de respuesta compensatoria anti-inflamatoria) se produce una depresión celular inmunitaria que puede devenir en disfunción multiorgánica y muerte (Bone RC., 1996). Esto se observa frecuentemente en el fallo hepático agudo o crónico, especialmente en el contexto de sepsis severa (*Hepatic Encephalopathy*, Mullen y Pakrash, 2012).

Uno de los rasgos más comunes en los pacientes con cirrosis es la linfopenia, especialmente, de las células T helper y se suele atribuir al secuestro esplénico (Lario et al., 2013). Diversos estudios en humanos y modelos animales, documentan una reducción de células Th *naive* en enfermedades hepáticas de diversa etiología (Yonkers et al., 2011; Aseni et al., 1988 o en Aoki et al., 1993). Además, la linfopenia es un desencadenante de la autoinmunidad debido a la expansión clonal de linfocitos T autoreactivos. En un ambiente linfopénico, el reconocimiento de lo propio induce que algunas células T se expandan mediante un mecanismo conocido como proliferación espontánea (Le Campion et al., 2009).

En los pacientes cirróticos también se detectan niveles alterados de interleucinas en suero, como consecuencia de la alteración de los distintos tipos celulares del sistema inmunitario.

Se ha propuesto el estudio de estas citocinas como posible diana terapéutica en el tratamiento de los pacientes con enfermedad hepática (Hammerich y Tacke, 2014) y se ha estudiado el efecto que las citocinas tienen directamente sobre el hígado. La IL-17, por ejemplo, promueve la fibrogénesis hepática a través de la activación de las células estrelladas hepáticas y facilita el desarrollo de cáncer de hígado a través del reclutamiento de células mieloides supresoras (Lan et al., 2009). Por otra parte, la IL-22 protege del desarrollo de fibrosis y esteatohepatitis (Yang et al., 2010) aunque participa en el desarrollo del carcinoma hepatocelular (Jiang et al., 2011). La IL-10 es antiinflamatoria y tiene función protectora durante el daño hepático crónico y la fibrogénesis (Thompson et al., 1998). La IL-6 tiene un papel controvertido, ya que aunque tiene un papel crítico en la fase aguda de daño hepático (Yeh y Chen, 2010) pero la señalización de esta interleucina es protectora durante la progresión de la fibrosis (Streetz et al., 2003).

## 1.2 ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

La EH es un síndrome neuropsiquiátrico complejo caracterizado por una alteración funcional del sistema nervioso central subsiguiente a un fallo hepático. El rango de manifestaciones clínicas varía desde alteraciones sutiles en las funciones mentales (ver apartado 1.2.1), hasta coma profundo y muerte (Gazzard et al., 1986). La EH se presenta en hasta un 50-70% de los pacientes con cirrosis (Riordan y Williams, 1997). Es una alteración potencialmente reversible, pero su aparición conlleva un mal pronóstico.

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

- ❑ **EH aguda:** está asociada a un fallo hepático agudo o fulminante y es un síndrome clínico de evolución rápida como consecuencia de una inflamación o necrosis masiva del hígado. Las principales causas de este tipo de EH son las hepatitis víricas agudas, intoxicación por paracetamol y reacciones idiosincrásicas a fármacos. El grado de mortalidad es muy elevado, debido en muchos casos al aumento de la presión intracraneal.
- ❑ **EH crónica:** es la forma más frecuente de EH clínica. Acompañada por desviación de la sangre portal a la circulación sistémica (EH porto-sistémica). Esto ocurre tras una intervención quirúrgica (anastomosis porta-cava o inserción de TIPS) en un paciente con una enfermedad hepática crónica o espontáneamente en pacientes cirróticos debido a la hipertensión portal. Esta desviación de la sangre impide la correcta eliminación en el hígado de distintas sustancias tóxicas, como el amoníaco, que pueden de este modo, alcanzar el cerebro y alterar su función. En estos pacientes se pueden producir episodios

de EH clínica como consecuencia de determinados factores desencadenantes (hemorragia digestiva, alta ingesta de proteínas, estreñimiento, infección). Estos episodios de EH son habitualmente reversibles cuando el desencadenante es eliminado

### 1.2.1 Encefalopatía hepática mínima

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

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

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

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

### 1.2.2 Alteraciones neurológicas

#### 1.2.2.1 Alteraciones neuropsiquiátricas

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

Sin embargo, la EH crónica se desarrolla lentamente y los síntomas varían desde ligeros déficits de atención y cambios en la personalidad en la EHM, a enlentecimiento psicomotor, falta de atención y síntomas extrapiramidales como hipomimia (falta de expresión facial) y



bradiquinesia en grado I de EH, desorientación y comportamiento extraño en grado II, acabando finalmente en estupor y coma en grados III y IV (Weissenborn et al., 2005a). Los signos más tempranos suelen ser alteraciones en el sueño y cambios en el comportamiento (Weissenborn et al., 2005b). El espectro clínico de la EH es muy amplio, por lo que su diagnóstico puede ser difícil dado que no existe un síntoma o examen de laboratorio específico para su diagnóstico. La gravedad de la EH clínica se clasifica en 4 grados según las manifestaciones neuropsicológicas. En la Tabla 2 se presentan los criterios de West-Haven para la estadificación del estado mental en pacientes con EH clínica.

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

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

| GRADO DE EH | SINTOMATOLOGÍA  |
|-------------|---|
| 0           | Sin normalidad detectada  |
| 1           | Leve falta de atención e incapacidad de mantenerla, euforia, ansiedad.<br>Dificultad para realizar suma o sustracción de números sencillos. |
| 2           | Letargo, apatía desorientación en el tiempo y en el espacio.<br>Cambios obvios de personalidad.   |
| 3           | Somnolencia a semiestupor, pero con respuesta a estímulos. Confusión.<br>Desorientación importante.   |
| 4           | Coma, sin posibilidad de realizar pruebas de función mental.  |

(Modificado de Conn y Lieberthal, 1979)

Además de las alteraciones cognitivas y motoras (desarrolladas en las secciones siguientes) se pueden observar en pacientes con EH otras alteraciones neuropsiquiátricas. Se han descrito irritabilidad, apatía, trastornos de la conducta, cambios en el apetito, mirada fija, amnesia, cambios en el temperamento y en la personalidad. Algunos pacientes pasan de la depresión a la euforia en pocos minutos. Otros pacientes presentan sólo depresión o euforia alternadas con un temperamento estable. Los síntomas paranoicos suelen ser comunes durante el estupor como resultado de las dificultades en la percepción y la interpretación. También pueden aparecer alucinaciones (Sherlock et al, 1954).



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

### 1.2.2.2 Alteraciones cognitivas

Las alteraciones cognitivas comienzan con falta de concentración y de atención, así como de una disminución de la capacidad intelectual. Los pacientes con EH presentan un descenso continuo en la atención acompañado de un descenso en el estado de alerta desde el grado II al grado III finalizando en coma. Incluso los pacientes que parecen no estar clínicamente afectados manifiestan distintos déficits de atención en test psicométricos, indicando una disfunción de los tres subsistemas que cooperan en la atención: vigilia (capacidad para mantener el estado de alerta), orientación y funciones ejecutivas (como hacer planes, detección de errores, resolución de conflictos, etc.). En fases más avanzadas, la falta de atención se agudiza de forma que cuando se formula una pregunta a un paciente, frecuentemente necesita una segunda repetición y las repuestas son lentas y a menudo carentes de sentido (Weissenborn et al., 2005a).

Los pacientes con EH presentan otras alteraciones cognitivas como alteraciones en la percepción visuo-espacial que se manifiestan por ejemplo en la apraxia construccional en la que trastornos de la construcción en el espacio les impide escribir y reproducir correctamente dibujos sencillos. También presentan un déficit en el proceso de aprendizaje, mostrando dificultad a la hora de aprender nuevas tareas. Los pacientes cirróticos con EH obtienen peores resultados que individuos controles en pruebas de inteligencia, aprendizaje y memoria así como de percepción motora y espacial (Puca et al, 1989; Weissenborn et al., 2003) sin embargo la capacidad verbal no está alterada. La etiología de la cirrosis no influye en los resultados obtenidos en estas pruebas (Rehnström et al, 1977).

Existe cierta controversia en cuanto a si existe o no deterioro en la memoria en los pacientes con EH (Weissenborn et al, 2003); los estudios realizados han resultado dispares en función de la etiología de la cirrosis y los test utilizados (Elithorn et al., 1975; Rikkers et al., 1978; Gilberstadt et al., 1980; Schomerus et al., 1981; Hegedus et al., 1985). Los test psicométricos empleados para medir la memoria en pacientes con EH evalúan fundamentalmente la memoria semántica y la memoria de trabajo (Weissenborn et al, 2005). En los tests que dependen de la atención, como ocurre en muchos tests de memoria, es difícil saber a qué alteración atribuir un error, a la atención o a la memoria. Por otro lado, buena parte de los estudios realizados en EH están basados en test de recuerdo a corto plazo de ítems visuales, lo cual supone un sesgo ya que los pacientes cirróticos tienen déficit en la percepción visual

(Tarter et al., 1984) que pueden dar lugar a una mala interpretación de los resultados de memoria. Weissenborn et al., 2003 realizaron un estudio en pacientes con EH temprana (EHM y Grado I de EH) en el que evaluaban tanto la memoria de ítems acústicos como visuales a corto y a largo plazo. Los pacientes con EH temprana realizan peor que los sujetos control todos los test de memoria a corto plazo y los test de memoria visual a largo plazo, pero concluyeron que los peores resultados observados en la EH se debían a déficits de atención y de la percepción visual.

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

Como se ha mencionado antes, en los pacientes con 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 o parámetros electrofisiológicos que pueden ser observados en pacientes con cirrosis que no presentan evidencias clínicas de EH (Amodio et al, 2004). Para diagnosticar la presencia de EHM, se utiliza actualmente una batería denominada PHES que consta de 5 tests psicométricos: test de conexión numérica A y B, test de la clave de números, test de puntos seriados y test del trazado de línea (ver apartado 2.2.2.1 de Material y métodos). Los resultados obtenidos en los test de la batería PHES se ajustan en función de la edad y el nivel de formación de acuerdo con las tablas de normalidad de los sujetos control ([www.redeh.org](http://www.redeh.org)). Se considera que un paciente presenta EHM cuando en esta batería obtiene una puntuación igual o inferior a - 4.

Las alteraciones en la atención, procesamiento de la información (Dhiman and Chawla, 2009), coordinación motora, etc., tienen importantes consecuencias en la vida diaria de los pacientes. Por ejemplo, la mayoría de los pacientes cirróticos con EHM tienen disminuida la capacidad de conducir vehículos (Schomerus et al, 1981; Bajaj et al, 2009; Felipo et al., 2013). Los pacientes con EHM presentan alteraciones en funciones de la vida diaria como la interacción social, comportamiento emocional, dormir, trabajar o realizar tareas domésticas (Groeneweg et al, 1998; Prasad et al, 2007).

### **1.2.2.3 Alteraciones motoras**

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

**TABLA 3:** Alteraciones motoras en pacientes con Encefalopatía Hepática (clasificación West-Haven)

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

(Según Amodio et al, 2004)

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

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

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

Jover et al., 2005 realizaron una serie de tests psicométricos para medir el deterioro cognitivo, los signos extrapiramidales y la calidad de vida. 22 de los 46 pacientes cirróticos estudiados manifestaron alteraciones motoras extrapiramidales y obtuvieron peores resultados en los tests psicométricos y de calidad de vida.

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

El deterioro psicomotor, en particular el del dominio visuomotor, necesario para llevar a cabo tareas ejecutivas que requieren de la búsqueda visual, secuencias motoras y coordinación visuo-motora, se ha descrito como rasgo característico de la EHM (Kuhlbusch et al., 1998; Weissenborn et al., 2001; Lazeyras et al., 2002; Felipe et al., 2012).

### **1.2.3 Factores que contribuyen a la aparición de Encefalopatía Hepática**

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

#### **1.2.3.1 Hiperamonemia**

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

Los mecanismos patogénicos de la encefalopatía hepática están empezando a ser esclarecidos. Parece claro que la HA es uno de los principales responsables de este proceso. Existen datos experimentales y clínicos que apoyan el papel de la HA en el desarrollo de la EH:

1. Los factores desencadenantes de la EH y del coma hepático (ingesta proteica, hemorragia intestinal, etc.) en pacientes cirróticos van asociados a un aumento de los niveles de amonio.
2. El funcionamiento del hígado en las deficiencias congénitas del ciclo de la urea es normal excepto en la detoxificación del amonio. En estas situaciones también se produce EH. Los niños nacidos con HA debida a una deficiencia congénita en el ciclo de la urea, presentan retraso mental y el grado del mismo se correlaciona con el nivel y la duración de la HA neonatal (Shih y Tanaka, 1978; Msall et al., 1984).

3. Los tratamientos clínicos que revierten la EH van dirigidos a reducir los niveles de amonio: reducción de la ingesta proteica, control de la flora bacteriana intestinal productora de amonio con antibióticos o la reducción de la absorción del amonio intestinal por acidificación del lumen con lactulosa o lactitol.
4. Existe una buena correlación entre la severidad de los síntomas neurológicos en los pacientes y la concentración arterial de amonio que presentan (Clemmesen et al., 1999).
5. La neuropatología que se manifiesta en la EH es similar a la observada como consecuencia de la exposición del cerebro a niveles altos de amonio:
  - ☑ Tanto en EH aguda como en la exposición aguda a amonio en modelos animales, los astrocitos se hinchan provocando edema cerebral. Esta complicación se presenta en pacientes con síndromes hiperamonémicos agudos (fallo hepático agudo, síndrome de Reye, enzimopatías congénitas del ciclo de la urea, etc.) y se correlaciona con los niveles de amonio alcanzados en esos pacientes (1-5 mM) (Clemmesen et al., 1999).
  - ☑ Tanto en EH crónica como en la exposición crónica a amonio los astrocitos sufren alteraciones morfológicas y funcionales similares, apareciendo los denominados astrocitos de Alzheimer tipo II. Estas alteraciones se observan tanto en pacientes con fallo hepático crónico como en pacientes con HA crónica debida a enzimopatías congénitas del ciclo de la urea (Michalak y Butterworth., 1997), en ratones con HA 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 HA juega un papel esencial en el desarrollo de la EH.

### 1.2.3.2 Inflamación

#### ■ Sinergia entre hiperamonemia e inflamación

Cada vez existen más evidencias de que la inflamación crónica asociada a muchas enfermedades conduce a un deterioro neurológico que se expresa en diferentes formas de alteraciones cognitivas y motoras. La inflamación periférica puede producir alteraciones cognitivas en diferentes situaciones patológicas como la diabetes, la artritis reumatoide, la obesidad o la enfermedad renal crónica. La inflamación y la neuroinflamación también contribuyen a los déficits cognitivos y motores de la disfunción cognitiva postoperatoria, en algunas enfermedades mentales como la esquizofrenia y neurodegenerativas como el Alzheimer (Díaz-Gerevini et al., 2014; Shin et al., 2013; Nguyen et al., 2014; da Matta et al., 2014; Boyer et al., 2013; Takeda et al., 2014; Cherniack, 2012; Hovens et al., 2014; Szekeley et

al., 2004; Montoliu et al., 2015). Existe una asociación entre el marcador inflamatorio IL-6 y el declive cognitivo en personas mayores (Teunissen et al., 2003; Weaver et al., 2002; Yaffe et al., 2003).

Pacientes con algunas enfermedades inflamatorias crónicas están siendo tratados con anti-TNF- $\alpha$ . Se ha comprobado que este tratamiento mejora la función cognitiva en pacientes con artritis reumatoide o sarcoidosis (Raftery et al., 2012; Elfferich et al., 2010). Estos estudios sugieren que la inflamación periférica puede conducir a alteraciones cognitivas en diferentes situaciones patológicas.

Los datos en la literatura y de nuestro grupo indican que la inflamación también está implicada en la aparición de la EH. Existe una correlación entre los niveles séricos de TNF- $\alpha$  y la severidad de la EH en pacientes con fallo hepático crónico. Los pacientes en grado I de EH presentan concentraciones de TNF- $\alpha$  más bajas que los que están en grado II, siendo los pacientes en grado IV los que muestran las concentraciones séricas de TNF- $\alpha$  más altas (Odeh et al., 2004). En modelos animales de EH, la reducción de la inflamación periférica con un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  reduce la neuroinflamación y mejora la cognición y el aprendizaje y coordinación motora (Dadsetan et al., 2016a y 2016b).

Montoliu et al., (2009) mostraron que la IL-6 e IL-18 están aumentadas en pacientes cirróticos con encefalopatía hepática mínima (EHM) comparadas con pacientes sin EHM y que existe una correlación entre los niveles de IL-6 e IL-18 en suero y el grado de EHM. Los pacientes con niveles más altos de IL-6 e IL-18 presentaron un mayor grado de EHM, sugiriendo que alteraciones relacionadas con la IL-6 e IL-18 podrían contribuir al deterioro cognitivo en la EHM y que sus concentraciones en sangre podrían ser útiles para distinguir pacientes cirróticos con y sin EHM. Además la aparición de alteraciones neurológicas en la EHM se han asociado con el incremento de la activación, cantidad y diferenciación de ciertos tipos de linfocitos T y con la activación de linfocitos B (Mangas-Losada et al., 2017).

La HA y la inflamación juegan un papel sinérgico en la inducción de las alteraciones de la EHM (Felipo, 2013; Shawcross., et al., 2004 y 2007; Felipo et al., 2012; Montoliu et al., 2009).

En pacientes con fallo hepático agudo la inflamación periférica está asociada con la progresión de la EH (Rolando et al., 2000) y por otro lado, Shawcross et al., (2004 y 2007) demostraron que la inflamación agrava las alteraciones neurológicas producidas por la HA en pacientes cirróticos. Administraron a pacientes cirróticos una solución de aminoácidos para inducir HA, la cual provocó un deterioro de la función neuropsicológica (evaluada mediante tests psicométricos) cuando los pacientes presentaban inflamación pero no tras la resolución de la misma. Estos datos indican que la inflamación y la HA tienen efectos sinérgicos en la inducción de las alteraciones neurológicas en EH. Estos mismos investigadores, comprobaron posteriormente que la inflamación determina el grado de severidad de la EH en pacientes cirróticos con EH avanzada. Los niveles de inflamación eran superiores en pacientes con EH en grado 4 que en grado 3 mientras que los niveles de amonio eran similares en grado 3 y 4 (Shawcross et al., 2011).

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

Jover et al., (2006) alimentaron ratas con ligadura biliar (BDL del inglés *biliar duct ligation*) con una dieta rica en acetato de amonio para inducir HA o con pienso normal. Las ratas con BDL con o sin HA presentaron inflamación. Sin embargo, en las ratas con BDL con HA se observó un aumento de astrocitosis tipo II de Alzheimer, edema cerebral y un deterioro de la actividad motora respecto a ratas BDL alimentadas con pienso normal.

## ■ Neuroinflamación

Actualmente, el procedimiento utilizado más frecuentemente para evaluar la presencia de neuroinflamación *in vivo* es analizar por tomografía de emisión de positrones (PET) la unión de ligandos a la proteína TPSO (antes llamada PTBR), que aumenta cuando se activa la microglía, células con capacidad fagocitaria que forman el sistema inmunitario del sistema nervioso central. Utilizando ligandos de TPSO marcados radiactivamente se vio mediante la técnica PET que los pacientes con EH con mayor deterioro cognitivo presentaban mayores niveles de unión del ligando de TPSO (Cagning et al., 2006). Esto podemos interpretarlo actualmente como indicador de la presencia de neuroinflamación en EH.

Se ha demostrado la presencia de neuroinflamación en pacientes con diferentes grados de enfermedad hepática en estudios post-mortem. Balzano et al., (2018) han demostrado la presencia de neuroinflamación en cerebelo en etapas tempranas de la enfermedad hepática, incluso antes de alcanzar el grado de cirrosis. La neuroinflamación, con la activación de microglía y astrocitos y pérdida de neuronas, ocurre primero en la capa molecular y más tarde en la sustancia blanca y se asocia con la infiltración de ciertos tipos de linfocitos periféricos.

Estudios en modelos animales corroboran la implicación de la inflamación y de la HA en el desarrollo de neuroinflamación y alteraciones cognitivas y motoras en la EH:

Guigere et al., (1992) y Agusti et al., (2014) observaron mediante autoradiografía un aumento de la expresión de TSPO en cerebelo, tálamo, corteza, hipocampo y estriado de ratas con EH inducida por anastomosis porta-cava (PCS del inglés *porto-cava shunt*). Como se comenta arriba, esto se puede interpretar actualmente como indicador de la presencia de neuroinflamación.



Cauli et al., (2007) demostraron que en la corteza cerebral de ratas PCS aumentan parámetros neuroinflamatorios como la IL-6, la actividad COX y de la iNOS que acompañan al deterioro cognitivo y propusieron que la neuroinflamación juega un papel esencial en el deterioro cognitivo en EH crónica. Mostraron que la administración de un antiinflamatorio, ibuprofeno (30mg/kg/día), reduce la neuroinflamación y restaura la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en las ratas PCS. Estudiaron también el efecto del tratamiento con Ibuprofeno sobre la hipoquinesia en ratas PCS y demostraron que, a dosis de 15mg/kg/día recuperaba la función motora en ratas PCS (Cauli et al, 2009).

Rodrigo et al., (2010) demostraron que ratas con EH por BDL presentan activación de microglia y neuroinflamación en cerebelo. Como modelo de HA "pura" sin fallo hepático utilizaron ratas con HA crónica moderada (alimentadas con una dieta rica en amonio), en las que también encontraron activación de microglia y neuroinflamación. Esto indica que la HA *per se* induce neuroinflamación. Ambos modelos presentaron alteraciones cognitivas en la tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y y alteraciones motoras. En el cerebelo de ratas con BDL y con HA hay un aumento de marcadores inflamatorios. De nuevo, el tratamiento con Ibuprofeno (30mg/kg rata/día) revirtió la activación de la microglía y restauró las alteraciones motoras y la capacidad de aprendizaje.

Estudios recientes en modelos animales de EH han demostrado que la inflamación periférica es el principal contribuyente a la aparición de la neuroinflamación. La administración de un anti-inflamatorio de acción periférica previene la inflamación periférica (anti-TNF alfa), la neuroinflamación en hipocampo y cerebelo y las alteraciones motoras y en la memoria espacial consecuentes (Dadsetan et al., 2016a y 2016b).

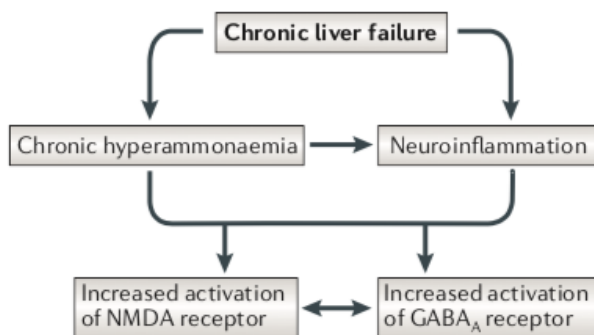
Estos datos apoyan que la HA y la inflamación actúan sinérgicamente en la inducción de la neuroinflamación y de alteraciones neurológicas. Las estrategias terapéuticas dirigidas a reducir la inflamación podrían prevenir el progreso de la EH y sus complicaciones.

### 1.2.3.3 Alteraciones en la neurotransmisión

Muchas de las alteraciones que se observan en la EH son consecuencia de alteraciones en distintos pasos del proceso de la neurotransmisión: concentración extracelular de neurotransmisores, expresión en membrana de sus receptores y transportadores, fosforilación y función de los receptores de los neurotransmisores y alteraciones en las vías de transducción de señales asociadas a la activación de los receptores. Se ha demostrado la alteración tanto de la neurotransmisión GABAérgica como glutamatérgica en modelos animales de HA y EH (Cauli et al., 2009 y Felipo, 2013). Algunos ejemplos relevantes de las alteraciones en la neurotransmisión que contribuyen a las alteraciones en HA y EH son:



1. La activación excesiva de los receptores NMDA es responsable de la muerte inducida por HA aguda (Marcaida et al., 1992; Hermenegildo et al., 1996).
2. El aumento de la activación tónica de los receptores NMDA conduce a una menor función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc (guanosín monofosfato cíclico) y a la disminución de la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y en la EH crónica (Hermenegildo et al., 1998; Erceg et al., 2005a y 2005b; Cabrera-Pastor et al., 2016).
3. El aumento del glutamato extracelular y de la activación de receptores metabotrópicos en la sustancia nigra conduce a la hipoquinesia presente en la EH crónica (Cauli et al., 2006).
4. El aumento del tono GABAérgico en el cerebelo en la HA crónica contribuye a las alteraciones cognitivas y motoras de la EH. La hiperamonemia aumenta la expresión en membrana del transportador de GABA GAT-3 en los astrocitos activados revirtiendo su función y aumentando el GABA extracelular que conduce a la incoordinación motora y déficits de aprendizaje (Hernández-Rabaza., et al 2016a; Cauli et al., 2009; Cabrera-Pastor et al., 2018).
5. La alteración de la expresión en membrana de receptores de glutamato y GABA en cerebelo e hipocampo en ratas con HA está asociado con la alteración de las capacidades cognitivas y motoras (Hernández-Rabaza., et al 2016a y 2016b; Cabrera-Pastor et al., 2018; Taoro-González L., 2018)



**Figura 3:** Papel sinérgico de la hiperamonemia y la neuroinflamación en la alteración de la neurotransmisión en la EH. Figura extraída y modificada de Felipo, 2013.

La EH no es consecuencia de los cambios en un único sistema de neurotransmisores, sino de una comunicación neuronal alterada como resultado de la alteración de la neurotransmisión

de diferentes redes neuronales que modulan diferentes aspectos de la función cognitiva y motora (Llansola et al., 2015).

### **1.3 NEUROFISIOLOGÍA EN LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA**

La investigación neurofisiológica en la EH se realiza generalmente mediante las técnicas del electroencefalograma (EEG) y de los potenciales evocados (PEs). El EEG refleja fundamentalmente la actividad postsináptica de las células piramidales que se encuentran en la capa IV de la corteza cerebral. Es extremadamente sensible a la influencia de agentes tóxicos o farmacológicos y factores metabólicos. Los PEs son respuestas observables en el EEG que se generan a través de la recepción pasiva de un estímulo sensorial (PEs exógenos) o a través del procesamiento cognitivo de un estímulo sensorial (PEs endógenos o cognitivos). Al contrario que el EEG que sólo nos permite la evaluación a nivel de la corteza cerebral, los PEs permiten evaluar tanto la corteza cerebral como el tronco del encéfalo (Amodio y Montagnese., 2014). Los PEs se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de estímulo que los evocan en visuales (PEV), auditivos (PEA) y somatosensoriales (PESS) o según la ventana de tiempo en la que se analizan de latencia corta, media o larga. Los potenciales evocados motores (PEM) se registran en los músculos a través de la estimulación transcraneal, tanto eléctrica como magnética, de la corteza motora y aportan información de la excitabilidad de la corteza y el tiempo de conducción cortico-espinal. Cambios en la latencia en los PEs exógenos o motores reflejan cambios en el tiempo de transmisión y en los PEs cognitivos cambios en la activación o sincronización de las neuronas de las áreas relacionadas con el proceso cognitivo. Los cambios en la amplitud de los PEs reflejan cambios en la sincronización y/o en la cantidad de neuronas activadas.

Según la guía de práctica clínica de la ISHEN 2009 (*International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism*) las técnicas neurofisiológicas más reproducibles para la evaluación de la EH son los PEs cognitivos, el EEG y los PEVs (de latencias mayores a los 100 ms) y los PESSs (de latencias entre 25 y 100 ms). Los PEs de latencia corta (PEs del tronco del encéfalo y PESSs de latencias inferiores a los 100 ms) no son en principio útiles para la detección de EH pero permiten evaluar déficits en la conducción por la formación de edema. Los PESSs y los PEM permiten evaluar mielopatías.

La mejor elección para la evaluación neurofisiológica, tanto para investigación como para la práctica clínica depende del grado de disfunción y de EH. Las técnicas más sensibles (PE cognitivos y el análisis cuantitativo del EEG) son las mejores opciones para los grados bajos o intermedios de EH, sin embargo, los PEs cognitivos se saturan de forma rápida (en términos de cambio) con el aumento del grado de severidad. En el caso de la EH severa, se

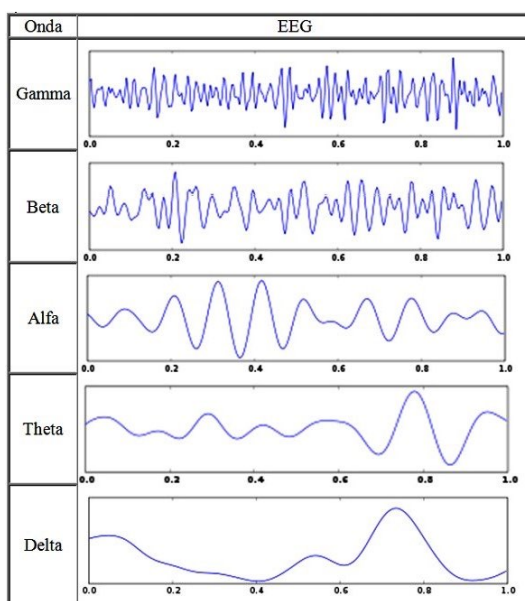
pueden utilizar técnicas menos sensibles (PEVs tipo destello o PESSs). En casos extremadamente severos de EH, los primeros componentes corticales de los PESSs todavía se pueden detectar.

### 1.3.1 El electroencefalograma

El cerebro es un órgano cuyo funcionamiento viene acompañado de diversos tipos de actividad eléctrica. El EEG es la imagen gráfica del registro de la actividad eléctrica cerebral a lo largo del tiempo. La actividad eléctrica cerebral cambia en cada momento, tanto si el sujeto se encuentra en estado de reposo como si está realizando una actividad, por lo que el EEG es un registro dinámico. Los electrodos son los receptores de la actividad eléctrica y pueden ser extracraneales o intracraneales.

En estado de reposo, el medio extracelular de una neurona está formado principalmente por iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) y cloro ( $\text{Cl}^-$ ), mientras que el espacio intracelular está compuesto principalmente por iones potasio ( $\text{K}^+$ ) y aniones ( $\text{A}^-$ ) orgánicos, principalmente aminoácidos y proteínas (Kandel et al., 2000). El gradiente de concentración entre el espacio intra- y extracelular da lugar a una diferencia de voltaje de aproximadamente  $-60$  mV dentro de la célula relativa al espacio extracelular neuronal. Cuando se produce una activación, canales especializados permiten el paso de iones dentro o fuera de la neurona, lo que produce un cambio en la diferencia de voltaje a lo largo de la membrana, que es la señal que medimos a través de los electrodos.

La actividad electroencefalográfica de interés está habitualmente en un rango de frecuencias entre 0 y 30 Hz.



**Figura 4:** Principales ritmos del EEG. Figura extraída de PsicoWilson.html

En la inspección de un EEG podemos distinguir dos componentes: la actividad rítmica de fondo y la actividad transitoria (grafoelementos o componentes básicos que aparecen en el registro en un momento dado). Los principales ritmos del EEG se diferencian por su intervalo de frecuencia, y cada intervalo tiene el nombre de una letra griega. Los *ritmos delta* son lentos, menos de 4 Hz, a menudo de gran amplitud y son indicadores de sueño profundo en condiciones fisiológicas. Los *ritmos theta* oscilan entre 4-7 Hz y pueden producirse durante estados de sueño y vigilia. Los *ritmos alfa* son de unos 8-13 Hz, de gran amplitud en la corteza occipital y están asociados a tranquilidad, en estados de vigilia. La frecuencia de los *ritmos mu* es similar a la de los ritmos alfa, pero son mayores en las áreas somatosensoriales y motoras. Los *ritmos beta* son de unos 15-30 Hz. Los ritmos gamma son relativamente rápidos y oscilan unos 30-90 Hz, e indican una corteza activada o atenta (Figura 4).

Cuando estamos despiertos, relajados y con los ojos cerrados, en el EEG de un sujeto normal se puede registrar como actividad rítmica de fondo un ritmo de frecuencia alfa (de 8 a 12 ondas por segundo) en las áreas posteriores del cerebro (región occipital), que desaparece al abrir los ojos o con la ejecución de un proceso mental que requiera concentración. Esta actividad es conocida como ritmo alfa o ritmo Berger, ya que fue descrito por primera vez por el psiquiatra Hans Berger. En el resto de áreas cerebrales se ven ondas de baja amplitud de varias frecuencias.

A continuación se expone un glosario de las medidas más comúnmente utilizadas en el análisis espectral del EEG, para ayudar a entender el texto:

**TABLA 4:** Medidas utilizadas en el análisis espectral del EEG

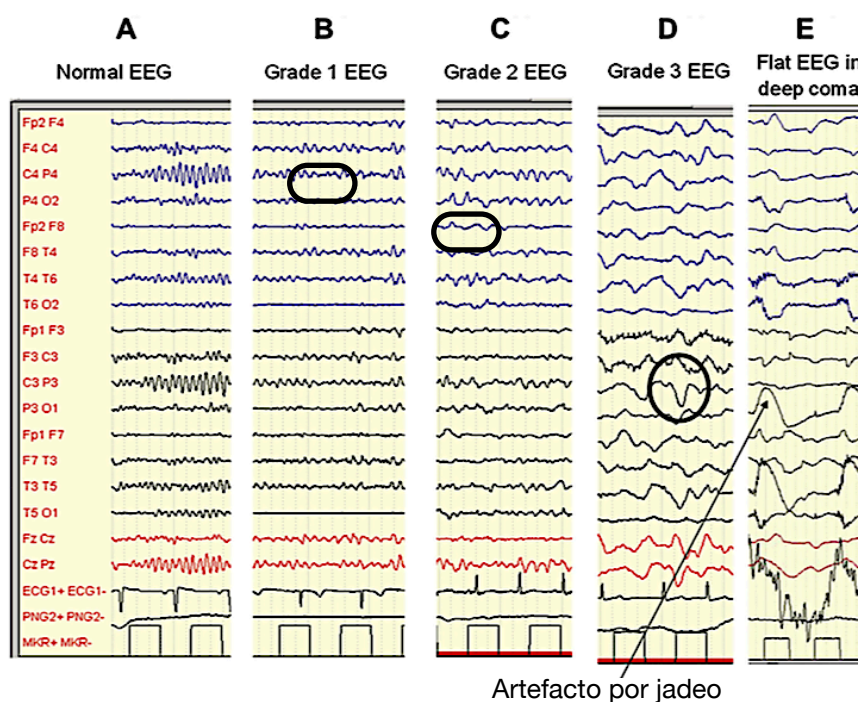
|   |   |
|---|---|
| <b>Potencia Total</b>   | $\sum (\text{Potencia } [f])$ $(1,0 \leq f < 27,0)$<br>donde f = frecuencia en intervalos de 0,5 Hz |
| <b>Frecuencia media dominante</b><br>(media ponderada de las frecuencias del EEG)     | $\sum (f \times \text{Potencia } [f]) / \text{Potencia total}$ $(1,0 \leq f < 27,0)$                |
| <b>Potencia delta relativa</b><br>(porcentaje de actividad en el rango de 1-4 Hz)     | $100 \times \sum (\text{Potencia } [f]) / \text{Potencia total}$ $(1,0 \leq f < 4,0)$               |
| <b>Potencia theta relativa</b><br>(porcentaje de actividad en el rango de 4-8,5 Hz)   | $100 \times \sum (\text{Potencia } [f]) / \text{Potencia total}$ $(4,0 \leq f < 8,5)$               |
| <b>Potencia alfa relativa</b><br>(porcentaje de actividad en el rango de 8,5-13,5 Hz) | $100 \times \sum (\text{Potencia } [f]) / \text{Potencia total}$ $(8,5 \leq f < 13,5)$              |
| <b>Potencia beta relativa</b><br>(porcentaje de actividad en el rango de 13,5-27 Hz)  | $100 \times \sum (\text{Potencia } [f]) / \text{Potencia total}$ $(13,5 \leq f < 27)$               |

**1.3.1.1 Alteraciones en el EEG en la Encefalopatía Hepática**

La EH conduce a alteraciones de las propiedades oscilatorias de redes neuronales (Götz et al., 2013) que se reflejan en cambios en el EEG. La sensibilidad diagnóstica del EEG varía del 43 al 100% para la EH clínica (Montagnese et al., 2004 y 2007) y del 8 al 40% en pacientes cirróticos sin alteraciones clínicas evidentes, aunque estos valores dependen de las técnicas de análisis utilizadas (Montagnese et al., 2004).

En los pacientes con EH la actividad rítmica básica disminuye progresivamente y la reactividad del EEG en vigilia con el cierre de los ojos se reduce y finalmente desaparece. En cuanto a la actividad transitoria, el cambio electrofisiológico más característico son las ondas trifásicas, que aparecen en el EEG de pacientes con EH severa en vigilia, sin embargo, estas ondas no son exclusivas de este tipo de encefalopatía.

El enlentecimiento inicial que se observa en el EEG no ocurre de forma global, si no que las primeras alteraciones se producen en las áreas occipitales posteriores. Esto se ve reflejado en el análisis cuantitativo del EEG que no detecta una disminución de la frecuencia media dominante pero si un incremento de la actividad theta en las áreas posteriores del cuero cabelludo (Amodio et al., 1999, and 2001; Marchetti et al., 2011; Van der Rijt et al., 1984).



**Figura 5:** Cambios en el EEG en la EH. De izquierda a derecha A) EEG normal; B) Grado 1 de EH: baja frecuencia, actividad alfa frontalizada con ondas theta aleatorias (remarcadas con círculo); C) Grado 2 de EH: actividad theta (4-7 Hz) predominante con ondas delta aleatorias (remarcadas en círculo); D) Grado 3 de EH: actividad delta-theta de alto voltaje con ondas trifásicas (remarcadas con círculos); E) Coma: el EEG tiende a ser plano (las ondas de alto voltaje que se observan son artefactos por jadeo). Imagen extraída y modificada de Amodio y Montagnese., (2014).

Se detectan dos tipos de actividad transitoria en el EEG en la EH, las ondas trifásicas y las ráfagas rítmicas intermitentes de actividad delta. La detección de esta actividad transitoria se observa más comúnmente en pacientes en grado 2-3 de EH, pero no se observan en el coma profundo. Las ondas trifásicas se describieron por primera vez por Bickford y Butt en 1955 como una característica de la EH, pero poco después observaron que también se expresaban en otras encefalopatías de origen metabólico o tóxico. Las ondas trifásicas son ondas de alto voltaje ( $>70 \mu\text{V}$ ), con orientación hacia abajo y precedidas y seguidas de ondas orientadas hacia arriba de amplitud relativamente baja. Tienden a ser difusas y bilaterales, con cierto grado de predominancia frontal. Tienden a repetirse periódicamente cada 1-2 s.

Se ha demostrado una asociación entre las ondas trifásicas y alteraciones en la sustancia blanca (Sutter et al., 2103 y 2014) y por tanto es posible que se relacionen con el edema de sustancia blanca. La aparición de ondas trifásicas es un marcador de severidad de EH y un marcador del riesgo de muerte (Sutter et al., 2103 y 2014).

Entre el 15 y 30% de los pacientes cirróticos que no muestran evidencias clínicas de HE presentan un aumento de la potencia relativa de la banda theta y una disminución de la frecuencia media dominante en las derivaciones de las regiones posteriores (Amodio et al., 1996 y 2001; Hartmann et al., 2000; Quero et al., 1996; Van Der Rijt et al., 1984). En ausencia de otras causas, se asume que las alteraciones que se observan en estos pacientes reflejan la presencia de EHM. De hecho, estas alteraciones a) se correlacionan de forma aproximada con la disfunción hepática, b) predicen el desarrollo de EH clínica y muerte por fallo hepático (Amodio et al., 2001) y c) aparecen o se incrementan con la administración oral de aminoácidos y la HA subsiguiente en pacientes con riesgo de EH (Kono et al., 1994).

### 1.3.1.2 Cambios menores en el EEG: implicaciones patológicas

El aumento de la amplitud de la actividad alfa en áreas centrales del cuero cabelludo es un signo neurofisiológico característico de la reducción de la vigilia en sujetos sanos (Kalauzi et al., 2012). Este fenómeno conocido como “anteriorización” de la actividad alfa es uno de los cambios más tempranos que se observan en el EEG en los pacientes cirróticos (Sagales et al., 1990; Montagnese et al., 2006).

Otra característica que se ha descrito en estados muy iniciales de la EH es el aumento de la actividad beta y su cambio topográfico desde áreas parieto-occipitales a áreas más centrales del cuero cabelludo (Parsons-Smith et al., 1957; Kullmann et al., 2001). Algunos estudios han sugerido que la desincronización del EEG y un bajo voltaje dominado por la actividad beta puede ser debido a características genéticas o a la expresión de ansiedad por el abuso de alcohol (Steinlein et al., 1992; Niedermeyer et al., 1999). Sin embargo, un estudio realizado por Amodio et al. en 2006, utilizando técnicas de análisis más reproducibles que las técnicas de análisis visual, demostraron una tendencia a que el bajo voltaje y una actividad beta alta



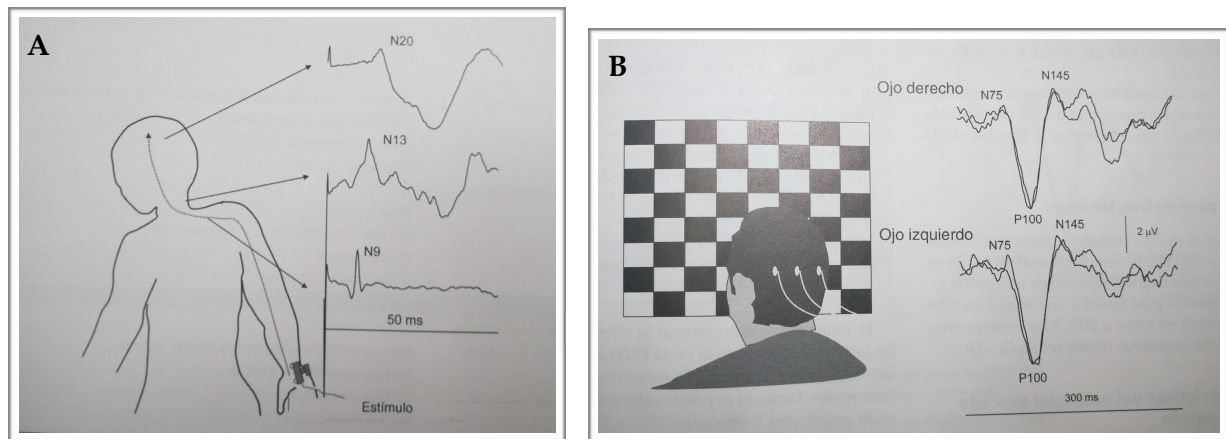
se asocie con un peor pronóstico y el desarrollo de episodios de EH independientemente del abuso de alcohol. El aumento del tono gabaérgico podría contribuir a los mecanismos patológicos de este signo electroencefalográfico; los compuestos tipo benzodiazepinas que aumentan su concentración en cerebro con la progresión de la enfermedad hepática crónica, pueden precipitar EH y aumentan la actividad EEG beta (Hotz et al., 2001). La flora intestinal está implicada en la formación de compuestos tipo benzodiazepina y el tratamiento con Rifaximina, un antibiótico bactericida de amplio espectro que no se absorbe a nivel gastrointestinal, disminuye los niveles de compuestos tipo benzodiazepinas y la actividad beta (Del Piccolo et al., 2003). Sin embargo, estos estudios son muy preliminares y se requieren más estudios para confirmar la relación entre el EEG en vigilia y la actividad beta en la EH. Por el contrario, en casos más severos de EH, la actividad beta disminuye (Amodio et al., 1999).

También se ha demostrado una asociación entre la disminución de la variabilidad o el aumento de la regularidad con la presencia y la severidad de la disfunción cerebral en pacientes con enfermedad hepática crónica (Olesen et al., 2016). La disminución de la variabilidad en los ritmos del EEG también se ha descrito en otras patologías como en la epilepsia, el deterioro cognitivo leve y el Alzheimer (Larson et al., 2005; Ueda et al., 2006 y Bonanni et al., 2008) y se ha asociado con el agravamiento de la enfermedad y un peor pronóstico (Goldberger et al., 2002). La disminución de la variabilidad de otros sistemas biológicos, como la variabilidad del ritmo cardíaco, también se ha descrito en la EH (Mani et al., 2009). No se conocen los mecanismos por los que disminuye la variabilidad del EEG en la EH pero los cambios en la variabilidad en el ritmo cardíaco en los pacientes con EH se han relacionado con la sobreproducción de citoquinas inflamatorias, lo que sugiere que la desregulación de la respuesta inflamatoria puede jugar un papel importante en los mecanismos patológicos de la enfermedad.

### 1.3.2 Potenciales evocados

Los PEs analizan las modificaciones de la actividad eléctrica cerebral inducidas por la aplicación de un estímulo sensorial. Los PEs tienen una amplitud muy baja, por lo que quedan enmascarados por la actividad electroencefalográfica basal y por los artefactos de registro. Para poder visualizarlos es necesario aplicar técnicas de registro y procesamiento de la señal especiales como la promediación. Los PEs están ligados en fase al estímulo, por lo que cuando se superponen varios segmentos de EEG post-estímulo y se alinean en función de su inicio, toda la actividad no ligada en fase con el estímulo desaparece y permanece sólo la actividad ligada al estímulo, es decir aquellas ondas que tienen la misma polaridad o fase a la misma latencia. Cuanto mayor es el número de promediaciones, mejor será la relación señal-ruido. La duración del registro dependerá del tipo de potencial que se quiera analizar (Cooper et al., 1980; Dawson GD 1951).

Los PEs se pueden clasificar en a) PEs sensoriales o exógenos (visuales, auditivos o somatosensoriales) b) PEs cognitivos o endógenos también llamados potenciales relacionados con eventos (ERPs, del inglés *Event Related Potentials*) y c) PEs motores. Los PEs exógenos representan la activación de la vía aferente sensorial hasta la corteza y son específicos de la modalidad del estímulo y de sus características físicas, mientras que los potenciales endógenos son el resultado del procesamiento sensorial tras su llegada a la corteza por las redes neuronales cognitivas y no dependen (al menos no de forma absoluta) ni de la modalidad del estímulo ni de las características físicas de éste, si no del paradigma cognitivo que los evoca. Los PEs cognitivos tienen por lo tanto unas latencias mayores que los sensoriales y por esa razón a veces son llamados PEs endógenos de latencia larga. Los potenciales motores al contrario que los anteriores, no se registran a nivel del cuero cabelludo, sino que son evocados a través del cuero cabelludo por la estimulación eléctrica o magnética de la corteza motora y registrados en el músculo correspondiente.



**Figura 6:** A) Esquema que muestra la técnica de obtención de los potenciales evocados somatosensoriales mediante la estimulación del nervio mediano en la muñeca y las principales ondas registradas a lo largo de la vía cordonal posterior hasta la corteza somestésica primaria. B) Esquema que muestra la forma de obtención de un potencial evocado visual (PEV), utilizando una pantalla de estimulación. A la derecha un PEV típico, la morfología general de las respuesta y las diferentes ondas. Destaca la onda P100 y la escasa variabilidad en la respuesta. Figuras extraídas y modificadas de Manual de Neurofisiología clínica, Iriarte y Artieda (2014).

Los componentes de los PEs sensoriales se detectan incluso cuando la actividad electroencefalográfica está marcadamente inhibida (EEG plano) en el coma severo. Al contrario que en el EEG, las latencias cortas de los PEs sensoriales no se ven demasiado influenciadas por las drogas (Bonhomme et al., 2004; Guerit., 1998), por lo que son buenas herramientas para la monitorización de pacientes con EH grado 4 que se encuentran sedados en las Unidades de Cuidados Intensivos.

Los PEs sensoriales y motores, permiten una buena estimación de la velocidad de transmisión a lo largo de las diferentes áreas del sistema nervioso, aportando información sobre el edema localizado o la disfunción de las vainas de mielina (Chu et al., 1988; Cordoba



et al., 2003; Oria et al., 2006; Yang et al., 1998), por lo que es razonable pensar que pueden reflejar algunos de los mecanismos que contribuyen a la EH.

Al contrario que los PEs sensoriales, los PE cognitivos requieren de paradigmas activos de estimulación cognitiva y la cooperación de los pacientes. Pueden poner de manifiesto disfunciones cerebrales tempranas (Weissenborn, et al., 1990) o proporcionar información sobre el proceso cognitivo (Mapelli et al., 2006).

### 1.3.2.1 Potenciales evocados auditivos

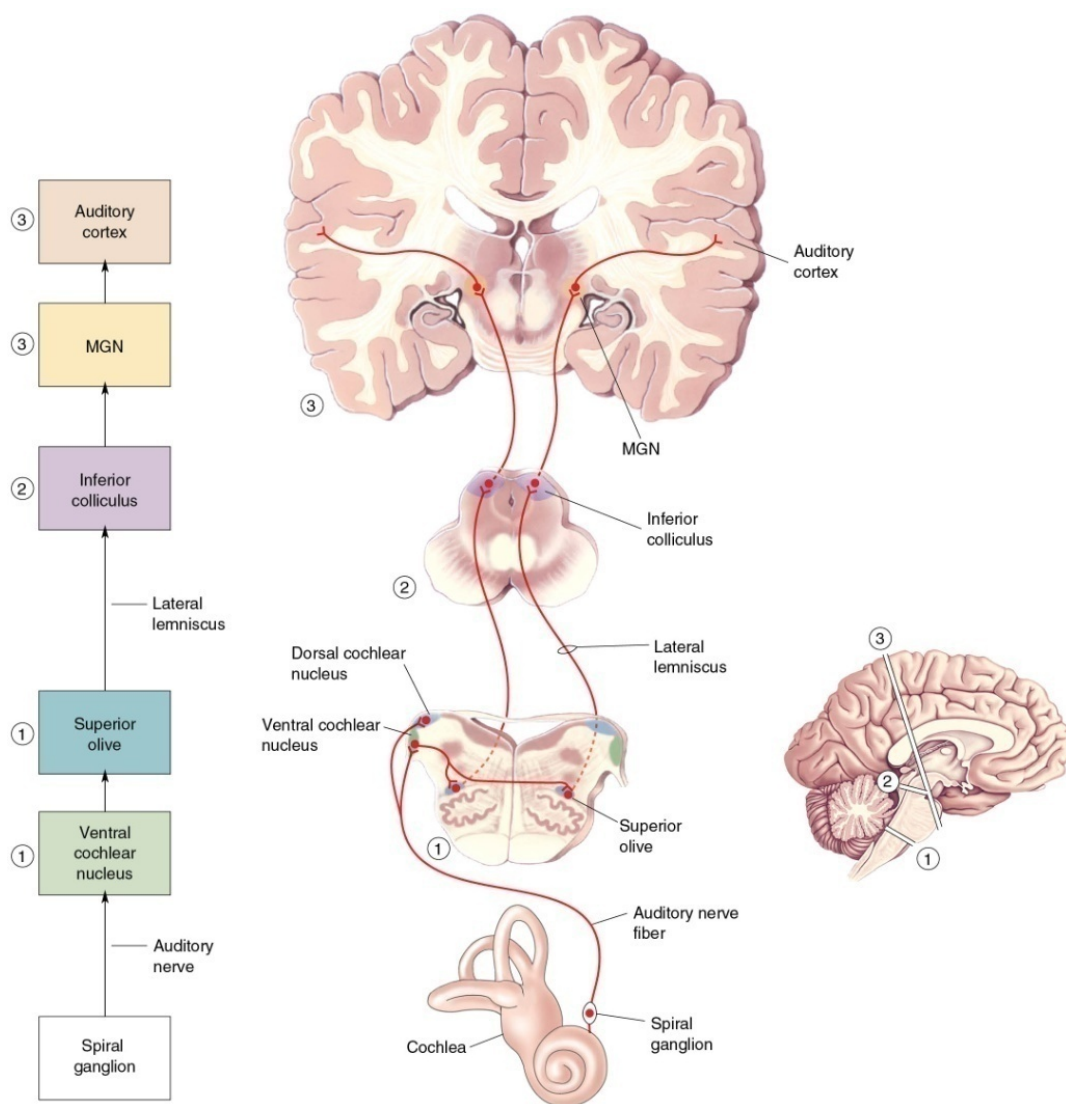
Gran parte de esta tesis se centra en el estudio del PE endógeno *Mismatch Negativity* (MMN) que se evoca mediante estimulación auditiva. Es por ello que hemos decidido hacer una revisión sobre de la fisiología de la vía auditiva y sobre los potenciales evocados de tipo auditivo un poco más extensa.

#### □ La vía ascendente auditiva

La vía ascendente auditiva es la ruta por la cual la información viaja desde el oído hasta la corteza cerebral. Empieza en el nervio auditivo (par craneal VIII, también conocido como nervio vestibulo-coclear). Todas las fibras del nervio auditivo entran en la médula, donde circunvolucionan antes de hacer sinapsis en las porciones dorsales o ventrales del núcleo coclear. Desde el núcleo coclear, las fibras pueden seguir una gran variedad de rutas hasta alcanzar el tronco del encéfalo. Algunas de estas vías son proyecciones directas hacia los núcleos auditivos centrales, mientras que otras tienen un curso más complejo, haciendo sinapsis en varios núcleos intermedios antes de llegar al cerebro anterior.

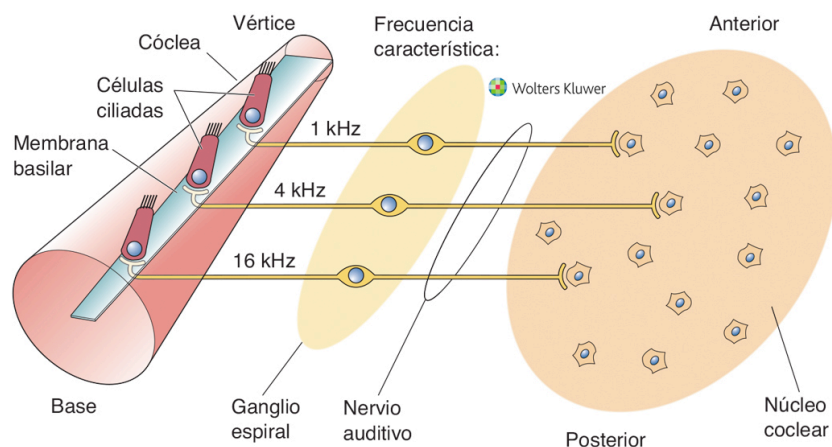
El primer núcleo auditivo, tras el núcleo coclear, son los núcleos del complejo oliva superior y el colículo inferior (CIC). El complejo de la oliva superior es un núcleo localizado en el tronco cerebral a nivel de la médula. Los CIC son estructuras localizadas en la superficie dorsal del mesencéfalo, inmediatamente posteriores al colículo superior. El CIC proyecta hacia el núcleo geniculado medial del tálamo, el cual proyecta a la corteza auditiva que se encuentra en el lóbulo superior temporal.

Una serie de vías principales conectan los núcleos del sistema auditivo. El lemnisco lateral es el principal tracto de fibras que transporta la información desde el núcleo coclear y el núcleo de la oliva superior al CIC. Dentro del lemnisco lateral hay un pequeño grupo de cuerpos celulares que forman el núcleo del lemnisco lateral. La vía desde el CIC al núcleo geniculado medial del tálamo se denomina brazo del CIC. Las proyecciones auditivas desde el núcleo geniculado medial hasta la corteza temporal forman las radiaciones auditivas.



**Figura 7:** Digrama de las principales vías auditivas (explicación en el texto). Figura extraída y modificada de Neurociencia. La exploración del cerebro. Bear, Connors y Paradiso (2016).

Además, los núcleos centrales auditivos y sus proyecciones forman un complejo sistema interrelacionado de procesamiento de la información auditiva. Dentro de cada componente hay una organización tonotópica, lo cual significa que las señales que se originan en regiones adyacentes de la cóclea permanecen juntas conforme viajan en el sistema auditivo. Así, la información frecuencial extraída en la células ciliadas se mantiene dentro del sistema nervioso central (Figura 8).



**Figura 8: Mapas tonotópicos de la membrana basilar y el núcleo coclear.** Desde la base al vértice de la cóclea, la membrana basilar resuena con frecuencias cada vez más bajas. Esta tonotopía se conserva en el nervio auditivo, a lo largo de diversos núcleos (en el dibujo sólo se representa el núcleo coclear) y hasta su destino final en la corteza auditiva. En este esquema se representan en el núcleo coclear bandas de neuronas con frecuencias características similares; las que aumentan progresivamente en sentido anteroposterior. Figura extraída y modificada de Neurociencia. La exploración del cerebro. Bear, Connors y Paradiso (2016).

### □ La vía descendente auditiva

Complementaria a la vía ascendente auditiva, que transporta la información desde la cóclea hasta la corteza, está el sistema de fibras descendentes que lleva la información en la dirección contraria. La vía descendente auditiva empieza en la corteza auditiva. Hay fibras eferentes que proyectan hacia el núcleo geniculado lateral del tálamo y hacia el CIC. Proyecciones descendentes menores conectan estas estructuras diencefálicas y mesencefálicas con el núcleo olivar y con el coclear. La vía final de este sistema conecta tanto el complejo de la oliva superior como el núcleo coclear con las células ciliadas de la cóclea, a través de fibras eferentes en el nervio auditivo.

Las vías ascendente y descendente discurren en paralelo. Esto permite que haya un extensa retroalimentación e interacción entre numerosos núcleos del sistema auditivo. Estos bucles neurales pueden variar en longitud y complejidad permitiendo un procesamiento complejo de la información auditiva a múltiples niveles (*Principles of Behavioural Neuroscience*. Beatty, 1995).

Como consecuencia del estímulo auditivo, cada grupo de neuronas estimuladas producen actividad eléctrica registrable, mediante técnicas de registro de PEs que, como hemos comentado anteriormente, se basan en la promediación de segmentos del EEG sincronizados con los estímulos. En esta parte haremos una revisión de los diferentes PEA, extendiéndonos un poco más en aquellos que se han utilizado tanto en la clínica como en la investigación de la EH. En los primeros milisegundos tras el estímulo aparecen los llamados potenciales exógenos, generados por la actividad neuronal en vías de paso obligatorias. Se distinguen los siguientes potenciales exógenos:

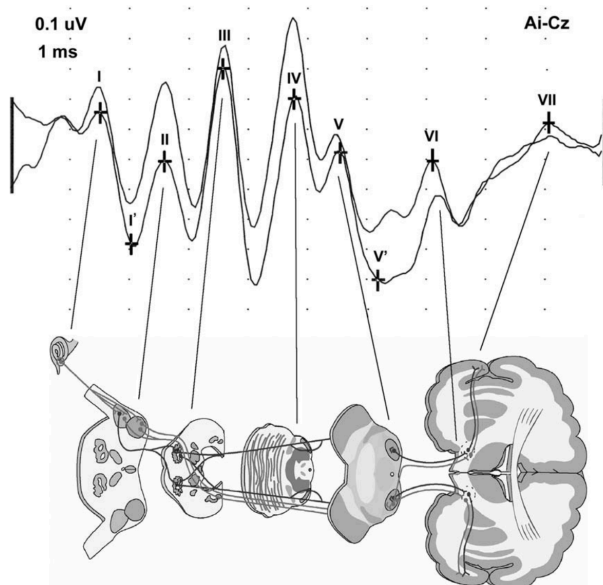
- **Potenciales evocados auditivos del tronco cerebral (PEATC) o en inglés *Brainstem Auditory Evoked Potential (BAEP)***: descritos por primera vez por Jewett y Williston en 1971, son un conjunto de 6 o 7 ondas de polaridad positiva en vértice que aparecen en un intervalo inferior a 10 ms tras la estimulación auditiva. Clásicamente se representan de menor a mayor latencia con números romanos. Su medición se utiliza en clínica para valorar la integridad de la vía auditiva del tronco del encéfalo y las hipoacusias. Se generan por estructuras que van desde el nervio auditivo hasta el tálamo (Manual de Neurofisiología Clínica, Iriarte y Artieda, 2014) (Figura 9).

Se ha demostrado que las latencias de los PEATC están aumentadas en diabetes, abuso de alcohol y deficiencia de tiamina, cuadros todos ellos típicamente presentes en los pacientes cirróticos (Begleiter et al., 1981; Fedele et al., 1984).

Chu et al., (1987) demostraron en un estudio realizado en diferentes tipos de enfermedad hepática un aumento en las latencias interpico I-V y I-III y en las latencias de los picos III, IV y V de los PEATC. Sin embargo, los aumentos sólo fueron significativos en pacientes con enfermedad de Wilson y enfermedad hepática por abuso de alcohol. La desmielinización del tronco del encéfalo y la pérdida neuronal correlacionan con alteraciones en PEATC en la enfermedad de Willson (Grimm et al., 1990 y 1992). Aunque la influencia del alcohol en las latencias de los PEATC se ha referido en muchos estudios, otros contradicen estas evidencias (Kabali et al., 2014). Por otro lado, Romero-Gomez et al., (2001) demostraron que los PEATC predicen el desarrollo de EH clínica y sugirieron una posible conexión entre la alteración de la neurotransmisión del tronco del encéfalo y la EH que podría estar mediada por la formación de un microedema. Kabali et al., (2014) demostraron una alteración progresiva en los PEATC conforme aumentaba el tiempo de la enfermedad, postulando como responsable del empeoramiento a la progresiva desmielinización o a una pérdida neuronal. Los PEATC también se han utilizado como medidas de pronóstico en ensayos de tratamientos clínicos de EH (Liu et al., 2004).

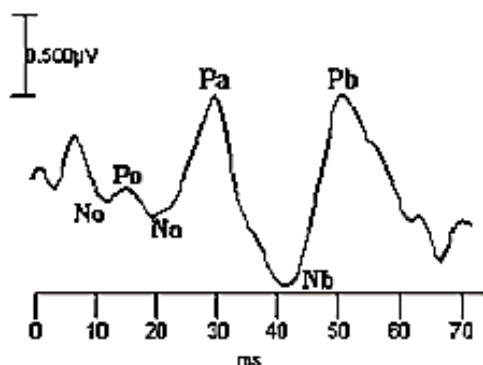
Actualmente el uso de los PEATC para evaluar la EH está muy cuestionado, ya que son muchos los factores pueden afectar a la neurotransmisión del tronco del encéfalo y muchos de éstos no están relacionados con la EH. Por el contrario, parecen útiles para

detectar y controlar la mielopatía hepática; sin embargo, la relación entre la mielopatía hepática y la HE no está clara. Es posible que la mielopatía hepática sea un factor de riesgo para HE o que ésta no tenga una relación directa con el síndrome (Mendoza et al., 1994; Sobukawa et al., 1994; Baccarani et al., 2010; Nardone et al., 2014; Weissenborn et al., 2014).



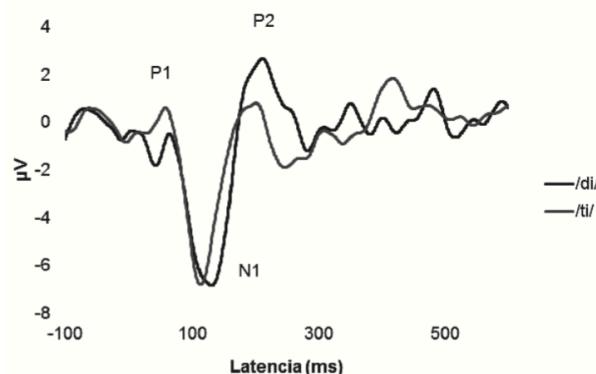
**Figura 9: Potenciales evocados auditivos del tronco cerebral normales.** La imagen resume las ondas registradas al aplicar el estímulo acústico, con sus respectivos generadores neurales. Onda I: órgano de Corti de la cóclea (porción distal del nervio auditivo); onda II: núcleo coclear (y porción proximal intracraneal del nervio auditivo); onda III: complejo olivar superior, cuerpo trapezoide; onda IV: núcleo ventral del lemnisco lateral; onda V: colículo inferior; onda VI: núcleo geniculado medial del tálamo; onda VII: radiaciones talamocorticales y córtex auditivo primario (de Heschl) o área 41 de Brodmann. Ai: lóbulo del pabellón auricular ipsilateral. Figura extraída y modificada de Moncho et al., 2013.

- **Potenciales evocados auditivos de latencia media (PEALM):** aparecen 10-70 ms después del estímulo auditivo. Forman una secuencia de ondas de polaridad alternante habitualmente denominadas: N0, P0, Na, Pa, Nb y Pb. Algunos autores emplean valores de sus latencias para su descripción. Los componentes Na, Pa y Nb son los más utilizados en clínica por su amplitud y estabilidad. Los neurogeneradores de los PEALM son corticales (probablemente córtex auditivo primario y circunvolución temporal superior) y subcorticales (áreas multimodales de las vías talamo-corticales) (Gurtubay., 2009). Tienen utilidad clínica principalmente en el estudio de las funciones auditivas centrales y como herramienta de neurodiagnóstico para la evaluación de estructuras dentro del sistema auditivo central como tálamo y corteza (Pratt y Lightfoot., 2012) (Figura 10).



**Figura 10: Potenciales evocados de latencia media (PEALM).** N0, P0, Na, Pa, Nb, Pb. Figura extraída y modificada de Cañete., (2014).

- **Potenciales evocados auditivos de latencia tardía o de corteza (PEACS):** se observan entre los 50 y 250 ms tras la presentación del estímulo auditivo. Entre los más estudiados están, en orden temporal, las respuestas P1 (pico positivo alrededor de los 50 ms), N1 (pico negativo alrededor de 100 ms) y P2 (pico positivo entre los 150-200 ms) (Pratt y Lightfoot., 2012). Son conocidos en clínica como el complejo P1-N1-P2. La P1 auditiva o P50 se genera principalmente en el plano temporal de la corteza auditiva primaria (Reite et al., 1988). N1 es el producto de varios generadores activos simultáneamente: corteza auditiva cortical supratemporal, lóbulo temporal y lóbulo frontal (Hegerl et al., 1993; Giard et al., 1994; Kropotov et al., 1995; Pantev et al., 1995; Tarkka et al., 1995). El componente P2 se atribuye a múltiples fuentes del área auditiva primaria y secundaria en la corteza (Hegerl et al., 1993; Tarkka et al., 1995; Okada et al., 1983; Onofrij et al., 1990; Pantev et al., 1996)(Figura 11). El complejo P1-N1-P2 se clasifica como un potencial exógeno, sin embargo esta clasificación no es del todo correcta ya que algunos de sus componentes pueden ser modulados por la atención del sujeto o incluso ser modificados por el entrenamiento, como los componentes N1 y P2 cuya amplitud aumenta cuando el sujeto dirige su atención hacia el estímulo. Del mismo modo el sueño produce cambios complejos en estas respuestas que dependen de la etapa en la cual son medidos (Eggermont et al., 2007). Se utilizan como técnica de apoyo en el diagnóstico y tratamiento audiológico (Cañete., 2014).



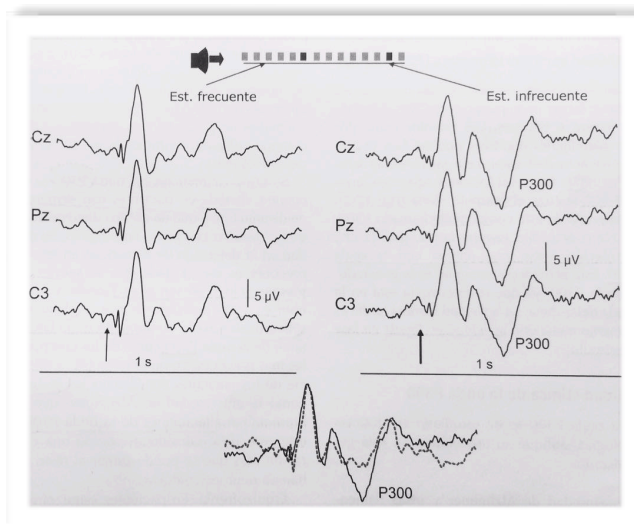
**Figura 11:** Complejo P1-N1-P2 evocado por dos estímulos del habla (/di/ y /ti/) en un adulto con audición dentro de rangos de normalidad. Figura extraída y modificada de Cañete., (2014).

A partir de un rango de latencias de 100-200 ms, la actividad eléctrica inducida por el estímulo auditivo ha recorrido las vías neuronales de paso obligatorio que generan los PE clásicos. Es entonces cuando en función del tipo de estímulo aplicado y la tarea cognitiva que se realice se activarán diferentes áreas corticales cuya actividad neuronal producirá diversos PEs. Englobados también dentro de los potenciales de latencia tardía se conocen como PE endógenos o cognitivos (MMN, P300, N400).



Los componentes endógenos de los potenciales evocados, a diferencia de los exógenos, se caracterizan por su independencia con las características físicas de los estímulos y de los parámetros de estimulación. Sin embargo, dependen de otros factores como son el estado del sujeto, la tarea que se esté realizando o el contenido informacional de los estímulos. Por tanto, se considera que los componentes endógenos se evocan cuando los estímulos presentados al sujeto activan alguna operación de procesamiento cerebral relacionada con el contenido informacional de los estímulos (Picton y Hillyard., 1988) y dado que son generados por la actividad de áreas neuronales relacionadas con el procesamiento cognitivo se ha propuesto que los componentes endógenos de los potenciales evocados podrían utilizarse como indicadores de procesos cognitivos subyacentes, como la memoria y la atención (Hillyard y Picton., 1987). Por lo tanto, también se utilizan para la valoración de alteraciones cerebrales asociadas a trastornos neurológicos y mentales. Entre los potenciales endógenos más estudiados destacamos:

- **P300:** la detección voluntaria de un estímulo infrecuente o diana, mezclado de forma aleatoria en una serie o secuencia de estímulos irrelevantes, habitualmente rítmicos, va a generar una onda positiva de gran amplitud denominada P300 o P3 tras los componentes exógenos N1-P2-N2. Esta onda se registra al promediar la actividad evocada por el estímulo diana o infrecuente.



**Figura 12: Onda P300 registrada en un voluntario sano.** El sujeto apretaba la tecla inmediatamente tras escuchar el estímulo (Est.) infrecuente. Se muestran los potenciales evocados por el estímulo frecuente (izquierda), infrecuente (derecha) y la superposición de ambos (debajo). Figura extraída de Manual de Neurofisiología Clínica, Iriarte y Artieda (2104).

La latencia de la onda P300 refleja el tiempo necesario para la categorización del estímulo y la amplitud refleja tanto la activación como la sincronización de las áreas corticales utilizadas para la ejecución de la tarea (Albert., 2000).

La amplitud de la onda P300 es mayor cuanto más difícil es la discriminación y cuanto más aleatorio e infrecuente es el estímulo diana (Polich., 1987). La latencia de P300 varía con la edad, disminuyendo progresivamente en la infancia hasta los 15-20 años. A partir de esta edad, aumenta progresivamente la latencia de la onda hasta la vejez (Barrett et al 1987; Picton et al 1984; Polich et al., 1985). Por otro lado, la latencia de la onda es muy variable intraindividualmente e interindividualmente ya que depende del nivel de atención o motivación del sujeto en el momento en el que se realiza la tarea. Para que se evoque correctamente la onda P300 el sujeto debe estar atento y despierto (Barrett et al., 1987).

La P300 consta de un componente temporofrontal o P3a y un componente temporoparietal que aparece más tardíamente. Los generadores fundamentales de la P300 son el surco temporal superior, el hipocampo, la corteza prefrontal ventrolateral y el surco intraparietal. Estas áreas que están interconectadas, interactúan con áreas relacionadas con la atención, como son las áreas prefrontales y relacionadas con procesos mnésicos como las áreas paralímbicas. Por otro lado, la actividad del circuito para la generación de P300 se coordina a través de proyecciones de los núcleos talámicos, los núcleos del rafe del troncoencéfalo, el *locus ceruleus* y el troncoencéfalo basal (Manual de Neurofisiología Clínica, Iriarte y Artieda).

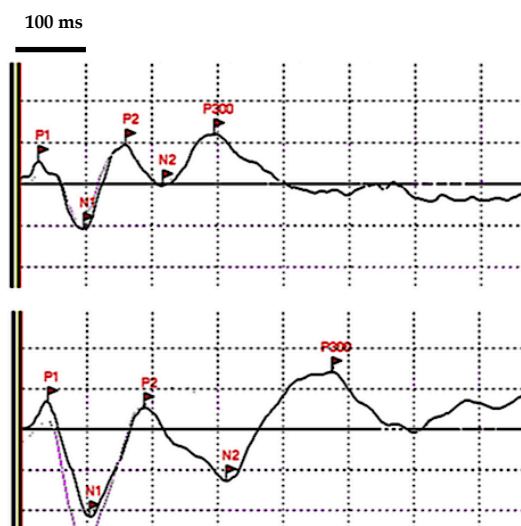
La P300 se ha estudiado en diferentes enfermedades, aunque su uso clínico no está implementado. El mayor número de estudios de la onda P300 se ha dirigido a demostrar su utilidad para el diagnóstico y el seguimiento de las demencias, especialmente para la enfermedad de Alzheimer (Muir et al., 1988; St Clair et al., 1988; Wright et al., 1978; Polich., 1989; Pokryszko-Dragan et al., 2003; Katada et al., 2004; Polich et al., 2005; Bonanni et al., 2010). Se han realizado numerosos estudios cognitivos para evocar la respuesta P300 en pacientes con esquizofrenia; muchos de ellos han descrito alteraciones en la amplitud pero la mayoría no reportan ningún cambio significativo en la latencia (Brecher et al 1987). Este grupo de pacientes tiende a tener respuestas menos correctas, tiempos de reacción más largos y una motivación frecuentemente reducida, variables todas ellas que afectan a cualquier PE inducido por una tarea. En estos estudios, también existe una gran superposición entre los grupos control y de pacientes (Morstyn et al., 1983).

Los estudios que intentaron diferenciar subtipos de demencia (Goodin y Aminoff., 1986) se encontraron también, como ocurre con los estudios en esquizofrenia, con el obstáculo de que los pacientes que producen respuestas incorrectas pueden alterar la latencia más que la patología subyacente. Además, encontraron una superposición de latencia significativa entre el grupo control y el grupo de pacientes, particularmente cuando la demencia era de tipo leve. También se ha utilizado en estudios en la dependencia al



alcohol y déficit de atención e hiperactividad infantil (Manual de Neurofisiología Clínica, Iriarte y Artieda, 2014).

La utilización de la latencia del PRE P300 se ha propuesto como una herramienta para detectar la EHM en varios estudios (Weissenborn et al., 1990; Kügler et al., 1994; Gallai et al., 1995; Kullmann et al., 1995; Saxena et al., 2001 y 2002; Amodio et al., 2005; ). Los datos actuales apoyan que la latencia de P300 es significativamente mayor en la EH en comparación con los sujetos sanos y por tanto, se considera que el tiempo necesario para la categorización del estímulo es mayor en este tipo de pacientes. Sin embargo, el valor diagnóstico del aumento de la latencia de P300 como marcador predictivo del riesgo de EH clínica y su relación con la función hepática es menor que el análisis espectral del EEG (Saxena et al., 2001; Amodio et al., 2005).



**Figura 13:** Potenciales evocados mediante un paradigma auditivo tipo *odball* en dos sujetos de la misma edad: sujeto sano (arriba) y paciente cirrótico con EHM (abajo). En el paradigma *odball* se presentan una serie de estímulos auditivos repetidos (estándar) intercalados con sonidos menos frecuentes (extraños). El sujeto debe reconocer como diana el estímulo infrecuente. La líneas marcadas con banderas representan la respuesta evocada por el estímulo extraño, las otras representan las respuestas evocadas por el estímulo normal. La componente P300 en el sujeto sano aparece alrededor de los 300 ms desde la presentación del estímulo extraño (3 cuadrados de 100 ms), en el paciente con EHM el pico de P300 está alrededor de los 480 ms. Resultados obtenidos mediante el equipo *Micromed EEG*. Figura extraída y modificada de Amodio P y Montagnese S., 20015.

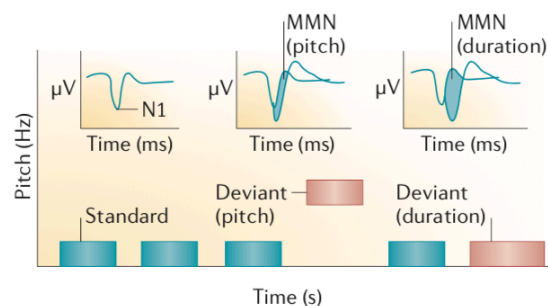
- **Onda N400:** se denomina así a la negatividad observada en potencial relacionado con eventos lingüísticos alrededor de 400 ms. Habitualmente el paradigma de estimulación que se utiliza para evocarlo consiste en la presentación de palabras, escritas o habladas, que son congruentes o no con el contexto de una frase previamente presentada al sujeto.

Para su visualización se realiza la promediación de los barridos tras las palabras congruentes y de los barridos tras las palabras incongruentes. Posteriormente se sustraen o se superponen para ver las diferencias provocadas por los dos estímulos. Se utiliza como herramienta para estudiar los mecanismos del lenguaje y completar el estudio de pacientes con afasias o lesiones focales corticales, especialmente de los lóbulos temporales.

- **Mismatch negativity (MMN) o potencial de disparidad:** este es el potencial endógeno que vamos a estudiar en esta tesis, por lo que lo explicaremos más detalladamente en las siguientes secciones.

### 1.3.2.2 Mismatch negativity

Cuando la monotonía de una estimulación auditiva repetida en el tiempo se interrumpe por un estímulo auditivo diferente a los precedentes, se produce un cambio en el PEA. En el llamado paradigma *odball* (ver figura 14), el estímulo diferente o extraño (usualmente denominado estímulo *deviant*) produce un PE similar al elicitado por el estímulo repetido (conocido como estándar) pero con un aumento del potencial negativo a los 100-200 ms de su presentación. En 1978 Näätänen et. al substrajeron el PE generado por los sonidos estándar al PE generado por el sonido *deviant*, de tal manera que los componentes exógenos se cancelaban pero se obtenía una onda diferencial a la que bautizaron como *mismatch negativity*.



**Figura 14: Paradigma *odball* y MMN.** En el paradigma auditivo *odball*, una secuencia de tonos estándar que se repiten (representados en color azul) se interrumpen de forma infrecuente e inesperadamente por un estímulo diferente o extraño físicamente (representados en color naranja). El estímulo extraño puede diferir de los estándares en cualquiera de un gran número de dimensiones físicas, incluyendo el tono, la duración, la intensidad, la localización o incluso en características abstractas como la omisión del estímulo. En este ejemplo, tanto el estímulo estándar como el extraño producen un potencial N1 que refleja la respuesta de la corteza auditiva a las propiedades físicas de cada estímulo por separado (componente exógeno). El estímulo extraño (estímulo con diferente tonalidad o duración) genera un potencial denominado *Mismatch Negativity* (MMN) que refleja una comparación entre los estímulos sucesivos y se calcula como la diferencia entre las respuestas al sonido extraño y al tono estándar (región sombreada en las ondas de la figura). Figura extraída y modificada de Javitt y Sweet., 2015.

Debido a su naturaleza automática, la onda MMN puede estar asociada con operaciones pre-atentivas en la audición, por esta razón, se ha sugerido que refleja una “inteligencia primitiva” en la corteza auditiva (Näätänen et al., 2001).

En general, cualquier ligera modificación en algún atributo físico de los estímulos extraños, en relación a los estímulos estándar, es suficiente para evocar MMN. Así, se han obtenido MMNs por ligeras variaciones en el tono (Näätänen et al., 1978; Sams et al., 1985b; Serra et al., 1996), la intensidad (Näätänen et al., 1989a), la duración (Näätänen et al., 1989b) o localización espacial del estímulo extraño (Paavilainen et al., 1989). También se evocan respuestas MMNs con cambios en el ritmo de presentación de los estímulos (Ford y Hillyard, 1981; Nordby et al., 1988) o utilizando sonidos más complejos como fonemas (Aaltonen et al., 1987; Sams et al., 1990) o patrones de sonido formados por varios segmentos sonoros consecutivos de diferente tono (Saarinen et al., 1992; Schroger et al., 1992).

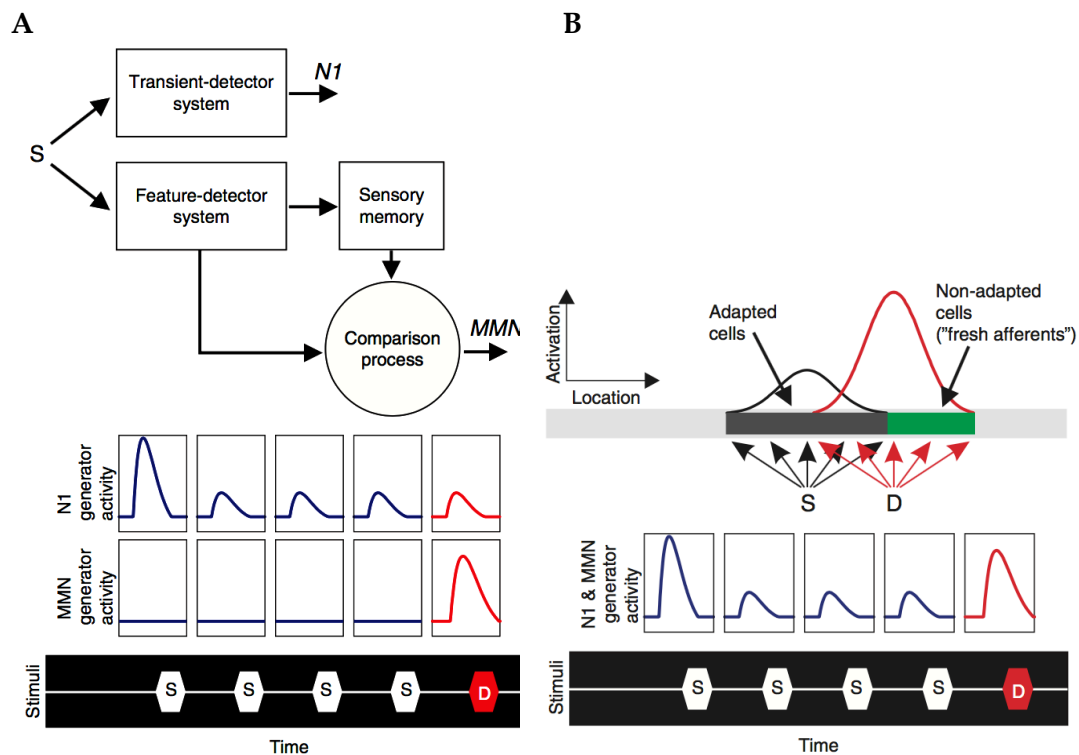
A diferencia del resto de PE endógenos, el MMN se obtiene independientemente de la atención del paciente (Näätänen, 1993). El hecho de que se pueda obtener sin ningún tipo de requerimiento atencional constituye la principal característica distintiva de este PE cognitivo y le proporciona indudables ventajas para ser aplicado en clínica, por ejemplo, en pacientes con bajo nivel de consciencia, coma, etc. El hecho de que el MMN sea independiente de la dirección de la atención del sujeto significa que cualquiera que sea la tarea que el sujeto realice durante la presentación de los estímulos utilizados, las características del MMN (trazado, amplitud y latencia del pico) no varía (Näätänen et al., 1993).

La generación de MMN se ha relacionado con la atención, la percepción auditiva, la discriminación automática de estímulos auditivos novedosos, la memoria sensorial, funciones todas ellas que a menudo se hallan afectadas en un amplio espectro de enfermedades neurológicas, neurodegenerativas o mentales (Näätänen y Alho., 1995). Por ejemplo, muchos estudios han demostrado la atenuación de las amplitudes de la onda MMN en pacientes con esquizofrenia (Oades, 1991; Shelley et al., 1991), enfermedad de Alzheimer (Pekkonen et al., 1994) y enfermedad de Parkinson (Pekkonen et al., 1995). También se han visto alterados otros parámetros de la onda como la reducción del área bajo la curva en pacientes con EHM (Felipo et al., 2012). Esto sugiere la utilidad de este PE endógeno para el diagnóstico y seguimiento de muchas enfermedades.

### ■ Mecanismo de la generación de MMN

Los mecanismos que subyacen al MMN hoy en día siguen en debate. Näätänen (1990,1992) sugirió que el MMN puede, en principio, explicarse de dos formas. Según el modelo basado en la memoria, el MMN refleja la operación de un mecanismo de memoria en la que la representación mnésica del ambiente es sometida a un proceso de comparación neural para detectar los cambios auditivos que se producen.

La explicación alternativa es el modelo adaptativo, en el que se sugiere que la respuesta diferencial entre los sonidos estándar y el sonido extraño es debida a un proceso de adaptación de la población neural que responde al sonido estándar, permitiendo a la población que responde al sonido extraño responder más fuertemente cuando el sonido extraño se presenta.



**Figura 15:** A) Modelo basado en la memoria B) Modelo adaptativo (Ver explicación en el texto). Figura extraída y modificada de May y Tiitinen., 2009.

En el modelo basado en la memoria (Figura 15 A), el estímulo es analizado por un sistema detector transitorio generador del potencial exógeno N1. Por separado, el sistema generador de MMN primero analiza las características del estímulo (frecuencia, intensidad, duración...) y el resultado se almacena en la memoria sensorial. A través de un proceso comparativo se comparan las características del estímulo entrante con la representación del estímulo anterior almacenado en la memoria sensorial y cuando los dos estímulos difieren, se genera la respuesta MMN. N1 y MMN se producen por generadores diferentes. El potencial N1 es más largo para el primer estándar y se va atenuando con la presentación repetida del sonido estándar. Por el contrario, el generador de MMN reacciona sólo cuando aparece el sonido extraño una vez se ha generado una huella mnésica del sonido estándar. Por eso no se produce ninguna respuesta MMN con el primer estándar.

En el modelo adaptativo (Figura 15 B), tanto los estándares como los sonidos extraños activan poblaciones neurales superpuestas. La repetición del estándar lleva a las células a una adaptación, produciendo una atenuación de su respuesta. Cuando se presenta el sonido extraño, las células que no se han adaptado (nuevos aferentes) contribuyen a un aumento de la respuesta. En este modelo, N1 y MMN son generados por la misma población neural y el MMN es en realidad una respuesta N1 aumentada.

Hipótesis más recientes basadas en la codificación predictiva de un cerebro organizado jerárquicamente y modelos de dinámica causal Bayesiana intentan cohesionar los dos puntos de vista anteriores (Friston., 2003 y 2005; Baldeweg et al., 2006; Winkler et al., 2007; Garrido et al., 2009). Llegados a este punto es importante que recalquemos la diferencia entre las percepciones, que son el producto de reconocer las causas de la entrada sensorial y la sensación per se. Según la hipótesis bayesiana del cerebro éste no conoce hechos sino probabilidades; nuestro cerebro debe evaluar cuál es la probabilidad de que algo que haya sucedido en el pasado esté ocurriendo justo ahora (Rao y Ballard., 1995). El cerebro sensorial infiere las causas de las entradas sensoriales a través de la codificación predictiva: la percepción se alcanza a través de la integración de la información sensorial procedente del ambiente que nos rodea y nuestras predicciones, basadas en la experiencia, sobre cual es la causa más probable de esa información sensorial. Este procesamiento sensorial implica tanto el ajuste de los modelos cuando ocurre un error en la predicción (para así codificar mejores predicciones) como la adaptación o aprendizaje perceptual con la exposición repetida a los estímulos (que codifica la precisión del error de predicción). Ambos procesos persiguen minimizar la energía libre del cerebro. Las respuestas corticales pueden ser vistas como el intento del cerebro de minimizar la energía libre inducida por un estímulo codificando su causa más probable y disminuyendo los errores en las predicciones (Friston 2005).

La hipótesis de la codificación predictiva introduce la noción de jerarquía cerebral y la distinción entre las aferencias ascendentes (bottom-up) y las predicciones descendentes (top-down). Partiendo de esta idea se asume que la percepción surge de un sistema neural organizado jerárquicamente que trabaja con probabilidades, en el que en cada nivel se comparan las predicciones de niveles superiores con la información que llega de áreas inferiores: las áreas corticales superiores intentan ajustar sus sustracciones o reconstrucciones del mundo con la información nueva que reciben y las áreas inferiores por otro lado, intentan encajar las predicciones de áreas corticales superiores con el input sensorial actual y por medio de conexiones aferentes enviar a las áreas superiores señales cuando ocurre un error en la predicción. Las áreas superiores e inferiores se comunican recíprocamente hasta llegar a la conciliación (Friston, 2003).

Esta forma de entender la generación del MMN se basa en elementos clave tanto de la hipótesis de ajuste del modelo como de la hipótesis de adaptación. Bajo la codificación predictiva, el error de predicción depende de la comparación entre el estímulo actual y una predicción basada en una memoria o modelo de estándares anteriores. Es este error en la predicción lo que causa el MMN y el consecuente reajuste del modelo a través de la

plasticidad asociativa. Sin embargo, con las presentaciones repetidas del mismo estímulo, se produce el aprendizaje sensorial y la fuerza de las conexiones que codifican esta regularidad también cambian para reducir la señal de error en la predicción. Esto implica cambios tanto en las conexiones extrínsecas como en las intrínsecas (Friston, 2008). La inferencia jerárquica descansa también en la optimización de la influencia relativa del error en la predicción (bottom-up) y de la predicción basada en las expectativas previas (top-down). Esto implica la optimización de la sensibilidad postsináptica de las unidades que se encargan de generar la señal de error en la predicción para codificar la precisión de este error (Friston, 2003). Cuando el error de predicción tiene una elevada varianza o poca precisión, las unidades de error de predicción se adaptan para que el error de predicción se atenúe. Dicho de otra manera, cuando un estímulo estándar puede ser predicho de una forma más precisa por los aferentes top-down, se asigna un menor peso a las influencias bottom-up y la reactividad postsináptica al input sensorial disminuye. La combinación de cambios en la eficacia sináptica y en la sensibilidad suprimen el error en la predicción con la exposición repetida de los estándares, produciendo una señal exuberante de error en la predicción cuando se presenta un sonido extraño (Garrido et al., 2009).

En resumen, la codificación predictiva requiere comparación, reajuste y adaptación. Así, el MMN reflejaría el error en la predicción que se explica por la reorganización dinámica de las neuronas durante la percepción y que se suprime con cambios en la eficacia sináptica durante el aprendizaje perceptual (Baldeweg, 2006; Friston, 2003).

### ■ Áreas implicadas en la generación de MMN

La respuesta MMN puede dividirse en dos fases: una temprana que ocurre a los 90-120 ms después del estímulo extraño y que se localiza bilateralmente en el giro temporal superior (Doeller et al., 2003) y una más tardía a los 140-170 ms después del estímulo extraño, que también se localiza bilateralmente, en el giro frontal inferior (Optiz et al., 2002). Como hemos comentado arriba, las fuentes de las áreas temporales podrían estar implicadas en procesos de la detección del cambio en las propiedades físicas del sonido mientras que las fuentes frontales podrían reflejar la reorientación de la atención hacia el sonido extraño (Giard et al., 1990; Rinne et al., 2000; Opitz et al., 2002; Doeller et al., 2003).

Estudios recientes han mostrado respuestas al desajuste auditivo con latencias menores que las observadas en MMN. Mediante RM funcional durante un paradigma *odball*, se han registrado mecanismos de detección de los desajustes auditivos en el núcleo geniculado medial y el CIC en humanos sanos. Estos resultados demuestran la existencia de múltiples detectores "mismatch" anidados en diferentes niveles a lo largo de la vía auditiva ascendente (Cacciaglia et al., 2015).

En animales, se han demostrado respuestas de mayor amplitud a los sonidos extraños respecto a los sonidos estándar (MMN) en distintos estudios (Astikainen et al., 2005 y 2006;



Csépe et al., 1987 y 1989; Javitt et al., 1992; Kraus et al., 1994; Ruusuvirta et al., 1996, 1998 y 2007; Umbricht et al., 2005) y se ha sugerido que las respuestas en ratas anestesiadas por cambios en el sonido ocurren de manera similar a los humanos, a través de procesos de comparación basados en la memoria (Astikainen et al., 2011). Estudios de MMN en animales también han localizado fuentes subcorticales de éste fenómeno. En ratas anestesiadas se ha demostrado la existencia de respuestas MMN en el hipocampo por lo que éste puede estar participando en la manifestación cortical del MMN (Ruusuvirta et al., 2013). Por otra parte, el MMN puede entenderse como una forma de memoria de trabajo ya que para su elicitación se requiere de la formación de una huella mnésica del patrón de sonidos estándar y por ello también se ha sugerido la implicación de la corteza prefrontal en su generación. De hecho, el papel del hipocampo y la corteza prefrontal, y la conectividad funcional entre ellos, se ha evidenciado en la memoria de trabajo espacial mediante estudios de lesiones en roedores, (Brito et al., 1982; Jay et al., 1991; Seamans et al., 1995; Floresco et al., 1997; Lee et al., 2003; Kellendonk et al., 2006). La conectividad anatómica entre estas regiones es unilateral; los eferentes del hipocampo inervan principalmente la corteza prefrontal medial ipsilateral (mPFC) (Conde et al., 1995; Churchwell et al., 2010). Además, se ha demostrado por estudios de lesiones en roedores que la proyección ipsilateral del hipocampo-mPFC es crucial para la función de memoria de trabajo espacial (Jay et al., 1995; Siapas et al., 2005).

### ■ Receptores implicados en la generación de MMN

Los receptores de glutamato del tipo NMDA juegan un papel crucial en la formación de memoria. Considerando la respuesta MMN como un índice de memoria de trabajo sensorial de la corteza cerebral (en el sentido en que este es capaz de retener de forma transitoria representaciones de las características físicas de los estímulos auditivos durante períodos cortos de 30 segundos) es lógico pensar que en la formación de la respuesta MMN están implicados los receptores NMDA. El error en la predicción que causa el MMN desencadena el subsiguiente ajustamiento del modelo de codificación predictiva de los sonidos a través de la inducción de plasticidad asociativa produciendo cambios en la fuerza de conexión (Garrido et al 2009). La plasticidad asociativa se ha sugerido que ocurre a través de receptores NMDA (Alonso et al., 1990). De hecho la inyección de antagonistas de receptores NMDA en monos inhibe la generación de la respuesta MMN en A1 (corteza auditiva primaria) sin alterar la generación de los componentes de los PE exógenos y de paso obligatorio (Javitt et al., 1996). En ratas se ha observado un bloqueo de la respuesta MMN dosis dependiente con el antagonista MK-801 (Tikhonravov et al., 2008).

Por otro lado, como hemos comentado anteriormente, los sujetos esquizofrénicos muestran déficits en la generación de MMN y se ha sugerido que alteraciones en la actividad de los receptores NMDA pueden estar contribuyendo a estos déficits (Baldeweg et al., 2004).

## ■ MMN y encefalopatía hepática

Se ha demostrado que pacientes con EHM presentan alteraciones en la generación de la respuesta MMN, en concreto una disminución del área bajo la curva del potencial, que se correlaciona con el deterioro en la atención evaluada con test psicométricos como el Stroop. Estos datos demuestran que el MMN es un buen procedimiento para diagnosticar, usando técnicas neurofisiológicas rutinarias, los déficit de atención en pacientes con EHM con buena sensibilidad y especificidad y también para evaluar su evolución pacientes con cirrosis hepática (Felipo et al., 2012). La búsqueda de biomarcadores electrofisiológicos para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades neurológicas está en auge. Además este tipo de técnicas nos permite elucidar mecanismos patológicos de la enfermedad que todavía están por descubrir. Decidimos estudiar el potencial endógeno MMN en ratas con HA crónica por las siguientes razones:

- ☑ Es un reflejo medible de procesos cognitivos superiores por lo que el estudio de sus mecanismos fisiológicos y patológicos, puede ayudar a que entendamos mejor los mecanismos implicados en la EHM.
- ☑ Es independiente del estado de atención del sujeto y la EHM se caracteriza por déficit de atención por lo que este déficit, que afectaría a otros tipos de PEs, no afecta al MMN.
- ☑ Es posible estudiar el potencial MMN tanto en los pacientes como en los modelos animales de EHM. Además, sus valores no se ven afectados por la anestesia lo que facilita el estudio en modelos animales.

La HA es el principal factor contribuyente a las alteraciones neurológicas en pacientes con EHM (Felipo, 2013). Los modelos animales de HA crónica reproducen la mayoría de las alteraciones neurológicas de esta enfermedad (Felipo, 2013). Por otro lado, se sabe que la alteración en la neurotransmisión mediada por el receptor NMDA es un importante contribuyente al deterioro cognitivo en modelos animales de EH (Monfort et al., 2002; Erceg et al., 2005; Rodrigo et al., 2007; Cauli et al., 2007; Monfort et al., 2009; El Milli et al., 2008 y 2010) por lo que su alteración a nivel de corteza y/o hipocampo podría estar contribuyendo a los déficits de atención y en la onda MMN en la EHM. El uso de este modelo animal nos permite estudiar con más profundidad los mecanismos fisiológicos de la generación de MMN y de sus alteraciones en hiperamonemia y EHM y evaluar la posible reversión de las alteraciones en MMN con el uso de tratamientos farmacológicos.



## 1.4 RESONANCIA MAGNÉTICA EN ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

### 1.4.1 Introducción general de las técnicas de neuroimagen

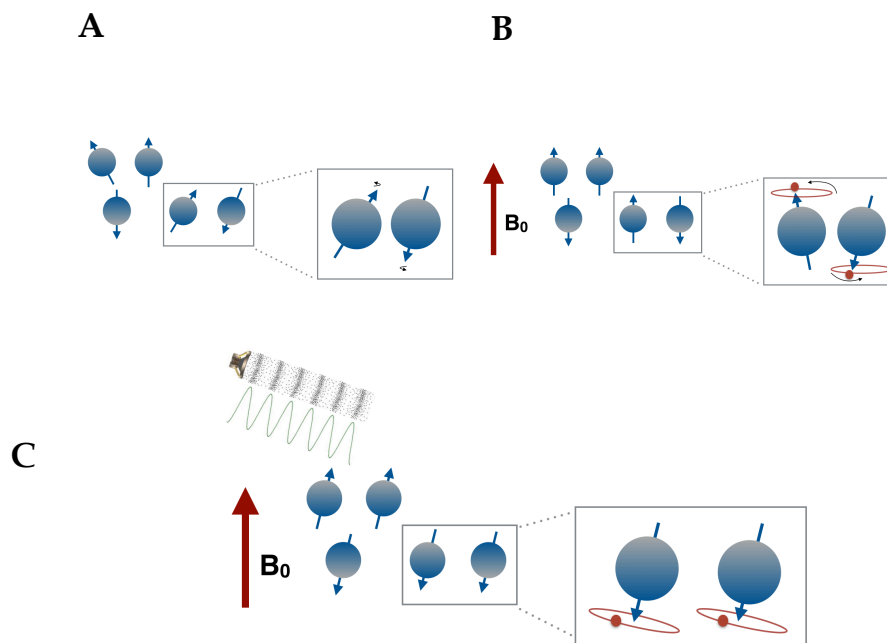
Las técnicas de neuroimagen han ido desarrollándose ampliamente en los últimos años y se han convertido en una herramienta potente para investigar los mecanismos patológicos de las diferentes etapas de la EH. En esta parte de la tesis hacemos una breve introducción de las técnicas de neuroimagen que se han utilizado para estudiar las alteraciones estructurales (tanto en sustancia blanca como en sustancia gris) y funcionales en pacientes con EH.

#### ■ Resonancia magnética estructural

La imagen por RM se basa en un fenómeno físico relativamente complejo, denominado RM nuclear. Sin entrar en detalles, podemos decir que es un fenómeno por el cual determinados núcleos atómicos pueden absorber y emitir energía electromagnética de una frecuencia muy precisa (resonancia) cuando se someten a un fuerte campo magnético. Aunque hay varios elementos de interés biológico cuyos núcleos presentan el fenómeno de RM (hidrógeno, fósforo, sodio, carbono, etc.), la mayoría de los sistemas de imagen trabajan sobre el núcleo de hidrógeno, ya que es el núcleo más común en el cuerpo humano. La unidad de medida de los campos magnéticos es el Tesla (un Tesla es igual a 10000 Gauss) y la intensidad de estos campos magnéticos en estudios humanos es de 0,5 a 9,4 T.

Para generar una imagen de RM es necesario colocar la muestra en el seno de un potente campo magnético constante, habitualmente producido por un electroimán superconductor refrigerado con helio líquido. En ausencia de un campo magnético externo, los protones de la muestra giran sobre su eje dentro del núcleo, es decir, poseen un spin y se orientan aleatoriamente (Figura 16A). Cuando se expone a un campo magnético externo fuerte ( $B_0$ ), los protones se alinean con éste. Pueden alinearse en la dirección de  $B_0$  (paralela) o en la dirección opuesta (antiparalela), encontrándose en diferentes niveles de energía (E), siendo el de menor E el de los protones que se encuentran orientados paralelamente a  $B_0$  (Figura 16B). Cuando los protones están bajo la influencia de  $B_0$  dejan de girar sobre su propio eje y empiezan a precesar alrededor del eje de  $B_0$ . La frecuencia de precesión depende de la fuerza del campo magnético (cuanto mayor sea la fuerza de  $B_0$  mayor será la velocidad de precesión) y es característica de cada sustancia. Ante esta situación podemos decir que los protones han sufrido una magnetización longitudinal al campo magnético externo. No se puede cuantificar la magnetización de los protones en este sentido porque la fuerza del campo externo es tan grande que no permite apreciar la magnetización de

los protones. Un ejemplo típico que se utiliza para explicar esta situación es imaginarnos que estamos derramando agua de una manguera a un río, como el río es mucho más caudaloso que el flujo de la manguera, no podemos cuantificar cuánta agua estamos derramando, sin embargo si desviamos el flujo de la manguera a la orilla, ya podemos cuantificar el agua derramada por la manguera. Es por ello que debemos desplazar la magnetización del plano longitudinal al transversal para poder cuantificarla. Esto se consigue con la aplicación de pulsos de radiofrecuencia. Cuando se aplica en estas condiciones un pulso de radiofrecuencia de la misma frecuencia que la frecuencia de precesión de los núcleos investigados, éstos se alinearán en una mayor proporción en contra del flujo magnético principal, desplazarán su vector de fuerza magnética transversalmente al eje del  $B_0$  y comenzarán a precesar en fase, es decir, sincrónicamente en un fenómeno que se conoce como acoplamiento spin-spin entre núcleos próximos (Figura 16C). Con la interrupción del pulso, por un lado, los núcleos perderán la fase de precesión y por otro, volverán a su alineamiento original con las líneas del campo inductor, lo que liberará energía también en pulsos de radiofrecuencia que son captados por una antena o bobina y transformados en imágenes. Al fenómeno de realineación con el eje Z se le denomina relajación longitudinal, térmica o T1 y al fenómeno de pérdida de energética en el plano XY se le denomina relajación transversal o T2, relacionada principalmente con la pérdida de fase de los núcleos.



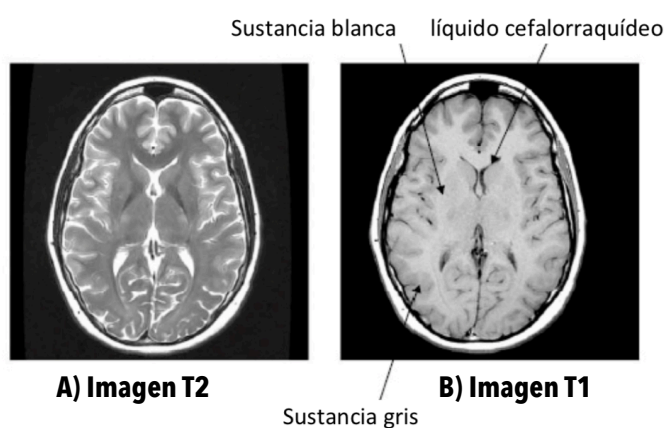
**Figura 16:** A) Protones alienados aleatoriamente sin la influencia de un campo magnético externo y girando sobre su propio eje ( $B_0$ ). B) Protones bajo la influencia de un  $B_0$ , orientados en la dirección del campo magnético externo y precesando alrededor de éste. C) Protones bajo la influencia del  $B_0$  y una onda de radiofrecuencia, precesando en fase y desplazados del eje de  $B_0$ .

Las diferencias químicas en los entornos moleculares de esos núcleos resonantes, así como la abundancia de los mismos, constituyen la base del contraste de la imagen. Sin embargo, en función de la secuencia de impulsos electromagnéticos aplicados a la muestra, es posible obtener imágenes muy variadas que pueden representar muy diferentes propiedades del tejido.

La localización espacial de los tejidos en una imagen de RM se establece en unidades llamadas vóxeles. Un vóxel es una unidad de volumen, y su tamaño determinará la resolución espacial de las imágenes de RM. Así por ejemplo, cuanto más pequeño sea el tamaño de los vóxeles que componen una imagen, mayor será la probabilidad de delimitar regiones cerebrales pequeñas. Sin embargo, la imagen de RM no es una medida absoluta de la señal emitida por el tejido, sino una señal de contraste entre la señal emitida por el tejido y el ruido producido por el método de medida (la relación señal-ruido). El ruido aumenta con vóxeles pequeños, es decir, la relación señal-ruido es mayor cuanto mayor es el tamaño del vóxel, lo que explica la no utilización de vóxeles con una resolución elevada.

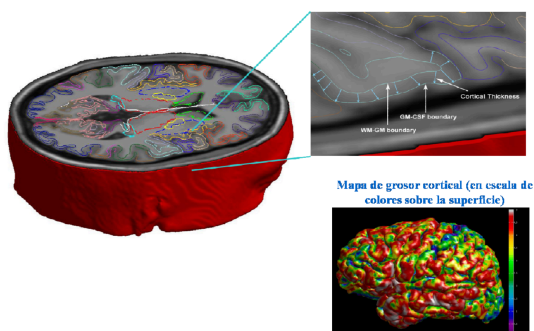
En resumen, estos principios nos permiten obtener imágenes de la estructura del cerebro, RM estructural, aportando información estructural de la anatomía cerebral. A continuación, describimos diferentes tipos de adquisición y análisis de imágenes estructurales detallando brevemente la información que nos aportan para ayudar a la lectura de la tesis:

- **Imágenes ponderadas en T1 y T2:** Las imágenes de RM ponderadas en los tiempos T1 y T2 son las más empleadas actualmente para obtener información estructural del cerebro humano. Los tiempos T1 y T2 son muy diferentes en los diferentes tipos de tejidos, por lo que brindan un buen contraste para producir imágenes de los diferentes tejidos del cuerpo humano. En la imagen tipo T1, los tejidos de sustancia blanca y gris se observan en color blanco y gris, respectivamente. Las lesiones de sustancia blanca aparecerán de color oscuro (hipotensas). Por el contrario, las imágenes ponderadas en T2 los tejidos de sustancia blanca aparecen de color gris y las de sustancia gris en color blanco. Las lesiones de sustancia blanca en estas imágenes aparecerán de color blanco (hiperintensas) (Figura 17).



**Figura 17:** Imágenes de resonancia magnética A) ponderadas en tiempo T2 B) ponderadas en tiempo T1

- **Contraste de transferencia por magnetización:** otro tipo de imagen popular para caracterizar las propiedades morfológicas de los tejidos es la RM ponderada en la transferencia de magnetización de protones. La disminución de la señal es mayor cuanto mayor es la concentración de moléculas de agua.
- **Voxel-based morphometry (VBM):** las imágenes de RM estructural pueden dividirse en múltiples vóxels. Los estudios volumétricos del cerebro completo vóxel a vóxel, o *voxel-based morphometry*, es una de las opciones existentes para identificar y caracterizar diferencias en el volumen de los diferentes tejidos cerebrales en las poblaciones. La medida anatómica más utilizada es la densidad de sustancia gris.
- **Tensor de difusión:** la técnica de resonancia magnética por difusión (IRMD) es una modalidad de neuroimagen que proporciona mapas cuantitativos de la organización micro-estructural de los tejidos. Esta técnica utiliza el movimiento natural de las moléculas de agua para revelar la estructura de los tejidos cerebrales. La técnica del tensor de difusión es una variante de IRMD que se emplea para modelar los desplazamientos de las moléculas de agua en la sustancia blanca del cerebro. A partir del tensor de difusión se pueden obtener dos descriptores muy importantes de la morfología de los tejidos: 1) la orientación media de los haces de fibras nerviosas en cada vóxel y 2) parámetros relacionados al grado de empaquetamiento, mielinización, densidad y grosor de los tractos. Las dos métricas más empleadas son la fracción de anisotropía (relacionada a parámetros morfológicos como la densidad de las fibras, el diámetro axonal, grado de mielinización de la sustancia blanca) y la difusión media (sensible a la presencia de obstáculos, útil para detectar cambios estructurales en la sustancia gris del cerebro).
- **Análisis del grosor cortical:** el espesor de la corteza se define por la distancia entre el límite inferior y el exterior del tejido de sustancia gris cortical. El límite inferior se define por la capa o superficie donde se interceptan los tejidos de sustancia blanca y gris, mientras que el límite exterior se define por la superficie pial (Figura 18)



**Figura 18:** En la parte superior se muestran las superficies usadas para calcular el grosor cortical y en la parte inferior se muestra en escala de colores los valores del grosor cortical calculados en cada punto de la corteza de un sujeto sano. Figura extraída del Curso de Técnicas de Neuroimagen Avanzada FDI-MAG.

Esta técnica nos permite analizar las diferencias de volumen existentes en la corteza y si estas diferencias son debidas a cambios en área de la superficie o al grosor de la corteza.

## ■ Resonancia magnética funcional

Como hemos dicho antes, con la RM estructural podemos estudiar cambios anatómicos en el cerebro. Por otro lado, con la RM funcional podemos estudiar cambios funcionales del cerebro en el tiempo, es decir, el funcionamiento cerebral.

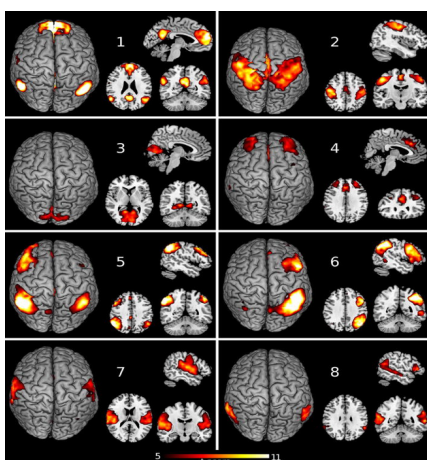
La característica principal que diferencia la RM funcional de la RM estructural es la introducción de la variable resolución temporal. La resolución temporal determina la velocidad con la que se registran los cambios fisiológicos relacionados con el funcionamiento cerebral y depende de la tasa de muestreo, es decir de la frecuencia con la que una medida es realizada en el tiempo. La tasa de muestreo en RM funcional suele oscilar entre 2 y 4 segundos y se mantiene constante a lo largo de todo el proceso de adquisición (TR, tiempo de repetición entre pulsos de excitación).

Los cambios fisiológicos relacionados con cambios en el funcionamiento cerebral medidos en RM funcional son cambios en la cantidad de desoxihemoglobina (dHb) en sangre, es decir, hemoglobina (Hb) sin oxigenar (Huettel S.A et al., 2004). Así los cambios funcionales en el cerebro en una determinada región, se reflejan en cambios en la oxigenación de la sangre relacionados con la actividad neuronal. La Hb ligada al oxígeno (oxihemoglobina) es diamagnética y la dHb paramagnética, por lo que la Hb generará más señal de resonancia y la dHb generará una señal reducida. Los cambios en concentración de dHb en relación a la Hb son los que generan el contraste en términos de señal adquirido en las secuencias de RM funcional, denominado contraste Dependiente del Nivel de Oxigenación de la Sangre (en inglés, *Blood Oxigenation Level Dependent contrast* o *BOLD contrast*). En consecuencia, la señal obtenida en resonancia es un contraste producido por la reducción de la señal en aquellas áreas donde hay un aumento de la dHb, es decir, aquellas áreas donde se produce una activación neuronal, produciendo una disminución de la señal.

La señal obtenida en RM funcional debida al consumo metabólico de oxígeno es denominada respuesta hemodinámica (HDR= *Hemodynamic Response*). La respuesta neuronal se produce en milisegundos, sin embargo los primeros cambios hemodinámicos no se observan hasta 1 o 2 segundos después. La HDR comienza con una reducción de la señal producida por el aumento de dHb durante 1 o 2 segundos. Posteriormente la demanda de oxígeno genera una regulación del flujo sanguíneo cerebral que aumenta la concentración de Hb. El incremento de Hb no es proporcional al consumo de oxígeno neuronal, por lo que se produce una reducción del ratio dHb/Hb, que es el contraste necesario para obtener una señal medible. Resumiendo, en RM funcional estudiamos la medida o variable dependiente HDR cerebral que representa

cambios en las intensidades de la señal debido a las propiedades magnéticas de la Hb. La unidad de medida es el vóxel de tres dimensiones por ser una medida de volumen a la que se le añade una cuarta dimensión, el tiempo.

Las medidas derivadas de la RM funcional permiten calcular la actividad cerebral durante la realización de una tarea comparando la actividad regional detectada en la situación de tarea (o situación experimental) con una situación de reposo o control. Las tareas seleccionadas se relacionan con áreas específicas del cerebro permitiendo examinar su funcionalidad. Este tipo de paradigmas experimentales requieren de la colaboración del paciente por lo que son adecuadas únicamente para pacientes con grado leve de EH. Otro de los paradigmas de RM funcional que se utiliza en la investigación de la EH es la observación de la funcionalidad del cerebro sin realizar ninguna tarea cognitiva o lo que es lo mismo, en estado de reposo. Esta modalidad tiene una implementación sencilla y adecuada a todo tipo de pacientes de EH puesto que no requiere su colaboración, permitiendo tener resultados reproducibles y fiables (Fox y Greicius et al., 2010). Estos estudios se basan en el hecho de que existen fluctuaciones espontáneas de baja frecuencia (<0,1 Hz) de la señal BOLD, denominados patrones de actividad espontánea. Estos patrones de actividad espontánea detectados a lo largo del tiempo en el cerebro en reposo pueden ser correlacionados entre las diferentes regiones cerebrales. Las regiones con patrones de oscilación similares forman redes de regiones interconectadas, y la activación de estas redes (y no únicamente la activación de regiones aisladas) se considera subyacente a diferentes procesos sensoriomotores, cognitivos y emocionales. Las redes neuronales del estado de reposo más comúnmente descritas en la literatura son: el circuito de activación por defecto (DFM del inglés *Default Mode Network*), la red sensitivo motora, la red de control ejecutivo, la red visual, las redes lateralizadas frontoparietales, la red auditiva y la red temporo-parietal (Rosazza y Minati., 2011) (Figura 19).



**Figura 19:** Mapas espaciales de las principales redes neuronales en estado de reposo. Los análisis se generaron a partir de las imágenes durante el estado de reposo cerebral de 40 sujetos sanos. Se representan los componentes de estado de reposo más comúnmente descritos en la literatura: 1) Default Mode Network; 2) Componente sensitivo-motor; 3) Componente del control ejecutivo; 4) Componente visual; 5) y 6) Componentes lateralizados fronto-parietales; 7) Componente auditivo; 8) Componente temporoparietal. Figura extraída y modificada de Rosazza y Minati., 2011.



Existen diferentes algoritmos para el análisis de la conectividad funcional en el estado de reposo (CF-er), haremos una breve descripción de los más utilizados (Proal et al., 2011). Los dos primeros son los que hemos utilizado en esta tesis:

- **Conectividad funcional basada en vóxel-semilla:** Este método de análisis de la conectividad funcional está basado en la correlación lineal de Pearson entre las series temporales de una región de interés o región semilla que seleccionamos en base a una hipótesis a priori, y las series temporales de cada vóxel en el cerebro entero o una máscara predefinida (región predefinida). Se obtiene como resultado un mapa de correlación. Por tanto, éste se basa en dos pasos: 1) extracción de las series temporales que existen en la semilla y 2) cuantificar la similitud de las series temporales extraídas en la semilla con las de otros vóxels. Finalmente, los coeficientes de correlación son transformados para que sigan una distribución normal y así poder realizar análisis de grupo, esto se realiza mediante la Transformación Z de Fisher la cual asocia cada medida de correlación  $p$  con su  $z$  correspondiente.
- **Análisis de componentes independiente (ICA del inglés *Independent Component Analysis*):** El ICA asume que el cerebro está organizado en un número de redes funcionales discretas. Se trata de un análisis multivariante que, a partir de un conjunto de variables observadas, tiene como objetivo básico generar nuevas variables (no observadas) que sean independientes entre ellas con total desconocimiento de la mezcla. Este método se denomina separación ciega de fuentes y proporcionará las componentes independientes en las que se pueden identificar los patrones espacio-temporales correspondientes a las redes funcionales descritas en la literatura, así como también las componentes ruido.
- **Homogeneidad regional (ReHo del inglés *regional homogeneity*):** mide el grado de de homogeneidad de una región cerebral en cuanto a las fluctuaciones de la actividad BOLD durante el reposo. Tal grado de homogeneidad se refiere a la sincronización local de voxels dentro de un área específica del cerebro, teniendo en cuenta el coeficiente de concordancia de Kendall, el cual mide la correlación de la serie temporal de un vóxel con sus vecinos más cercanos, basado en la asunción de que la actividad significativa del cerebro es más probable que ocurra por grupos de voxels que en un solo vóxel.
- **Amplitud de las fluctuaciones de baja frecuencia (ALFF del inglés *amplitude of low frequency fluctuations*):** La magnitud relativa de las fluctuaciones espontáneas en el estado de reposo puede ser diferente entre regiones cerebrales y entre sujetos. Este análisis fue desarrollado por Zan et al., (2007) y puede actuar como un marcador de diferencias individuales o disfunción en la conectividad funcional. Los mecanismos biológicos exactos por los que se producen los cambios en las

fluctuaciones de baja frecuencia de la señal BOLD se desconocen pero se asocian con la actividad neuronal. Este algoritmo, a diferencia de los otros mencionados, permite reflejar la intensidad de la actividad espontánea.

- **Teoría de grafos:** El cerebro puede ser modelado como una red de nodos enlazados. Los nodos representan las distintas regiones cerebrales en base a criterios estructurales o funcionales y los enlaces se basan en la propia conectividad cerebral (van den Heuvel et al., 2010). Los cambios en la topología de las redes (número de nodos, número de conexiones, número de conexiones y nodos necesarios para pasar de un nodo a otro nodo concreto...) reflejan cambios en la conectividad funcional.

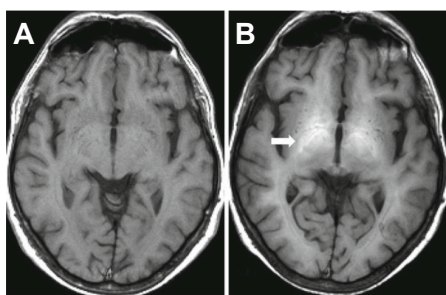
#### 1.4.2 Antecedentes previos de neuroimagen en encefalopatía hepática

##### Estudios de RM estructural:

- Señales intensas en las imágenes T1 y T2

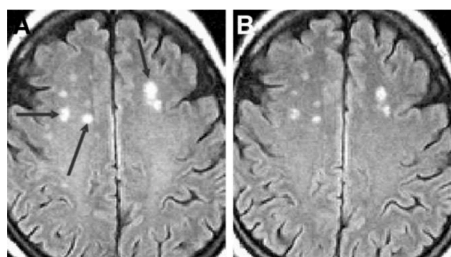
Varios estudios de RM estructural de imágenes ponderadas en T1 han descrito que la mayoría de los pacientes con cirrosis presentan de forma bilateral y simétrica señales hiperintensas en el globo pálido y la sustancia negra (Pujol et al., 1993) que revierten lentamente con la normalización de la función hepática (Krieger et al., 1997; Naegle et al., 2000) (Figura 20). Una posible explicación a la aparición de estas señales hiperintensas es la acumulación de manganeso (Saphet et al., 1996) debido al mal funcionamiento del hígado. Los ganglios basales son tejidos especialmente sensibles a la acumulación de este metal porque presentan transportadores específicos de manganeso necesarios para el metabolismo de ciertas enzimas constitutivas de esta región como la superóxido dismutasa mitocondrial y la glutamina sintetasa (Bentle y Ladry, 1976; Stalling et al., 1991). Sin embargo, las lesiones del globo pálido evidenciadas con estas hiperintensidades no se relacionan con la sintomatología de la EH (Córdoba et al., 2001a y 2001b; Naegle et al., 2000). Sólo los pacientes cirróticos con síntomas parkinsonianos tienen hiperintensidades más extensas que se relacionan con los síntomas motores. El valor clínico de la utilización de las imágenes de RM ponderadas en T1 para el diagnóstico de la EH todavía no se ha evaluado, sin embargo se ha propuesto que la ausencia de hiperintensidades de señal puede servir para descartar que las manifestaciones neurológicas sean consecuencia del fallo hepático (Córdoba J, 2011).



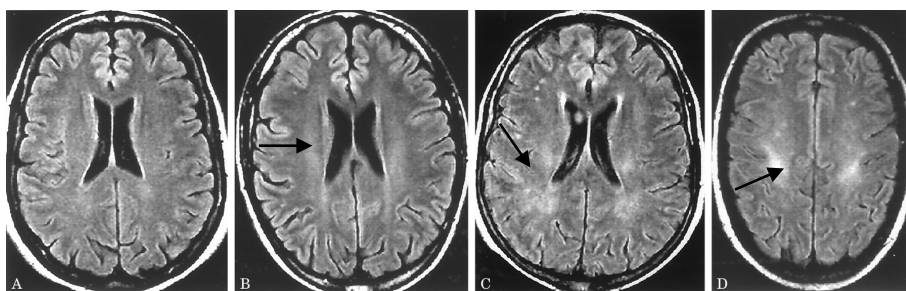


**Figura 20:** Imágenes transversales de RM ponderadas en T1 del cerebro de A) control sano y B) un paciente con enfermedad hepática crónica. Se observa una señal hiperintensa bilateral y simétrica en globo pálido (indicado con flecha). Figura extraída y modificada de *Hepatic Encephalopathy*, Clinical Gastroenterology, 2012.

La secuencia FLAIR (del inglés *fast fluid-attenuated inversion recovery*) de las imágenes ponderadas en T2 ponen de manifiesto intensidades altas de la señal de la sustancia blanca alrededor del tracto corticoespinal y múltiples lesiones localizadas en la sustancia blanca de ambos hemisferios. La señal disminuye después del trasplante hepático (Rovira et al., 2002; García et al., 2019; Rovira et al., 2007), después de un episodio de EH (McKinney et al., 2010) y después de la mejora de la sintomatología de la EH (Minguez et al., 2007). Esta técnica tradicionalmente se ha utilizado para detectar lesiones cerebrales superficiales, como las enfermedades cerebrovasculares degenerativas de vaso pequeño, sin embargo, la reversibilidad observada en los pacientes con EH sugiere que la contracción de las lesiones esté relacionada con cambios reversibles en la distribución del agua cerebral (Figura 21 y 22).



**Figura 21:** Imágenes transversales de contraste fast-FLAIR ponderadas en T2 de un paciente cirrótico de 56 años con hepatitis C A) durante un episodio de EH: las lesiones focales se encuentran diseminadas en la sustancia blanca subcortical (señaladas con flechas). B) Después de la resolución del episodio. Se observa una disminución del tamaño de las lesiones focales de sustancia blanca. Figura extraída y modificada de Rovira et al., 2007.



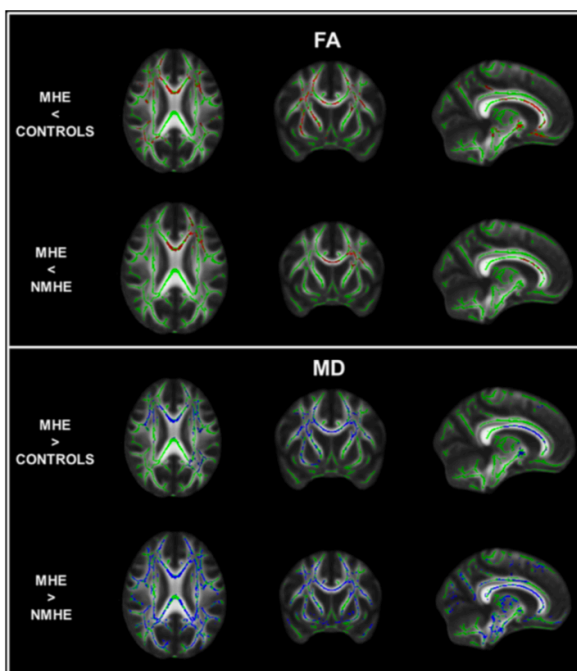
**Figura 22:** Las imágenes transversales de secuencia fast-FLAIR ponderadas en T2 muestran una señal sin signos anormales (A), una señal tenue de alta intensidad (B), una señal moderada de alta intensidad (C) y una señal de alta intensidad (D) en la sustancia blanca o en el trayecto esperado del tracto corticoespinal en cuatro sujetos diferentes (señaladas con flechas). Los dos primeros sujetos (A y B) son voluntarios sanos y los otros dos (C y D) son pacientes con cirrosis hepática sin signos de encefalopatía clínica. Figura extraída y modificada de Rovira et al., 2002.

• Cambios en el agua cerebral

Estudios de RM estructural con imágenes FLAIR, imágenes de transferencia de magnetización, e imágenes ponderadas por difusión apoyan la hipótesis de la existencia de un edema cerebral difuso en los pacientes con enfermedad hepática crónica.

La obtención de imágenes mediante contraste de transferencia por magnetización en pacientes cirróticos muestran valores bajos de señal que se pueden asociar con cambios en el contenido de agua cerebral (Iwasa et al., 1999; Rovira et al., 2001) que revierten con el trasplante hepático junto con la mejora de las alteraciones neuropsicológicas (Córdoba et al., 2001).

Por otra parte, las imágenes ponderadas por difusión muestran un aumento de la difusión del agua cerebral en pacientes con EH (Lodi., et al 2004; Kale., 2006; Miese et al., 2006), que denota alteraciones microestructurales de sustancia blanca. En este sentido, la HA parece jugar un papel importante ya que su inducción en pacientes cirróticos mediante la ingestión de aminoácidos produce un aumento de la difusión del agua cerebral (Mardiani et al., 2011). El aumento del coeficiente de difusión aparente del agua cerebral también se ha demostrado en pacientes con EHM junto con una disminución de la anisotropía fraccional. Estos cambios estructurales en sustancia blanca, evidenciados como un aumento del coeficiente de difusión y la disminución de la anisotropía fraccional se han relacionado con el deterioro cognitivo de estos pacientes (Montoliu C, 2014) (Figura 23).

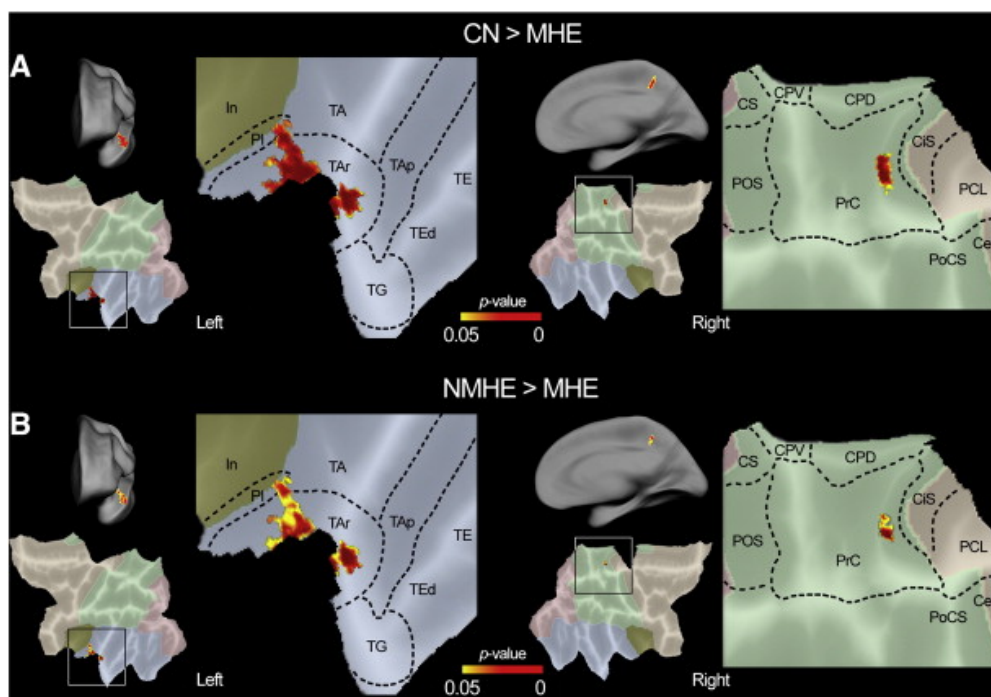


**Figura 23:** Tractos que muestran las diferencias de anisotropía fraccional (FA, del inglés *fractional anisotropy*) y difusividad media (MD, del inglés *mean difussivity*) entre pacientes con encefalopatía hepática mínima (MHE) y pacientes sin EHM o sujetos control. La estadística de contraste muestra una disminución de la FA y un aumento de la MD en los pacientes con EHM en comparación con los controles y los pacientes sin EHM. El color verde representa la media de la FA o la estructura de la MD en todos los participantes. El color rojo representa los tractos con una disminución significativa de FA en MHE. El color azul representa los tractos con un aumento significativo de MD en MHE. Imagen extraída de Montoliu et al., 2014

- Cambios en el volumen cerebral

Estudios volumétricos del cerebro vóxel a vóxel (VBM) han descrito una disminución de la densidad de sustancia blanca y gris en pacientes cirróticos en comparación con los sujetos sanos. La atrofia cerebral en los cirróticos es mayor en la encefalopatía hepática alcohólica y se relaciona con la severidad del fallo hepático. La disminución en la densidad cerebral se correlaciona con los resultados en la realización de las pruebas psicométricas y persiste después del trasplante hepático (Guevara et al., 2011).

Otros estudios han descrito una disminución del espesor cortical en la corteza temporal superior y el *precuneus*, que son significativamente menores en los pacientes con EHM que en los pacientes cirróticos sin deterioro cognitivo y el grupo control (Montoliu et al., 2012) (Figura 24).



**Figura 24:** Reducción significativa del grosor cortical en pacientes con EHM en comparación con A) los sujetos sanos y B) los pacientes con EHM en comparación con los sujetos cirróticos sin deterioro cognitivo. Los cambios en el grosor cortical se localizan en superficies planas de los mismos hemisferios cerebrales y principalmente en la corteza temporal y corteza parietal superior (clusters significativos indicados como zonas sombreadas). TA – primary auditory cortex; TAr – rostral TA; TAp – polysensory cortex; TG – temporopolar area; TE – temporal area; TEd – dorsal TE; PI – parainsular cortex; In – Insula. Abbreviations for the superior parietal cortex: PrC – Precuneus; CPD – cingulate post-dorsal; CPV – cingulate post-ventral; CS – calcarine sulcus; POS – parieto-occipital sulcus; CiS – pars marginalis of the cingulate sulcus; PCL – Paracentral lobule; CeS – Central sulcus; PoCS – Postcentral sulcus. Imagen extraída y modificada de Montoliu C et al., 2012.

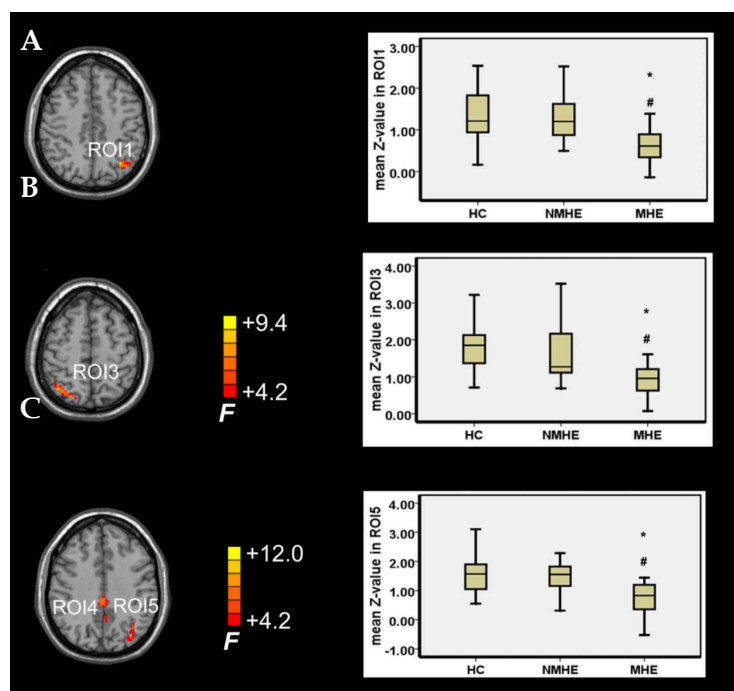
**Estudios de conectividad funcional con RM funcional:**

Muchos son los estudios que han descrito alteraciones en la CF-er de diferentes redes en pacientes con EH.

Mediante el análisis ICA Zhang et al., (2012) analizaron las alteraciones de la CF-er de la red DFM en pacientes cirróticos con EH en comparación con un grupo control. Los pacientes con EH mostraron una menor conectividad funcional en el giro frontal medial derecho y la corteza cingulada posterior. Además, se describió una correlación negativa entre la conectividad funcional del giro angular izquierdo y los niveles de amonio en el grupo de pacientes (Zhang et al., 2012). Otro estudio describió una alteración de la conectividad funcional en los pacientes cirróticos que parece ocurrir progresivamente y en paralelo al deterioro cognitivo, de tal forma que los pacientes cirróticos sin EHM presentan una menor conectividad funcional que los controles y a su vez, los pacientes con EHM presentan una menor conectividad funcional que los pacientes sin EHM (Chen et al., 2013). La disminución de la conectividad funcional en algunas regiones de la DMN se ha asociado con las alteraciones cognitivas presentes en los pacientes con EHM a través de la correlación con dos subtest del PHES, el test de dígitos y números y el test A de conexión numérica (Qui et al., 2014).

Haber sufrido un episodio de EH clínica también tiene consecuencias en la CF-er en la red DMN. Un estudio desarrollado por Chen et al., 2012 describió que los pacientes cirróticos que han sufrido un episodio de EH clínica, presentan un menor volumen de sustancia gris cerebral y alteraciones en la conectividad funcional de la DMN en comparación con el grupo de sujetos sanos, que además persiste aún después de presentar una recuperación clínica aparente. A su vez, parece ser que los pacientes cirróticos que han sufrido episodios previos de EH clínica presentan una disminución de la conectividad funcional mucho mayor que los pacientes que no la han sufrido (Chen et al., 2013).

El grupo de Chen et al., (2014) en base al déficit de atención presente en la EH decidieron estudiar la conectividad funcional, además de la DMN, de dos redes implicadas en procesos de atención: red de atención dorsal (RAD) y red de atención ventral (RAV). Los resultados mostraron una menor conectividad funcional en las tres redes en el grupo de pacientes con EHM en comparación con los grupos control y sin EHM. Además, la fuerza de conectividad funcional en diferentes regiones de interés pertenecientes a estas redes permitió clasificar a los pacientes como pacientes con EHM y pacientes sin EHM (Figura 25).

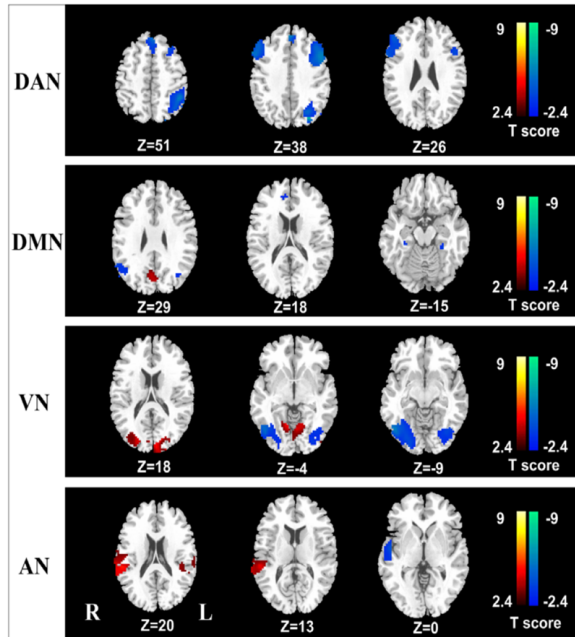


**Figura 25:** Regiones que muestran diferencias significativas en la conectividad funcional entre los pacientes sin EHM (NMHE, del inglés *no-minimal hepatic encephalopathy*), con EHM (MHE, del inglés *minimal hepatic encephalopathy*) y controles (HC, del inglés *healthy controls*) en A) red de atención dorsal B) red de atención ventral y C) red de activación por defecto. \* indica que los pacientes cirróticos presentan una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en la conectividad funcional, comparado con los controles sanos; mientras que # indica que los pacientes cirróticos con EHM presentan una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en la conectividad funcional en comparación con los pacientes cirróticos sin EHM). Figura extraída y modificada de Chen et al., 2014.

La disminución de la conectividad funcional en pacientes con EHM en comparación con controles en la RAD, la RAV y en la DMN se ha corroborado en otro estudio realizado por Qui et al., (2012). En este estudio también encontraron disminuciones de la conectividad funcional en la red visual y auditiva. Además describieron un aumento de la conectividad funcional en ciertas regiones de la DMN (corteza cingulada posterior/*precuneus*), de la RAV (giro occipital inferior) y de la red auditiva (giro temporal superior). Otras redes como la red sensitivo-motora no están afectadas en la EHM (Figura 26).

Estos estudios demuestran que la alteración de la CF-er en el cerebro de pacientes cirróticos ocurre en paralelo con la progresión del deterioro cognitivo, de forma selectiva y de forma diferente entre las redes.

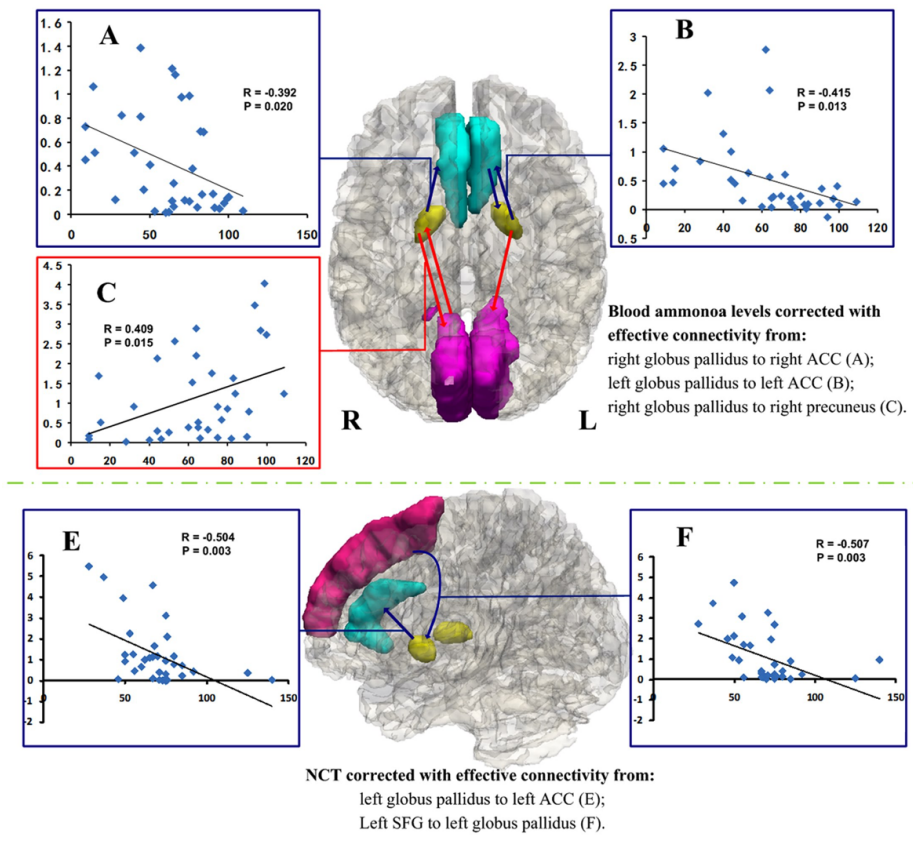




**Figura 26:** Mapa de comparación entre sujetos sanos y pacientes con EHM de la CF-er 6 redes neuronales durante el estado de reposo cerebral. En comparación con los sujetos controles, los pacientes con EHM muestran una disminución (indicado en color azul) en la red de atención dorsal, (DAN, *Dorsal Attentional Network*), tanto un aumento (indicado en color rojo) como una disminución en DMN (*Default Mode Network*), red visual (VN, *visual network*) y red auditiva (AN, *auditory network*). Figura extraída de Qui et al., 20012.

Mediante el análisis de semilla se selecciona una región de interés (ROI del inglés *region of interest*) en base a una hipótesis y se estudia su conectividad funcional con el resto del cerebro. Este tipo de análisis ha demostrado una disminución de la CF-er entre el núcleo ventral anterior bilateral y el núcleo ventral posterior medial del tálamo con diversas áreas corticales y con los núcleos basales en pacientes con EHM comparados con sujetos sanos (Qui et al., 2013).

Como hemos descrito anteriormente, diversos estudios de neuroimagen estructural en pacientes cirróticos se han centrado en el estudio de alteraciones estructurales del sistema estriatal y los ganglios basales, sin embargo, son pocos los estudios de RM f uncional que han analizado su conectividad. Qui R et al., (2013a) utilizaron el análisis de semilla seleccionando como regiones de interés distintas estructuras de los ganglios basales para estudiar los cambios en su conectividad funcional en EH en comparación con controles. Evaluaron también la dirección de los patrones de conectividad funcional, es decir, en qué medida la actividad de un área es responsable de la actividad de otra con la que está conectada funcionalmente. Los pacientes con EH presentaron alteraciones en la conectividad funcional de diversa índole entre el globo pálido y otras estructuras corticales y subcorticales. Por otra parte, observaron una correlación negativa entre los niveles de amonio en los pacientes con EH y la conectividad desde el globo pálido a la corteza cingulada anterior y positiva con la conectividad desde el globo pálido al *precuneus*. También se observó una correlación entre la conectividad y los test cognitivos: las puntuaciones en el subtest de conexión numérica del PHES se correlacionan negativamente con la menor conectividad desde el globo pálido hacia la corteza cingulada anterior y desde el giro frontal superior hacia el globo pálido (Figura 27).



**Figura 27:** Resultados de correlación entre los niveles de amonio y la conectividad en pacientes con grado leve de EH desde A) globo pálido derecho (coloreado en amarillo) a corteza cingulada anterior derecha (color azul); desde B) globo pálido izquierdo a corteza cingulada anterior izquierda y desde C) globo pálido derecho a precuneus derecho (fucsia). **Resultados de correlación entre la puntuación en el test de conexión numérica (NCT) y la conectividad en pacientes con grado leve de EH** entre E) globo pálido izquierdo y corteza cingulada anterior y F) giro frontal superior y globo pálido. ACC= corteza cingulada anterior, del inglés *anterior cingulate cortex*; SFG= giro frontal superior, del inglés *superior frontal gyrus*. Figura extraída de Qui R et al., 2013.

En otro estudio desarrollado por Zhu et al., (2012) evaluaron la implicación de la deposición de manganeso y las hiperintensidades de las imágenes ponderadas en T1 del globo pálido de los pacientes cirróticos en la CF-er del sistema estriatal en comparación con un grupo control. Los pacientes cirróticos seleccionados presentaban hiperintensidades bilaterales en el globo pálido de las imágenes ponderadas en T1 y alteraciones en la conectividad funcional cortico-estriatal. Encontraron correlaciones significativas entre la conectividad cortico-estriatal y la evaluación neuropsicológica en los pacientes, pero no encontraron correlaciones entre la conectividad del estriado y la intensidad de la señal T1 en el globo pálido. Estos resultados muestran como la conectividad funcional en el sistema estriatal participa en el deterioro cognitivo de los

pacientes cirróticos y que la alteración de la conectividad funcional no parece debida a la deposición de manganeso.

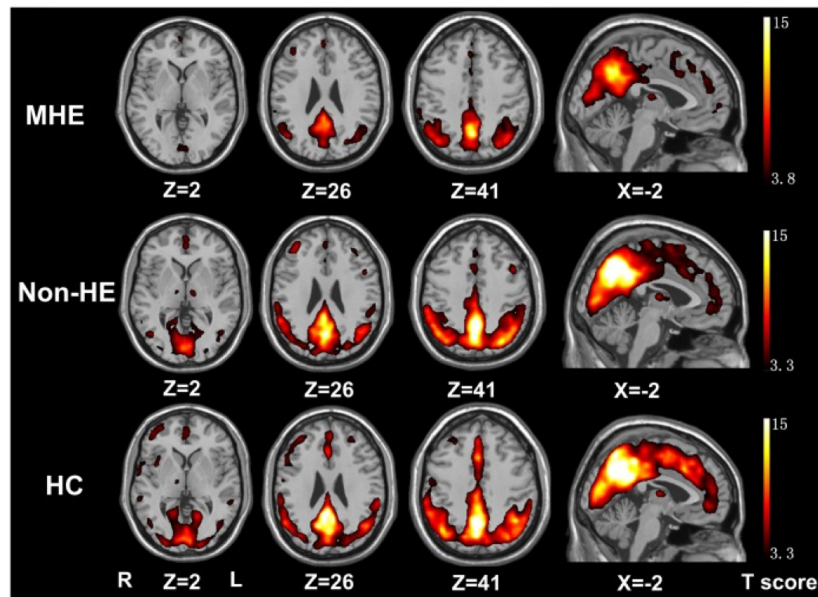
Zhang et al. (2013) también demostraron alteraciones de la conectividad de la corteza cingulada anterior (CCA) en pacientes cirróticos utilizando esta región como semilla. El deterioro de la conectividad de la CCA avanzaba con el nivel de severidad de la EH y se correlacionaba con la disfunción cognitiva evaluada con dos subtest del PHES (test de conexión numérica A y test de dígitos y símbolos). En cambio, los niveles de amonio venoso, no correlacionaron con esta pérdida de conectividad.

Zhang et al., (2012b) investigaron patrones de conectividad funcional del cerebro completo en estado de reposo, utilizando múltiples ROIs, en pacientes con EHM en comparación con sujetos control. Observaron alteraciones especialmente en el circuito ganglios basales-tálamo-corteza, que podrían tener un papel importante en la mediación de la disfunción cognitiva, especialmente en el enlentecimiento psicomotor y en los déficits de atención en los pacientes con EHM, evaluados con los subtest del PHES de conexión de números A y test de dígitos y números.

Mediante el análisis ReHo (del inglés *regional homogeneity*) Chen et al., (2012) estudiaron el nivel de sincronización local de voxels dentro de un área específica del cerebro. Demostraron que los pacientes con EHM en comparación con los sujetos sanos, presentaban una menor homogeneidad regional en el cúneus, precuneus y lóbulo parietal inferior izquierdo y un aumento de esta homogeneidad en el giro parahipocampal izquierdo y cerebelo. Además, encontraron correlaciones positivas entre la homogeneidad en el *cuneus* y el *precuneus* y la capacidad para realizar los test cognitivos de dígitos y símbolos.

Las diferencias en homogeneidad regional parecen no ser específicas de los pacientes diagnosticados de EHM, ya que un estudio desarrollado por Ni et al., (2012) mostró una alteración de la homogeneidad en pacientes cirróticos sin diagnóstico de EHM. En este estudio, sólo la disminución progresiva de la homogeneidad en el área motora suplementaria y el *cuneus* se asoció con el desarrollo de la EHM (Figura 28). Sin embargo, estudios más recientes basados en técnicas que permiten extraer características predictivas de pertenencia a un grupo ("machine learning") ha permitido la clasificación de pacientes con y sin EHM con una elevada sensibilidad y especificidad a partir de la evaluación de la homogeneidad regional en un conjunto de regiones que incluyen la corteza prefrontal, la corteza cingulada anterior, la corteza insular anterior, el lóbulo parietal inferior, el giro pre y postcentral, la corteza temporal medial y superior y el giro occipital medial inferior (Chen et al., 2016).





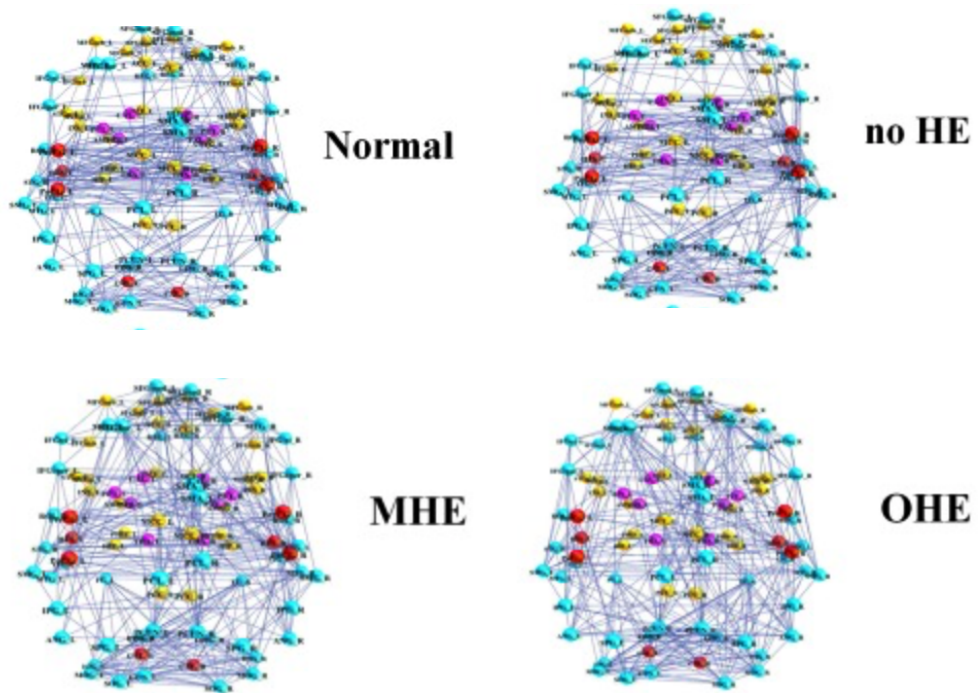
**Figura 28:** Mapas de homogeneidad media en encefalopatía hepática mínima (MHE), sin encefalopatía hepática (non-EH) y grupo control sano (HC). En los tres grupos el precuneus/corteza cingulada posterior, corteza prefrontal medial y el lóbulo parietal inferior (bilateral) presentan valores de homogeneidad mayores (zonas sombreadas con una escala roja y amarilla) respecto a la media global de todo el cerebro. Se observa la clara diferencia de potencia en la homogeneidad entre los grupos. Figura extraída y modificada de Ni et al., 2012.

Lin et al., (2015) encontraron en pacientes cirróticos con un episodio agudo de EH clínica una alteración de la homogeneidad media localizada a nivel de áreas de la DMN y en las regiones de asociación, primaria y límbica/para-límbica. Además encontraron diferencias significativas en el índice de homogeneidad en el lóbulo temporal superior derecho y el cerebelo izquierdo entre el grupo de pacientes que sobrevivían al episodio de EH y el grupo de fallecidos y una asociación entre el aumento de la conectividad local en el cerebelo izquierdo y un menor nivel de consciencia.

Los pacientes con EH clínica y con EHM presentan una alteración de la amplitud de las fluctuaciones de baja frecuencia (en inglés ALFF) reflejando alteraciones difusas en la actividad cerebral espontánea. Se ha visto que estas alteraciones progresan conforme avanza la enfermedad (Qi et al. 2012; Lv et al. 2013; Chen et al. 2012; Zhong et al., 2016). Así por ejemplo Qi et al., (2012) encontraron una disminución de la ALFF en el DMN y un aumento de ésta en la corteza posterior insular en los pacientes con EH clínica que no está presente en los pacientes con EHM.

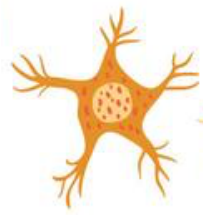
También se han observado cambios en ALFF en pacientes cirróticos a lo que se les insertan TIPS quirúrgicamente para mejorar ciertos síntomas de la EH. Sólo ocho días después de la inserción de TIPS se observa una disminución de la ALFF en la corteza cingulada posterior (CCP)/*precuneus* y aumento en la corteza cingulada anterior (CCA). Sin embargo, el mismo examen a los tres meses revela una disminución en el CCP, CCA y corteza prefrontal medial. Esto puede estar reflejando mecanismos compensatorios o patológicos en las funciones mentales tras la inserción de los TIPS, así como alteraciones persistentes presentes a los tres meses (Q et al., 2012). También se han realizado estudios de amplitud de las fluctuaciones de baja frecuencia en pacientes con trasplante hepático (Cheng et al., 2017; Zhang et al., 2017). Tras un mes desde el trasplante hepático, los pacientes con EH clínica y los pacientes sin EH clínica mejoraron las capacidades cognitivas y la actividad cerebral en regiones relacionadas con la función motora, la visión, la atención y la memoria de trabajo (*precuneus*, ínsula, giro postcentral, etc). Sin embargo, algunas regiones siguieron mostrando alteraciones en las fluctuaciones de baja frecuencia y aparecieron nuevas regiones con dicha alteración y de forma diferente entre los grupos. Por ejemplo, en los pacientes con EH clínica las fluctuaciones de baja frecuencia persistieron alteradas en el recto derecho y empeoraron en el giro frontal superior, giro occipital inferior y cerebelo. Por otro lado, en los pacientes sin EH clínica no se mostraron mejorías en las fluctuaciones de baja frecuencia tras el trasplante hepático ni en el *precuneus* ni en el giro frontal superior medial y si nuevas alteraciones en el giro precentral, cerebelo y regiones subcorticales. La comparación entre grupos mostró que, aunque el rendimiento cognitivo mejoraba en ambos grupos, los cambios neuronales tras trasplante hepático fueron distintos en cada grupo y que puede ser necesario más tiempo tras el trasplante para poder observar una recuperación más amplia de las funciones cognitivas.

Finalmente, la teoría de grafos es otro análisis de conectividad funcional que se ha utilizado para el estudio del cerebro en pacientes cirróticos. Los pacientes con EH muestran deficiencias topológicas de conectividad neuronal (número de elementos que forman la red y las interconexiones existentes entre ellos) tanto locales como globales de diferentes sistemas, predominantemente en áreas de asociación y regiones primarias y límbicas y paralímbicas. El grado de alteración en la organización de las redes depende de la severidad de la EH y de los niveles de amonio en sangre (Tun-Wei et al., 2012) (Figura 29).



**Figura 29:** Conectividad funcional obtenida mediante el algoritmo de la teoría de grafos en pacientes con encefalopatía clínica (OHE, del inglés overt hepatic encephalopathy), con encefalopatía hepática mínima (MHE, del inglés *minimal hepatic encephalopathy*), sin encefalopatía hepática (no HE, del inglés *no hepatic encephalopathy*) y sujetos sanos (normal). Figura extraída y modificada de Tun-Wei et al., 2012.





## **2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Partiendo de los antecedentes descritos, en esta tesis propusimos algunas hipótesis en las que nos basamos para definir unos objetivos que nos permitieran avanzar en el conocimiento de los efectos de la hiperamonemia y la encefalopatía hepática en la conectividad en el cerebro de pacientes cirróticos y modelos animales. La hipótesis de partida se puede resumir del siguiente modo: Los pacientes con EHM presentan alteraciones en la generación del potencial MMN, concretamente una disminución del área bajo la curva del potencial, que se correlaciona con los déficits de atención. Hipotetizamos que las ratas con hiperamonemia crónica deben reproducir las alteraciones encontradas en la onda en pacientes con EHM y que por tanto son un buen modelo para estudiar los mecanismos implicados y ensayar tratamientos para revertirlas. Hipotetizamos que uno de los mecanismos principales por los que se altera la respuesta MMN es la alteración de la conectividad funcional entre las diferentes áreas que participan en su generación. Además, hipotetizamos que la neuroinflamación juega un papel importante como causa de las alteraciones de la respuesta MMN y que el tratamiento con Ibuprofeno podría revertirlas en ratas con hiperamonemia.

Como se ha expuesto en la introducción, los estudios de RM demuestran alteraciones cerebrales tanto estructurales como en la conectividad funcional de distintas redes neuronales en los pacientes con EH. Hipotetizamos que alteraciones específicas tanto estructurales como en la conectividad funcional en el cerebro de pacientes cirróticos son responsables de alteraciones cognitivas específicas que estas alteraciones se relacionan con la hiperamonemia y la inflamación. Además, hipotetizamos que los pacientes con EHM deben tener alteraciones funcionales y estructurales en el hipocampo que contribuyen a las alteraciones en el aprendizaje y la memoria.

Partiendo de estas hipótesis, el objetivo principal de esta tesis es estudiar los efectos de la hiperamonemia y la encefalopatía hepática sobre la conectividad neuronal en cerebro de pacientes cirróticos sin y con EHM y en ratas con hiperamonemia crónica. La conectividad neuronal se ha analizado por dos procedimientos: mediante registros electroencefalográficos y análisis del MMN y de los potenciales locales de campo en modelos animales y mediante resonancia magnética en pacientes.

Para alcanzar este objetivo principal, abordamos los siguientes objetivos concretos:

**A) En el modelo de hiperamonemia crónica:**

1. Diseñar e implementar el software y hardware para el registro electroencefalográfico y procesado del MMN en ratas.
2. Comprobar si el modelo de ratas con HA crónica reproduce las alteraciones en la onda MMN encontradas en los pacientes con EHM. En base a los mecanismos previstos en la generación del MMN estudiamos sus alteraciones en la vía auditiva (colículo

inferior y corteza auditiva primaria) y en el hipocampo y la corteza pre-límbica, como áreas de procesamiento superiores.

3. Identificar los mecanismos electrofisiológicos responsables de la alteración del MMN en ratas hiperamonémicas. Analizar el papel de cambios en la potencia espectral, coherencia y causalidad funcional en las áreas mencionadas durante la generación de la respuesta MMN y en condiciones basales.
4. Analizar si la generación del MMN está asociada a cambios en la neurotransmisión midiendo el GABA y glutamato extracelulares y los cambios en la expresión en membrana de receptores de glutamato y GABA.
5. Analizar si el tratamiento con un anti-inflamatorio no esteroideo (Ibuprofeno) revierte las alteraciones encontradas en ratas hiperamonémicas en el potencial MMN, en los mecanismos electrofisiológicos subyacentes y en la neurotransmisión.

**B) En pacientes cirróticos con y sin encefalopatía hepática mínima:**

1. Caracterizar en detalle diferentes alteraciones neurológicas utilizando test psicométricos que evalúan funciones cognitivas y motoras específicas.
2. Analizar la conectividad funcional de diferentes redes neuronales en el estado de reposo cerebral mediante RM funcional y la integridad de sustancia gris en todo el cerebro mediante RM estructural. Estudiar las posibles correlaciones entre las alteraciones encontradas y las alteraciones neurológicas, la hiperamonemia y la inflamación.
3. Analizar la conectividad funcional en estado de reposo del hipocampo con el resto de áreas cerebrales mediante RM funcional y la integridad estructural de sustancia gris en las diferentes subregiones del hipocampo mediante RM estructural. Estudiar las posibles correlaciones entre las alteraciones encontradas en la conectividad funcional y en la morfometría del hipocampo y el deterioro cognitivo evaluado con el PHES y el TAVEC y la hiperamonemia y la inflamación.







## **3.MATERIAL Y MÉTODOS**

## 3.1 MODELO ANIMAL DE HIPERAMONEMIA SIN FALLO HEPÁTICO

### 3.1.1. Modelo de hiperamonemia crónica en ratas

El modelo de HA crónica en ratas sin fallo hepático fue desarrollado en nuestro laboratorio (Felipo et al., 1988; Azorin et al, 1989). Consiste en la administración a las ratas de una dieta rica en amonio (25% acetato amónico p/p) durante como mínimo 3 semanas. Esta dieta induce un estado de HA sostenida en el que los niveles de amonio en sangre se duplican respecto a las ratas control, reproduciendo el nivel de HA presente en pacientes con cirrosis hepática. En cerebro, hígado y músculo los aumentos de los niveles de amonio son del 41, 37 y 50%, respectivamente. Los niveles de urea en sangre ( $\approx 16$  mM) y la eliminación de urea (25 mmoles/24 h) son aproximadamente el doble de los valores correspondientes a ratas control.

En esta tesis se utilizaron ratas Wistar (120-140 g al principio de la dieta, Charles River Laboratories, Barcelona, España). Los experimentos se realizaron después de 5-6 semanas de dieta con amonio. El grupo de ratas control fue alimentado con una dieta normal. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética y Bienestar en Experimentación Animal, Centro de Investigación Prince Felipe-Consellería de Agricultura, Generalitat Valenciana, y se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva del Consejo de Comunidades Europeas (86/609/EEC).

### 3.1.2. Obtención de potenciales evocados y registros electroencefalográficos

#### 3.1.2.1 Cirugía estereotáxica para la inserción de electrodos en ratas

Los experimentos se realizaron en ratas macho Wistar. Dependiendo del experimento, el número de ratas por grupo fue: 28-47 controles; 24-34 con HA; 14 y 10 controles y con HA tratadas con Ibuprofeno, respectivamente). Las ratas alimentadas durante 5 semanas con dieta rica en amonio y las ratas del grupo control, tratadas o no con Ibuprofeno durante 4 semanas, fueron anestesiadas con Isoflurano y los electrodos se insertaron estereotáxicamente, previa craneotomía de los lugares de inserción, en las siguientes coordenadas respecto a bregma (AP/ML/DV) obtenidas del atlas de *Georges Paxinos and Charles Watson 6th edition*: corteza prelímbica (3,2/0,5/4), CA1 del hipocampo (-2,8/1,7/3), corteza auditiva primaria (-3,8/6,5/4,5) y colículo inferior (-8,8/1,5/4,5).

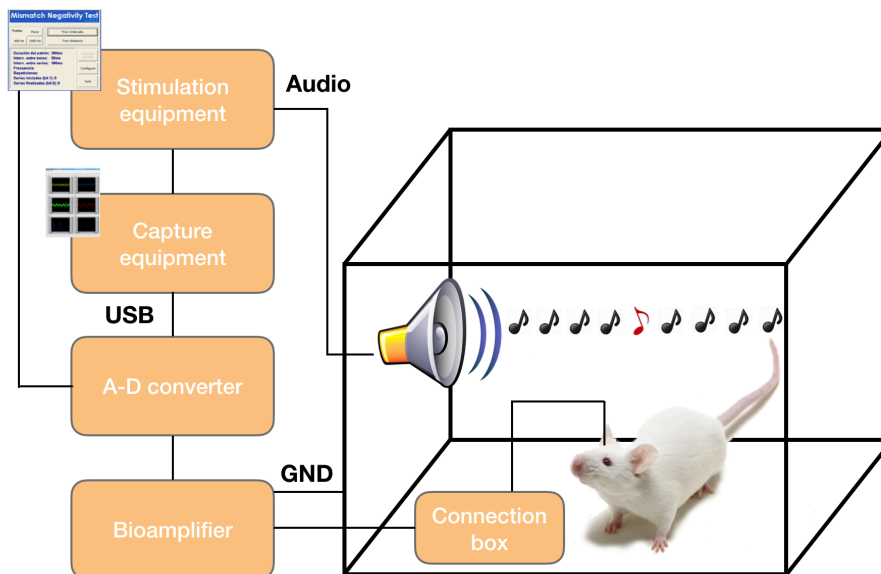
Después de una semana de reposo tras la operación, a las 6 semanas de dieta rica en amonio, se obtuvieron registros EEG basales de las ratas en libre movimiento durante 30

minutos y a continuación los potenciales evocados mediante el sistema de estimulación y adquisición que describimos en la siguiente sección. Para el registro de potenciales evocados se les administró a las ratas intraperitonealmente hidrato de cloral (0,4 g/kg), un hipnótico/sedante que no produce pérdida de consciencia, con el fin de que las ratas no se movieran y reducir el ruido durante el registro.

### 3.1.2.2 Sistema de estimulación y adquisición

Se desarrolló un sistema para inducir el potencial evocado auditivo MMN en las ratas y capturar la actividad electroencefalográfica correspondiente. Este sistema está compuesto de los siguientes módulos (Figura 30):

- Módulo de estimulación.** Es el encargado de generar los estímulos auditivos para provocar en la rata la aparición del potencial MMN.
- Módulo de adquisición.** Realiza la recogida de la actividad electroencefalográfica y su almacenamiento en formato digital
- Módulo de procesado.** Calcula los potenciales MMN a partir de los registros adquiridos y obtiene los parámetros característicos.



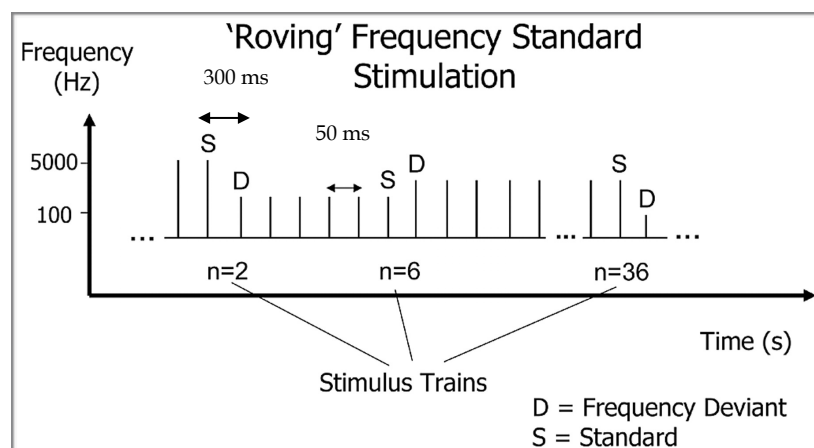
**Figura 30:** Esquema del sistema de estimulación y adquisición de MMN

La rata se introducía en una caja insonorizada que se encontraba dentro de una jaula de Faraday para disminuir el ruido eléctrico que pudiera interferir con la señal eléctrica cerebral a recoger. Se emitían los sonidos necesarios para generar la respuesta MMN al mismo tiempo que se recogía y almacenaba la actividad electroencefalográfica de la rata en los cuatro canales de estudio: corteza prelímbica (PrL), CA1 del hipocampo, corteza auditiva primaria (AU1) y colículo inferior (CIC).

### Módulo de estimulación

Para emitir los estímulos auditivos que provocan la aparición del potencial MMN en las ratas control y con HA, se elaboró una aplicación *software* siguiendo las directrices del Servicio de Neurofisiología del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia para reproducir las condiciones de los estudios en humanos. Este programa está desarrollado para plataformas Microsoft Windows® y permite la configuración de los siguientes parámetros:

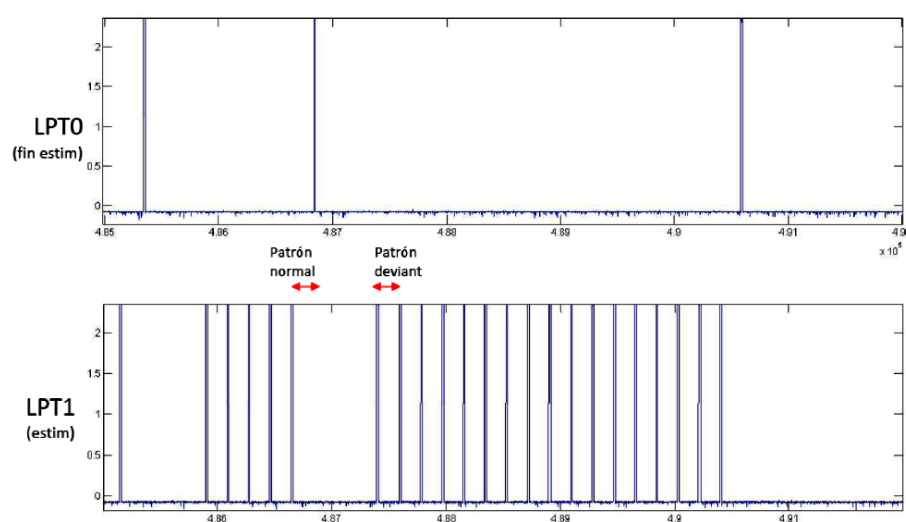
- Frecuencia mínima de los sonidos emitidos.
- Número de muestras a recoger (ocasiones en que debe aparecer la MMN)
- Patrón de las series de estímulos (ascendente, descendente o ascendente-descendente)
- Intervalo entre tonos (estímulos)
- Intervalo entre series
- Configuración del uso del puerto paralelo



**Figura 31: Paradigma de estimulación *roaring*.** Figura extraída y modificada de Haenschel et al., 2005.

El paradigma de estimulación utilizado fue el *roaring* (Figura 31), la secuencia de estimulación consiste en trenes de tonos que se repiten un número variable de veces (2, 6, 12 y 36) (indicados con líneas verticales en la figura). La frecuencia de los tonos de cada tren varía aleatoriamente (entre 750 y 1250 Hz) de tren en tren (indicado por la altura de las líneas verticales en la figura). El intervalo de tiempo entre los tonos de un mismo tren es de 50 ms y el intervalo entre el último tono de un tren y el primer tono del siguiente es de 300 ms, intervalo de tiempo suficiente para asegurar que no se produce solapamiento entre la respuesta del último sonido de cada tren y el primer sonido del siguiente. Se emitieron un total de 9961 sonidos por registro. El primer sonido de cada tren es considerado como el sonido extraño (D, del inglés *deviant*) y el último sonido de cada tren se considera sonido estándar (S, del inglés *standard*). El sonido extraño y el sonido estándar se utilizan para la obtención del PE y cálculo de la onda MMN. Se obtuvieron un total de 475 respuestas MMN en cada ensayo.

El sistema de estimulación utiliza los canales 0 y 1 del puerto paralelo para emitir señales de sincronía de forma que queden identificados los instantes en que se producen las respuestas estándar y *deviant*, información necesaria para realizar el análisis posterior (Figura 32).



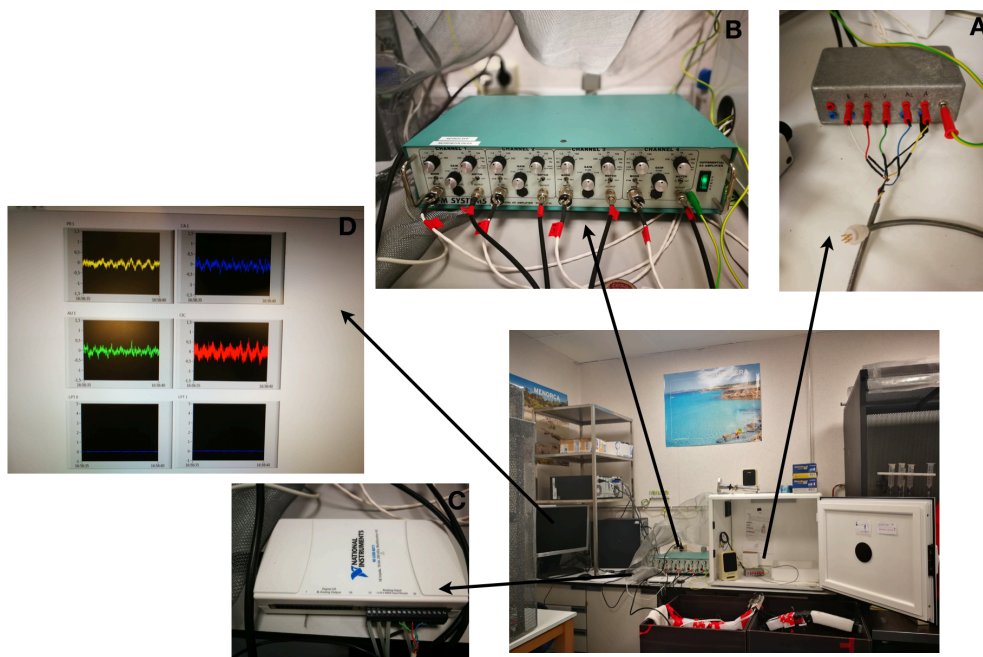
**Figura 32:** Canales de sincronización de estímulos. El canal llamado LPT0 genera un pulso al final de cada tren (coincidente con lo que consideramos sonido extraño) y el canal LPT1 genera un pulso por cada estímulo del tren.

### Módulo de adquisición

Se diseñó e implementó un sistema con capacidad para 4 canales de EEG capaz de capturar la actividad electroencefalográfica mientras se genera una serie de estímulos

auditivos que evocaran la aparición de la MMN (Figura 33). El sistema está compuesto por los siguientes elementos:

- Conector implantable en la cabeza de la rata. El conector consta de 6 electrodos.
- Bioamplificador. Se trata de un amplificador de señales biológicas A-M Systems Differential AC Amplifier Model 1700, con ganancia configurable de hasta 10000x, filtro pasa-baja desde 0,1Hz a 300Hz, filtro pasa-alta de 500Hz a 20KHz, filtro elimina-banda de 50Hz y CMRR>80dB
- Conversor analógico-digital National Instruments NI-USB 6211, con capacidad para 8 señales diferenciales o 16 unipolares, resolución de 16bits.
- Componente software elaborado con la plataforma Labview®, de National Instruments®, que gestiona el conversor analógico-digital y almacena las muestras en el registro de datos.
- PC sobre el que se ejecuta la plataforma Labview®.

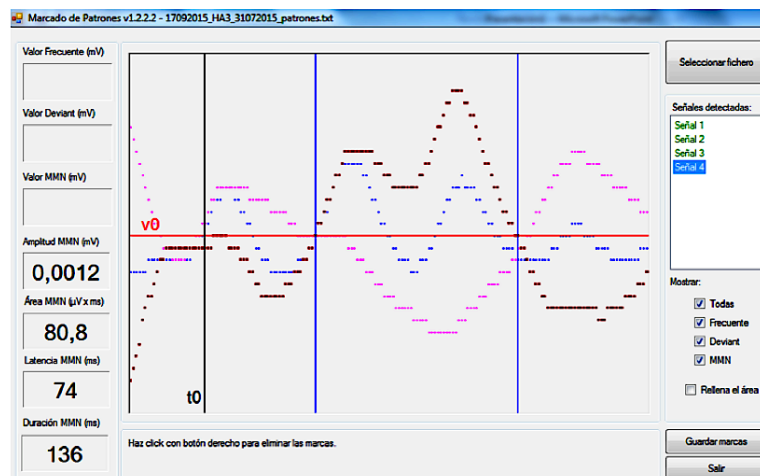


**Figura 33:** Módulo de adquisición. A) Conector implantable B) Bioamplificador C) Conversor analógico-digital D) Interfaz de los registros de EEG

### Módulo de procesado

Las tareas realizadas por este módulo son las siguientes (Figura 34):

- Determinar las referencias temporales para los patrones normales y *deviant* a partir de los canales de sincronía incluidos en el registro de datos.
- Obtención de los patrones normal y *deviant* mediante promediación. Duración del patrón: 350 ms, empezando 50 ms antes del inicio del estímulo. Determinación de la onda diferencia MMN.
- Incorporación de los límites del potencial MMN marcados por el experto.



**Figura 34:** Módulo de procesado. Permite obtener el PE por el patrón estándar (azul), por el patrón extraño (rosa) y la diferencia de los dos potenciales para obtener la respuesta MMN (marrón) para los cuatro canales de registro. El experto marca con líneas verticales el inicio y el final del PE para hacer los cálculos pertinentes de las variables.

#### 3.1.2.3 Análisis de los datos

##### ■ Medidas MMN

Tras la promediación y el adecuado procesado de los registros se obtuvieron los PEs por los sonidos estándar, los sonidos extraños y la respuesta MMN. Se estipuló el inicio y el final de la respuesta MMN siguiendo las siguientes directrices: latencia mínima de la onda  $\geq 25$  ms; inicio de la onda se considera como el primer punto donde se cruzan el PE

producido por el sonido estándar y el PE producido por el sonido extraño; el final de la onda se considera como segundo punto donde se cruzan el PE producido por el sonido estándar y el PE producido por el sonido extraño. Se obtuvieron los siguientes parámetros utilizando la herramienta MATLAB:

- Amplitud del pico máximo del potencial MMN
- Área bajo la curva del potencial MMN
- Frecuencia dominante en el PE por los sonidos estándar, los sonidos extraños y la respuesta MMN. La composición frecuencial de los PE se calculó utilizando la transformación rápida de Fourier (FFT, *fast Fourier transformation*). La potencia normalizada por las bandas de frecuencia se calculó como la energía normalizada, es decir, la potencia relativa en una determinada banda en comparación con la potencia total en todas las bandas de frecuencia (Frecuencia de Nyquist).
- Media de las desviaciones estándar de cada punto de diferencia de potencial adquirido para la obtención del PE.
- Entropía.

#### ■ Análisis espectral del potencial de campo local (LFP)

Los trazos de EEG (sin promediar respecto al estímulo auditivo) representan la suma de la corriente eléctrica generada por múltiples neuronas cercanas dentro de un pequeño volumen de tejido nervioso (LFP, del inglés *Local Field Potential*). Con los LFP se calculó la composición de frecuencias utilizando la transformación rápida de Fourier (FFT, del inglés *Fast Fourier Transformation*). La densidad de potencia espectral se calculó mediante el método Welch (50% de superposición con una ventana Hamming de 2 segundos) tal y como está implementado en la herramienta *Signal Processing* del MATLAB®. La resolución de la estimación espectral fue de 2 Hz. En este estudio nos centramos en las actividades LFP clasificadas en las siguientes bandas de frecuencia: delta [1-4 Hz] ya que se ha propuesto que las oscilaciones delta inhiben las interferencias que pueden afectar al rendimiento de las tareas mentales (Harmoni, 2013); theta [4-8 Hz], porque es muy informativa de la actividad característica tanto en el hipocampo (Buzsaki, 2002 y 2006) como en la corteza auditiva (Kayser et al., 2009) y porque su oscilación se ha relacionado con la discriminación de procesos en la respuesta MMN (Deokwon et al., 2012); y las bandas beta baja [8-12 Hz] y beta alta [12-30 Hz] porque se ha propuesto que la banda beta se debe principalmente a procesos neuromoduladores independientes del estímulo (Belitski et al., 2008).

Para cuantificar la actividad oscilatoria, la potencia normalizada por las bandas de frecuencia se calculó como la energía normalizada (Frecuencia de Nyquist).



## ■ Medidas de sincronización

La sincronización entre las poblaciones neuronales juega un papel importante en el procesamiento de la información en el cerebro (Engel et al. 2001; Li et al. 2007; Schnitzler y Gross 2005; Aviyente et al. 2011) y su análisis se ha convertido en una herramienta importante para la comprensión de los mecanismos de las funciones cerebrales normales (Roelfsema et al., 1997; Steriade et al., 1993; Mizuhara y Yamaguchi, 2007) o patológicas (Uhlhaas y Singer, 2006).

Los espectros de coherencia entre pares de áreas (CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL y CA1-PrL) se calcularon siguiendo los métodos de FFT. La coherencia es una medida de interdependencia de dos señales en el dominio de frecuencia. Presenta valores entre 0 y 1. Un valor de 0 significa que las dos señales son independientes en la frecuencia considerada, mientras que un valor de 1 significa que las señales son idénticas en frecuencia y tienen una relación de fase constante. La mejora de la coherencia significa un aumento de la similitud de frecuencia y la consistencia de fase entre las señales oscilatorias en dos regiones cerebrales.

La causalidad de Granger (Granger, 1969) ha sido el parámetros más ampliamente utilizado para identificar relaciones causales entre series temporales. En un modelo bivariado, dos series de tiempo  $x_1(t)$  y  $x_2(t)$ , se pueden describir individualmente mediante un modelo autorregresivo basado en  $p$  observaciones anteriores en el tiempo:

$$x_n(t) = \sum_{j=1}^p a_j x_n(t-j) + \xi_n$$

siendo el parámetro  $p$  el orden del modelo,  $a_j$  los coeficientes de la regresión y el valor de  $\xi_n$  los errores de predicción para la serie temporal. El orden del modelo se estima a priori según el criterio de información de Akaike (Akaike, 1974). Luego  $x_1(t)$  se puede volver a modelar usando series de tiempo  $x_2(t)$  como información colateral causal, y del mismo modo,  $x_2(t)$  en relación con  $x_1(t)$ :

$$\begin{aligned} x_1(t) &= \sum_{j=1}^p a_{11} x_1(t-j) + \sum_{j=1}^p a_{12} x_2(t-j) + \xi_1 \\ x_2(t) &= \sum_{j=1}^p a_{21} x_1(t-j) + \sum_{j=1}^p a_{22} x_2(t-j) + \xi_2 \end{aligned}$$

siendo los valores  $\xi_1$  y  $\xi_2$  los errores de predicción para cada serie temporal en el modelo causal. De acuerdo con la propuesta de Granger, si la varianza de  $\xi_1$  es menor incluyendo los términos  $a_{12}(j)$  en el modelo de  $x_1(t)$ , en comparación con la situación donde  $a_{12}(j) = 0$  para todas las  $j$ , entonces  $x_1(t)$  es causante de  $x_2(t)$ . Formalmente, la causalidad de Granger en el sentido  $x_1(t)$  causa a  $x_2(t)$ ,  $G_{1 \rightarrow 2}$ , se cuantifica como:

$$G_{1 \rightarrow 2} = \ln \frac{\text{var}(\xi_{12})}{\text{var}(\xi_1)},$$

Donde  $\text{var} \xi_1$  y  $\text{var} \xi_{12}$  son las varianzas de los errores en la predicción en los modelos univariante y completo, respectivamente. La versión espectral de la causalidad de Granger puede derivarse de la transformada de Fourier de los modelos autorregresivos, descrita como función de transferencia dirigida (DTF, Kaminski et al., 2001),

$$\begin{bmatrix} A_{11}(f) & A_{12}(f) \\ A_{21}(f) & A_{22}(f) \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} X_1(f) \\ X_2(f) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} E_1(f) \\ E_2(f) \end{bmatrix},$$

donde  $f$  es la frecuencia y  $A_{ij}$ ,  $X_i$  y  $E_i$  son los coeficientes de Fourier de las correspondientes variables  $a_{ij}$ ,  $x_i$  y  $\xi_i$ , respectivamente. Además,  $G_{1 \rightarrow 2}$  y  $G_{2 \rightarrow 1}$ , se comparan y las diferencias entre ellos definen la influencia causal.

En nuestro trabajo, aplicamos el análisis causal en el dominio tiempo-frecuencia mediante funciones implementadas en las bibliotecas GCCA (Seth, 2010) y HERMES (Niso et al. 2013). Las señales de LFP se normalizaron primero para valores  $z$  para eliminar la no estacionariedad de primer orden. Luego, la estacionariedad de covarianza se verificó mediante la prueba aumentada de Dickey-Fuller (ADF) y Kwiatkowski, Phillips, Schmidt y prueba de Shin (KPSS). Los valores DTF se calcularon solo para las épocas estacionarias. Con el fin de evaluar interacciones significativas de causalidad temporal, se aplicó la prueba F con corrección de Bonferroni.

## ■ Tratamiento estadístico

Para comparar el grupo control y el grupo con HA crónica se realizaron t-Test para las muestras desapareadas con igual varianza o un t-Test con la corrección de Welch's para las muestras desapareadas con varianzas significativamente diferentes. Para comprobar el

efecto de los diferentes grupos y el de efecto la estimulación auditiva se realizaron ANOVAs de 2 vías y con post-test Tukey o Sidak para las múltiples comparaciones.

### 3.1.3 Expresión en membrana de receptores NMDA y GABA

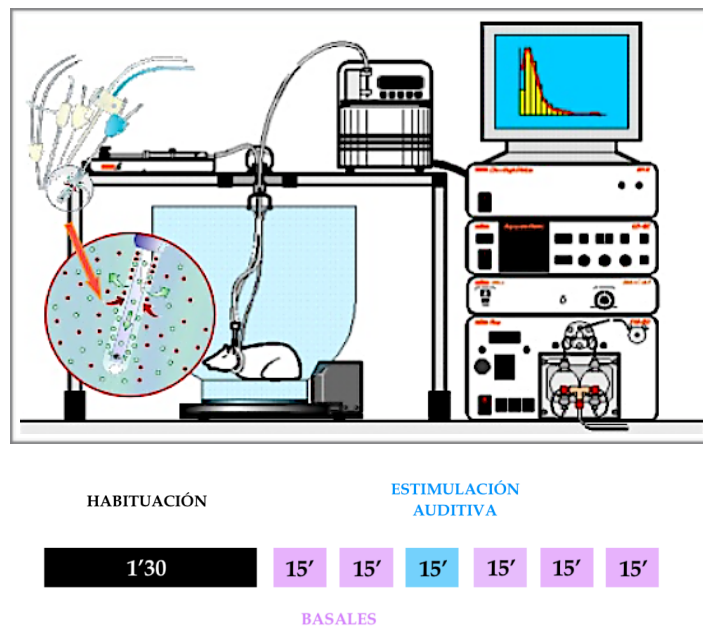
Las ratas se sacrificaron y se sacó rápidamente el cerebro y se transfirió a tampón estándar (Krebs) enfriado con hielo (en mM): NaCl 121, KCl 1,87, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,17, NaHCO<sub>3</sub> 26,2, CaCl<sub>2</sub> 2,5 y glucosa 11 aoxigenado con 95% de O<sub>2</sub> + 5% de CO<sub>2</sub> (pH 7,4). Los hipocampos se diseccionaron, se cortaron secciones transversales (400 µm) y se añadieron a tubos que contenían tampón Krebs frío con o sin BS<sup>3</sup> 2 mM (Pierce, Rockford, IL). Las muestras tratadas o no con BS<sup>3</sup> se analizaron mediante Western blot como describen Boudreau y Wolf (2005). Los anticuerpos primarios utilizados fueron contra las subunidades del receptor de glutamato: GluA1 (1:1000), GluA2 (1:2000) de Millipore; contra las subunidades del receptor AMPA: GluN2A (1:1000) y GluN2B (1:1000) de Millipore y contra GluN1 (1:1000) de BD Pharmingen. Contra las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>: GABA<sub>A</sub>α1 (1:1000) de Abcam y GABA<sub>A</sub>α5 (1:1000) de GenTex. El tratamiento con BS<sup>3</sup> 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 BS<sup>3</sup>, 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 BS<sup>3</sup> 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 localizado en membrana). La expresión de membrana de los receptores se calculó como la diferencia entre la intensidad de las bandas sin BS<sup>3</sup> (proteína total) y las con BS<sup>3</sup> (proteína no localizada en membrana).

### 3.1.4 Análisis de glutamato y GABA extracelular en hipocampo por microdiálisis *in vivo*

La técnica de microdiálisis consiste en la implantación de una sonda cuyo extremo consiste en una membrana de diálisis semipermeable en una región cerebral a través de la cual se produce un intercambio de sustancias entre el líquido extracelular y el interior de la membrana que contiene como medio de perfusión líquido cefalorraquídeo artificial. Las moléculas de interés difundirán hacia el interior de la membrana a favor de gradiente de concentración y serán recogidos a través del fluido de perfusión para su posterior análisis.

Cinco semanas después de iniciar la dieta de amonio se anestesiaron las ratas 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 hipocampo

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 hipocampo: -2,8 mm anteroposterior, 1,7 mm medio lateral y 3 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. Para reproducir las mismas condiciones con las que se adquirirían los registros de EEG y los PEAs, también se insertaron los electrodos en las áreas de registro correspondientes: colículo inferior, corteza auditiva primaria, hipocampo y corteza prelímbica (ver apartado 3.1.2). Después se suturó la piel y se devolvieron las ratas individualmente a sus jaulas durante un periodo de 1 semana hasta el momento de realizar la microdiálisis cerebral.



**Figura 35:** Esquema de microdiálisis y protocolo estimulación

Tras un periodo de adaptación de hora y media se inició la toma de muestras a través de la sonda de microdiálisis. La microdiálisis cerebral se realizó mientras se aplicaba simultáneamente el mismo protocolo de estimulación auditiva utilizado para la obtención del potencial evocado MMN. Las muestras se recogían cada 15 minutos: las 4 primeras muestras se recogieron sin estimulación auditiva. Las muestras se congelaban

inmediatamente después de su recogida y se almacenaron para su posterior análisis por HPLC-masas (Figura 35).

La separación cromatográfica de glutamato y GABA se realizó en un sistema de HPLC con una columna de sílice HICIC de Waters Atlantis (3,0 micrómetros id, 100 mm x 2,1 mm). La fase móvil estaba compuesta de ácido fórmico al 0,1% en agua (A) y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo (B) usando el siguiente programa de gradiente: 90% A 0-1.5 min, 15% A a 1.7 min, 15% A 3 min; 90% A 3.1 min y 90% A 4.5 min. El caudal fue de 0,4 ml/min; la temperatura de la columna era 30 C° y el volumen de inyección era 30 µL. Un QTRAP 4500 de ABSCIEX® equipado con una fuente de iones ESI fue operado en modo de iones positivos. Se utilizaron las siguientes condiciones: potencial de entrada 10, gas de cortina 20, potencial de eliminación de 46 V, energía de colisión 15 eV, GAS1 40 y GAS2 30, 600 °C y 4500 V en modo MRM con la siguiente transición para la cuantificación de GABA: 104> 87 y Glutamato 148>84.

## 3.2 PACIENTES CON ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA

### Descripción de los participantes:

En el presente estudio se seleccionaron 39 pacientes con cirrosis hepática diagnosticada por biopsia hepática o por combinación de criterios clínicos, analíticos y radiológicos, todos ellos tratados en el Hospital Clínico Universitario de Valencia y del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia. En el estudio también participaron 24 controles sanos. Todos los participantes seleccionados fueron informados y firmaron un consentimiento informado para formar parte de los distintos estudios. El proyecto fue aprobado por los Comités Éticos de ambos hospitales, y se desarrolló de acuerdo con la Declaración de Helsinki (1975).

### Se excluyeron del estudio aquellos participantes que presentaban los siguientes criterios:

- Deterioro cognitivo resultante de otra patología neuropsiquiátrica.
- Consumo de alcohol en los últimos 6 meses.
- Insuficiencia hepática avanzada (índice MELD > 25).
- EH clínica (escala de West-Haven  $\geq 1$ ).
- Hepatocarcinoma u otra patología con una supervivencia estimada menor a 3 meses.
- Derivación porto-sistémica intrahepática transyugular o shunt porto-sistémico quirúrgico ó peritonitis bacteriana espontánea.

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

### Protocolo del estudio:

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

- Datos demográficos: edad, sexo y nivel de formación.
- Etiología de la cirrosis (alcohol, virus de la hepatitis C, etc).
- Presencia de otras patologías (cáncer, diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia renal, hipertensión arterial, etc).
- Descompensaciones: presencia de varices esofágicas, episodios anteriores de EH, presencia de ascitis, hipertensión portal.
- Parámetros séricos de laboratorio (enzimas indicadoras de la función hepática, bilirrubina, albúmina, hemograma, marcadores tumorales...)

- Cálculo de los índices de función hepática Child-Pugh y MELD (ver página 9).
- Tratamiento farmacológico del paciente
- Hábitos dietéticos (restricción proteica, etc.)

Se citó a los pacientes y a los controles y se les tomó una muestra de sangre. El mismo día, realizaron la batería de tests psicométricos que describiremos a continuación. Por otro lado, en estos mismos pacientes, y en el plazo a una semana desde la realización de los tests psicométricos y la extracción de sangre, se les realizó la adquisición de imágenes de RM cerebral que describiremos más detalladamente en el apartado 3.2.4

### 3.2.1 Extracción de la sangre

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

Las muestras de suero (5 ml) se extrajeron con tubos *BD Vacutainer*® sin EDTA y se centrifugaron a 3000 x g, 10 m a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante y se conservó a -80°C en alícuotas de 200 µl para la posterior determinación de citocinas pro-inflamatorias.

Otra muestra de sangre (5 ml) se tomó en tubos *BD Vacutainer*® con EDTA y no se centrifugó, para la medición inmediata del amonio.

#### 3.2.1.1 Determinación de GMPc

El GMPc se midió utilizando un kit de enzima inmunoensayo (*Amersham Biotrak de GE Healthcare*®). Se emplearon 50 µl de las muestras de plasma.

#### Protocolo:

El fabricante nos proporciona varios protocolos, según la muestra utilizada. En nuestro caso, seguimos el protocolo de acetilación que consiste en acetilar las muestras y las soluciones estándar (2-512 fmol) con una mezcla de un volumen de anhídrido acético y dos de trietanolamina. Una vez acetiladas las muestras y la curva patrón, las cargamos en la placa tapizada con un anticuerpo específico que reconoce el anticuerpo frente a GMPc. A continuación, añadimos el anticuerpo frente a GMPc y después de 2 h de incubación a 4°C, añadimos GMPc conjugado con peroxidasa, el cuál competirá con el GMPc de las muestras por los sitios de unión del GMPc en el anticuerpo. Tras una nueva incubación de

1 h a 4°C, lavamos, y añadimos una solución tetrametil-bencidina (TMB) , sustrato de la peroxidasa, dejándola actuar unos 30 minutos a temperatura ambiente hasta que la curva estándar desarrolle color y, entonces detenemos la reacción con ácido sulfúrico 1 M y leemos la absorbancia a 450 nm.

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

### 3.2.1.2 Determinación de citocinas pro-inflamatorias

#### ■ Determinación de interleucina 18 en suero

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

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

#### ■ Determinación de interleucina 6 en suero

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

El ensayo se realizó siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante del kit. El experimento comienza con la adición del anticuerpo biotinilado a todos los pocillos, seguido de la adición de 50 µl de la curva patrón (0-400 pg/ml) y de muestra a los pocillos correspondientes y se incuba 2 horas a temperatura ambiente. Una vez incubada, se añade una solución de estreptavidina conjugada con HRP y se incuba de nuevo 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, añadimos la solución de revelado TMB



(tetrametilbenzidina) incubamos. Finalmente se detiene la reacción por adición de la solución 'Stop' (ácido) y leemos la absorbancia a 450 nm en un lector de placas.

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

### 3.2.1.3 Determinación de amonio en sangre

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

El kit consiste en unas tiras que contienen una capa receptora de muestra compuesta de ácido bórico ( $H_3BO_3=42,6$  mg) e hidróxido sódico ( $NaOH=18,7$  mg) y una capa indicadora compuesta de verde de bromocresol (4,0 mg).

Cuando se aplica la muestra a la capa receptora de la tira, el agente amortiguador de pH impregnado en ésta (tampón borato) se disuelve volviendo alcalina la muestra. Los iones amonio ( $NH_4^+$ ) de la muestra pasan por el pH alcalino a amonio gas ( $NH_3$ ) que pasa a través de los poros del distanciador al indicador (verde de bromocresol) produciendo color. El grado de coloración es proporcional a la concentración de amonio gas producido, por lo que el aparato determina cuantitativamente el nivel de amonio en la muestra midiendo el color de la tira.

#### □ Protocolo:

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

### 3.2.2 Valoración de la función cognitiva en los participantes

Los pacientes eran citados en el Hospital Clínico Universitario de Valencia para realizar una amplia valoración cognitiva.

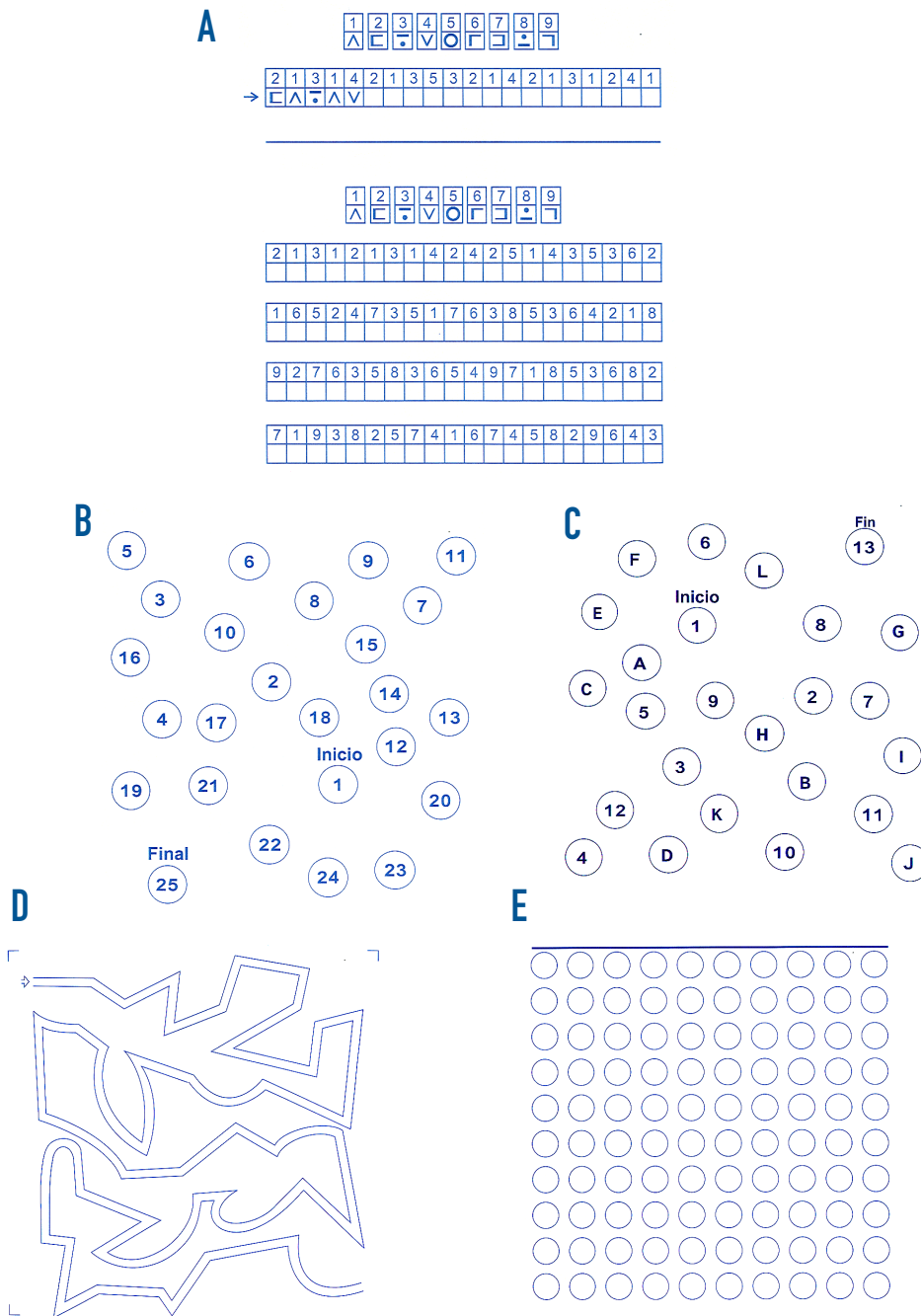
La valoración cognitiva se realizaba en un solo día y tenía una duración aproximada de 1 hora y 30 min. Las pruebas cognitivas se describen a continuación:

### ■ Batería PHES

Para el diagnóstico de la EHM se utilizó la batería de tests psicométricos PHES, considerada como 'gold standard' para el diagnóstico de la EHM (Weissenborn et al, 2001; Ferenci et al , 2002).

La batería PHES consta de los siguientes test psicométricos (Figura 36):

1. **Test de Dígitos y Símbolos (DST):** Evalúa velocidad de procesamiento, destreza visuomotora y memoria de trabajo. Consiste en una serie de números (1-9) cada uno de los cuales lleva asociado un símbolo diferente. El sujeto debe emparejar cada símbolo con el número que el corresponde en un máximo de tiempo de 90 segundos. El test se puntúa teniendo en cuenta el número de aciertos realizados en dicho tiempo.
2. **Test de conexión numérica A (NCT-A):** evalúa velocidad de procesamiento y la atención. Consiste en un conjunto de números (del 1 al 25) colocados de forma desordenada. El sujeto tiene que unir los números en orden ascendente (1-2-3...-25) trazando líneas sin levantar el rotulador del papel. Se puntúan los segundos que se tarda en completar la prueba.
3. **Test de conexión numérica B (NCT-B):** evalúa la velocidad de procesamiento y la atención. Consiste en un conjunto de números (del 1 al 13) y letras (de la A a la L), colocados de forma desordenada. El sujeto tiene que unir los números con las letras de forma alterna primero un número y luego una letra, los números siguiendo el orden ascendente y las letras siguiendo el abecedario (1-A-2-B-3...-L-13), intentando no levantar el rotulador del papel. Se puntúan los segundos que se tarda en realizar la tarea.
4. **Test de puntos seriados (SD):** evalúa la coordinación visuoespacial. Consiste en un conjunto de círculos en donde el sujeto tiene que marcar con el rotulador un punto en el centro. Se puntúa el tiempo en segundos que se tarda en completar la tarea .
5. **Test de línea quebrada (LTT):** evalúa la coordinación visuoespacial. Consiste en realizar un recorrido con un rotulador, sin levantar éste del papel, entre dos líneas con tramos rectos y curvos, que el sujeto debe evitar tocar y salirse de ellas. Se puntúa el tiempo en segundos que se tarda en completar la tarea. Se utiliza una plantilla de corrección con el tramo recorrido dividido en cuadros. Se penaliza con segundos de más el número de cuadros en los que el sujeto toca o se sale del recorrido



**Figura 36:** Bateria PHES (*Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*): A) Test de Dígitos y Símbolos (DST); B) Test de conexión numérica A (NCT-A); C) Test de conexión numérica B (NCT-B); D) Test de puntos seriados (SD); E) Test de línea quebrada (LTT).

Para el cálculo numérico del PHES se utiliza una aplicación informática (La aplicación se encuentra en la página web <http://www.redeh.org>) en la que se introducen los siguientes datos: edad del sujeto, nivel de estudios y los datos obtenidos para cada uno de

los subtest. Una vez introducidos estos datos, el programa realizando un ajuste por edad y el nivel de estudios, puntúa cada subtest con un valor numérico (número entero) positivo o negativo dependiendo de si el sujeto ha realizado la tarea mejor o peor de lo esperado respectivamente y, suma todos los subtests, obteniéndose una puntuación global del PHES. Se compara la puntuación de cada sujeto con los valores de referencia normativos obtenidos para la población española por la Red Española de Encefalopatía Hepática (Romero-Gómez et al, 2006). Se diagnostica EHM cuando el paciente obtiene una puntuación global de -4 o menor.

■ Test Stroop de colores y palabras

El test de Stroop de Colores y Palabras (Stroop, 1935) es una prueba que evalúa atención selectiva y sostenida y las funciones cognitivas de flexibilidad cognitiva/control inhibitorio.

La prueba consta de tres hojas (Figura 37), en las cuales se muestran diferentes estímulos:

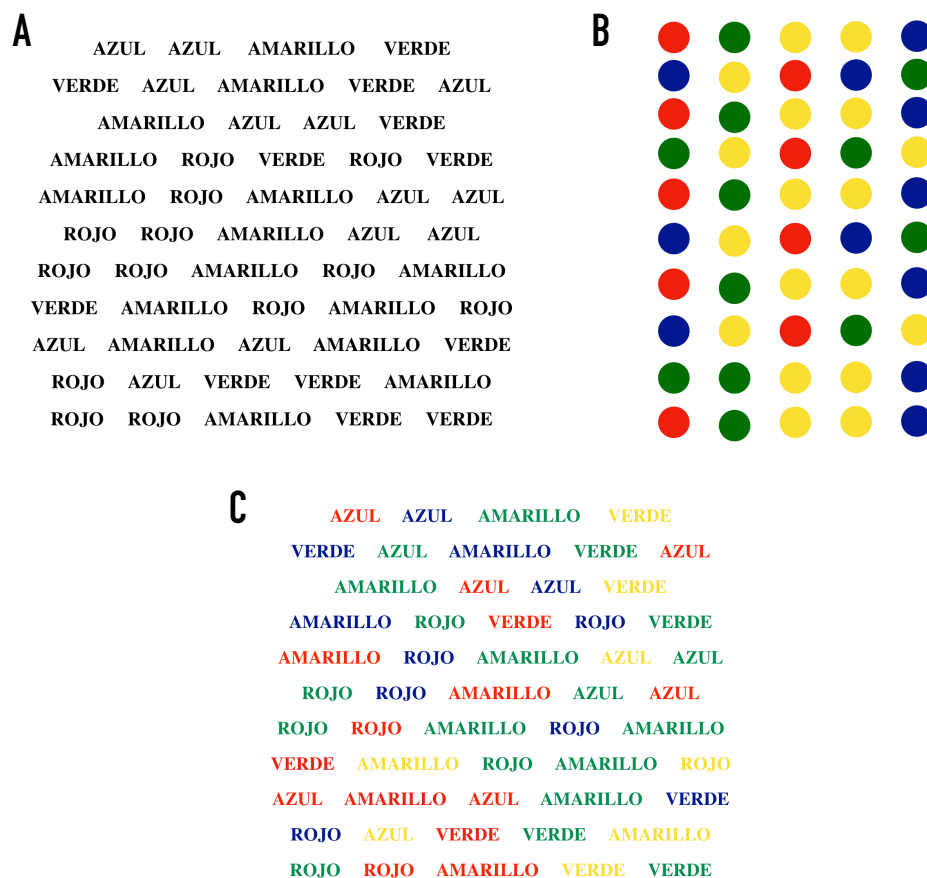


Figura 37: Stroop A) Tarea congruente; B) Tarea neutra; C) Tarea incongruente

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

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

En este test obtenemos tres puntuaciones directas principales: número de palabras (P), número de colores (C) y número de palabras-colores (PC). Los errores no se tienen en cuenta pero producen una puntuación directa menor, ya que el sujeto es detenido para que repita el elemento. Una vez obtenidos los valores de P, C y PC, se corrigen según la edad del individuo (Golden, 2001).

A partir de estos parámetros corregidos (P, C, PC) se calcula un parámetro denominado interferencia, que mide básicamente la flexibilidad cognitiva/procesos inhibitorios del individuo. Para determinar la puntuación de la interferencia pura se calcula la diferencia entre PC y la PC estimada (PC').

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

## ■ Test d2

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

En este test se reflejan tres componentes de la conducta atencional: velocidad o cantidad de trabajo realizado en un determinado tiempo; calidad de dicho trabajo (precisión) y relación entre velocidad y precisión (Brickenkamp R, *Test d2*, Adaptación de TEA Ediciones, 2009).

El test consiste en una hoja compuesta por 14 líneas con 47 caracteres cada una, las cuales contienen como estímulo visual las letras 'd' y 'p' acompañadas de una o dos pequeñas rayitas en la parte superior de cada letra, en la inferior, o en ambas. El individuo tiene 20 segundos por línea para revisar atentamente, de izquierda a derecha, el contenido y marcar sólo las 'd' que contengan dos rayitas en total (las dos arriba, las dos debajo o una arriba y otra debajo), siendo éstos los estímulos correctos o *relevantes*. Las demás combinaciones ('p' con o sin rayitas y 'd' con una, tres o cuatro rayitas) se consideran *irrelevantes* y no deben ser marcadas (Figura 38).

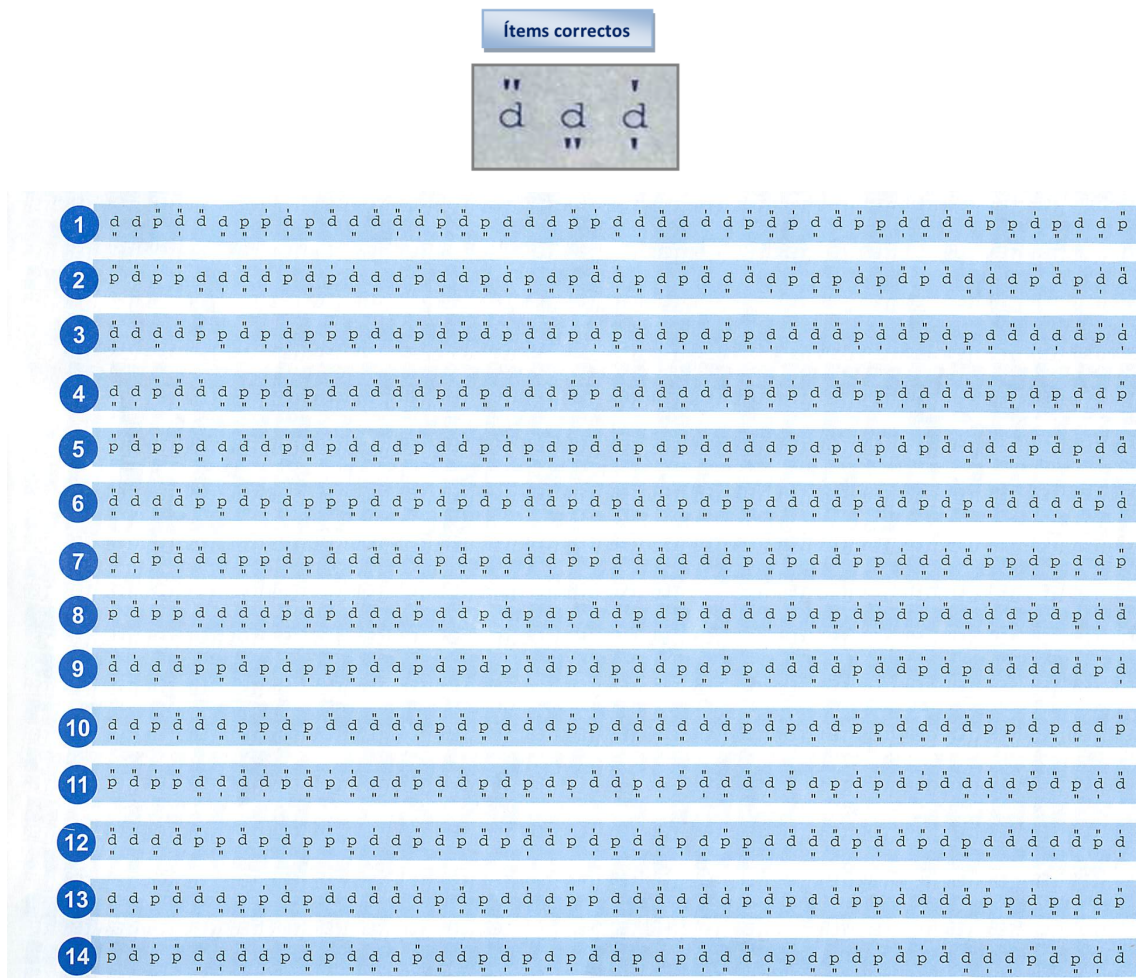


Figura 38: Test d2



Las puntuaciones que podemos obtener de este test son múltiples:

- **Total de respuestas (TR):** es el número de casilla al que corresponde la última marca de cada línea. La suma de la TR de las 14 líneas nos proporciona una medida de la velocidad de procesamiento y cantidad de trabajo realizado.
- **Total de aciertos (TA):** es el número de elementos relevantes que han sido marcados. La suma de la TA de las 14 líneas es una medida de la precisión del procesamiento.
- **Errores:** por un lado valoramos el número de omisiones (O) de las 14 líneas, es decir, elementos *relevantes* no marcados hasta el último elemento marcado y por otro el número de comisiones (C) o elementos irrelevantes marcados de las 14 líneas.
- **Efectividad total en la prueba (TOT):** se calcula como la diferencia de TR total y los errores totales de las 14 líneas ( $TOT = TR - [O+C]$ ).
- **Índice de concentración (CON):** se calcula como la diferencia de total de aciertos y errores por comisión ( $CON = TA - C$ ) de las 14 líneas. Este parámetro es una medida de concentración.

Una vez obtenidos todos los parámetros descritos, consultamos en los baremos (según el grupo de edad del sujeto) la puntuación que corresponde a cada variable.

### ■ **Symbol Digit Modalities Test (SDMT)**

Esta prueba mide la velocidad de procesamiento y atención selectiva.

La tarea es muy similar al subtest de 'Símbolos y Dígitos' de la batería PHES, pero en este caso se le muestran al sujeto símbolos asociados a números y la tarea consiste en que debe asociar los símbolos con cada número durante 90 segundos. La ventaja de este test en referencia al test de Símbolos y Dígitos de la batería PHES es que se puede pasar de forma oral o escrita. La forma oral se selecciona cuando la prueba se usa en pacientes que presentan problemas motores que pueden interferir en la realización de la tarea (como es el caso de los pacientes con EHM). La puntuación de la prueba es el número de aciertos que el sujeto realiza durante 90 segundos (Figura 39).



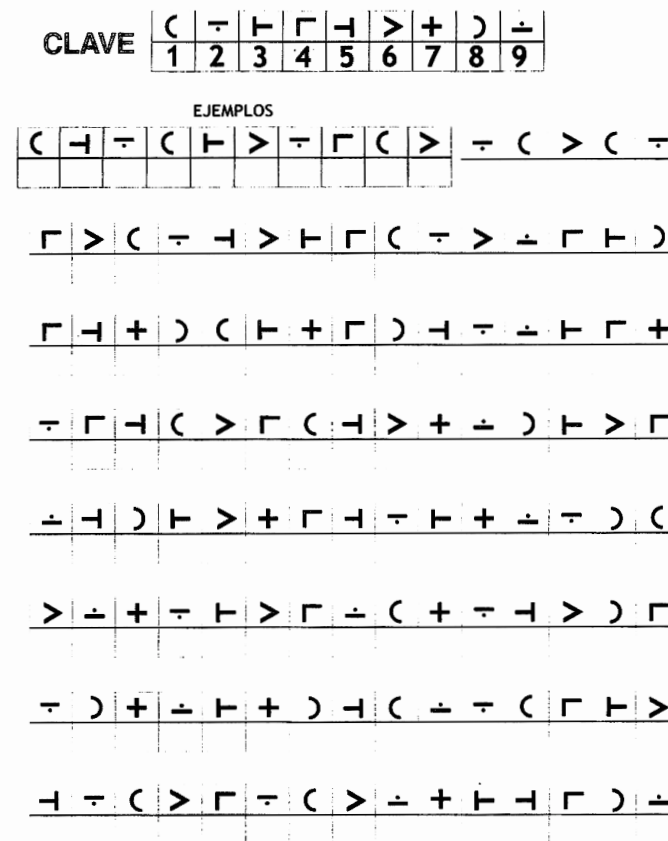


Figura 39: Symbol Digit Modalities Test

■ Subtest de dígitos directos e inversos

Esta tarea es un subtest que forma parte de la batería Escala de inteligencia de Wechsler para adultos (WAIS del inglés *Wechsler Adult Intelligence Scale*). La tarea de dígitos directos mide atención selectiva y memoria inmediata verbal, y la tarea de dígitos inversos valora también memoria de trabajo verbal.

**Dígitos directo:** la prueba consiste en bloques de dos series de números, empezando primero por series cortas que se van alargando conforme pasamos de bloque (Figura 36B). La tarea se realiza leyéndole al sujeto los números de la serie, los cuáles tiene que repetir seguidamente en el mismo orden (p.e 3-7-2 sería 3-7-2) (Figura 40).

**Dígitos inverso:** la prueba es similar a la de ‘Dígitos Directo’, pero en este caso el sujeto tiene que repetir inmediatamente la serie de números de manera inversa (p.e. 1-5-8-4 sería 4-8-5-1) (Figura 40).

En ambas tareas (dígitos directo y dígitos inversos), la serie repetida correctamente se puntúa con un '1', y la incorrecta con un '0'. La prueba termina cuando la puntuación de todas las series del mismo bloque es incorrecta (igual a '0'). Obtenemos una puntuación global del test de Dígitos sumando las dos puntuaciones (dígitos directos+dígitos inversos).

| Directo:    |                                   |           |                 |              |     |
|-------------|-----------------------------------|-----------|-----------------|--------------|-----|
| Item        | Intento                           | Respuesta | Puntaje intento | Puntaje item |     |
| 16-50<br>1. | 9 - 7                             |           | 0 1             | 0            | 1 2 |
|             | 6 - 3                             |           | 0 1             |              |     |
| 2.          | 5 - 8 - 2                         |           | 0 1             | 0            | 1 2 |
|             | 6 - 9 - 4                         |           | 0 1             |              |     |
| 3.          | 7 - 2 - 8 - 6                     |           | 0 1             | 0            | 1 2 |
|             | 6 - 4 - 3 - 9                     |           | 0 1             |              |     |
| 4.          | 4 - 2 - 7 - 3 - 1                 |           | 0 1             | 0            | 1 2 |
|             | 7 - 5 - 8 - 3 - 6                 |           | 0 1             |              |     |
| 5.          | 3 - 9 - 2 - 4 - 8 - 7             |           | 0 1             | 0            | 1 2 |
|             | 6 - 1 - 9 - 4 - 7 - 3             |           | 0 1             |              |     |
| 6.          | 4 - 1 - 7 - 9 - 3 - 8 - 6         |           | 0 1             | 0            | 1 2 |
|             | 6 - 9 - 1 - 7 - 4 - 2 - 8         |           | 0 1             |              |     |
| 7.          | 3 - 8 - 2 - 9 - 6 - 1 - 7 - 4     |           | 0 1             | 0            | 1 2 |
|             | 5 - 8 - 1 - 3 - 2 - 6 - 4 - 7     |           | 0 1             |              |     |
| 8.          | 2 - 7 - 5 - 8 - 6 - 3 - 1 - 9 - 4 |           | 0 1             | 0            | 1 2 |
|             | 7 - 1 - 3 - 9 - 4 - 2 - 5 - 6 - 8 |           | 0 1             |              |     |

| Inverso:    |                               |                               |           |                 |              |
|-------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------------|--------------|
| Item        | Intento                       | Respuesta correcta            | Respuesta | Puntaje intento | Puntaje item |
| 16-50<br>P. | 7 - 1                         | 1 - 7                         |           | 0 1             |              |
|             | 3 - 4                         | 4 - 3                         |           |                 |              |
| 16-50<br>1. | 3 - 1                         | 1 - 3                         |           | 0 1             | 0 1 2        |
|             | 2 - 4                         | 4 - 2                         |           |                 |              |
| 2.          | 4 - 6                         | 6 - 4                         |           | 0 1             | 0 1 2        |
|             | 5 - 7                         | 7 - 5                         |           |                 |              |
| 3.          | 6 - 2 - 9                     | 9 - 2 - 6                     |           | 0 1             | 0 1 2        |
|             | 4 - 7 - 5                     | 5 - 7 - 4                     |           |                 |              |
| 4.          | 8 - 2 - 7 - 9                 | 9 - 7 - 2 - 8                 |           | 0 1             | 0 1 2        |
|             | 4 - 9 - 6 - 8                 | 8 - 6 - 9 - 4                 |           |                 |              |
| 5.          | 6 - 5 - 8 - 4 - 3             | 3 - 4 - 8 - 5 - 6             |           | 0 1             | 0 1 2        |
|             | 1 - 5 - 4 - 8 - 6             | 6 - 8 - 4 - 5 - 1             |           |                 |              |
| 6.          | 5 - 3 - 7 - 4 - 1 - 8         | 8 - 1 - 4 - 7 - 3 - 5         |           | 0 1             | 0 1 2        |
|             | 7 - 2 - 4 - 8 - 5 - 6         | 6 - 5 - 8 - 4 - 2 - 7         |           |                 |              |
| 7.          | 8 - 1 - 4 - 9 - 3 - 6 - 2     | 2 - 6 - 3 - 9 - 4 - 1 - 8     |           | 0 1             | 0 1 2        |
|             | 4 - 7 - 3 - 9 - 6 - 2 - 8     | 8 - 2 - 6 - 9 - 3 - 7 - 4     |           |                 |              |
| 8.          | 9 - 4 - 3 - 7 - 6 - 2 - 1 - 8 | 8 - 1 - 2 - 6 - 7 - 3 - 4 - 9 |           | 0 1             | 0 1 2        |
|             | 7 - 2 - 8 - 1 - 5 - 6 - 4 - 3 | 3 - 4 - 6 - 5 - 1 - 8 - 2 - 7 |           |                 |              |

Figura 40: Subtest de dígitos directos e inversos

■ Subtest de letras y números

Este subtest de la batería WAIS evalúa atención y también memoria de trabajo. Tiene más carga de memoria de trabajo que el de Dígitos, ya que es necesario manipular un mayor número de información durante un corto período de tiempo. La tarea consta de bloques de tres series que contienen letras y números mezclados; el número de elementos de cada serie aumenta conforme avanza la prueba. Una vez presentados en voz alta la serie de letras y números, la tarea consiste en que el paciente debe ordenar primero los números y después las letras en orden (número de menor a mayor y letras en orden del abecedario).

(p.e W-3-1-J sería 1-3-J-W) (Figura 36). La corrección se realiza igual que en 'Digitos' (Figura 41) y la prueba no acaba hasta que no se fallen las tres series de un mismo bloque.

| Ensayo          | Respuesta correcta |                 | Respuesta al pla de la letra | Puntuación del ensayo | Puntuación del reactivo |
|-----------------|--------------------|-----------------|------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| B-1             | 1-B                | B-1             |                              | 0 1                   | 0 1 2 3                 |
| 2-C             | 2-C                | C-2             |                              | 0 1                   |                         |
| C-4             | 4-C                | C-4             |                              | 0 1                   | 0 1 2 3                 |
| 5-E             | 5-E                | E-5             |                              | 0 1                   |                         |
| D-3             | 3-D                | D-3             |                              | 0 1                   |                         |
| B-1-2           | 1-2-B              | B-1-2           |                              | 0 1                   | 0 1 2 3                 |
| 1-3-C           | 1-3-C              | C-1-3           |                              | 0 1                   |                         |
| 2-A-3           | 2-3-A              | A-2-3           |                              | 0 1                   |                         |
| D-2-9           | 2-9-D              | D-2-9           |                              | 0 1                   | 0 1 2 3                 |
| R-5-B           | 5-B-R              | B-R-5           |                              | 0 1                   |                         |
| 9-J-4           | 4-9-J              | J-4-9           |                              | 0 1                   |                         |
| B-5-F           | 5-B-F              | B-F-5           |                              | 0 1                   |                         |
| 1-C-3-J         | 1-3-C-J            | C-J-1-3         |                              | 0 1                   | 0 1 2 3                 |
| 5-A-2-B         | 2-5-A-B            | A-B-2-5         |                              | 0 1                   |                         |
| D-8-M-1         | 1-8-D-M            | D-M-1-8         |                              | 0 1                   |                         |
| 1-B-3-G-7       | 1-3-7-B-G          | B-G-1-3-7       |                              | 0 1                   | 0 1 2 3                 |
| 9-V-1-T-7       | 1-7-9-T-V          | T-V-1-7-9       |                              | 0 1                   |                         |
| P-3-J-1-M       | 1-3-J-M-P          | J-M-P-1-3       |                              | 0 1                   |                         |
| 1-D-4-E-9-G     | 1-4-9-D-E-G        | D-E-G-1-4-9     |                              | 0 1                   | 0 1 2 3                 |
| H-3-B-4-F-8     | 3-4-8-B-F-H        | B-F-H-3-4-8     |                              | 0 1                   |                         |
| 7-Q-6-M-3-Z     | 3-6-7-M-Q-Z        | M-Q-Z-3-6-7     |                              | 0 1                   |                         |
| S-3-K-4-Y-1-G   | 1-3-4-G-K-S-Y      | G-K-S-Y-1-3-4   |                              | 0 1                   | 0 1 2 3                 |
| 7-S-9-K-1-T-6   | 1-6-7-9-K-S-T      | K-S-T-1-6-7-9   |                              | 0 1                   |                         |
| L-2-J-6-Q-3-G   | 2-3-6-G-J-L-Q      | G-J-L-Q-2-3-6   |                              | 0 1                   |                         |
| 4-B-8-R-1-M-7-H | 1-4-7-8-B-H-M-R    | B-H-M-R-1-4-7-8 |                              | 0 1                   | 0 1 2 3                 |
| J-2-U-8-A-5-C-4 | 2-4-5-8-A-C-J-U    | A-C-J-U-2-4-5-8 |                              | 0 1                   |                         |
| 6-L-1-Z-5-H-2-W | 1-2-5-6-H-L-W-Z    | H-L-W-Z-1-2-5-6 |                              | 0 1                   |                         |

Figura 41: Subtest de letras y números

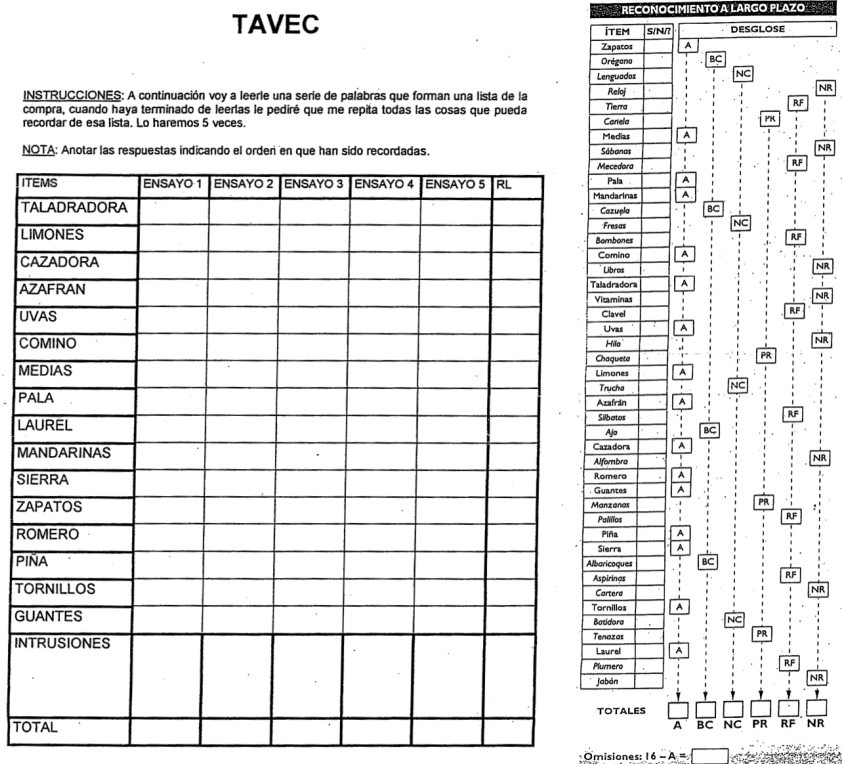
■ Test de aprendizaje verbal España Complutense (TAVEC)

El aprendizaje y la memoria a largo plazo verbal se evaluaron con el TAVEC (Benedet MJ y Alejandro MÁ., 2014), la versión baremada para población de habla castellana del de *California Verbal Learning Test (CVLT)* (Delis et al., 1987). La versión resumida que hemos utilizado en esta tesis implica una fase de aprendizaje, durante la que se presentan un total de 16 palabras. El examinador lee la lista de palabras completa y el sujeto las debe repetir todas las que recuerde en el orden que quiera. Esto se repite durante 5 ensayos, obteniéndose la curva de aprendizaje y una puntuación total que refleja la capacidad de consolidación de la información de los sujetos. Transcurridos 20 minutos (tiempo que dedicamos a la realización de otras tareas cognitivas), se le pide al sujeto que recuerde las palabras aprendidas anteriormente, de esta forma valoramos la memoria a largo plazo verbal (o capacidad de almacenamiento de la información). A la prueba de recuerdo libre

le sigue una prueba de reconocimiento, en la que se presentan palabras presentadas previamente durante el aprendizaje y otras palabras intrusas. El participante debe decir si la palabra que oye la ha aprendido previamente o no. Esta parte de la prueba valora la capacidad de recuperación de la información almacenada.

En resumen, las puntuaciones obtenidas son:

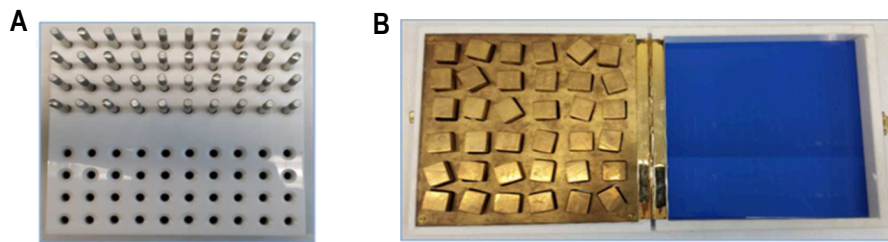
- **Aprendizaje total:** número total de palabras recordadas, es decir la suma de las palabras recordadas a lo largo de los 5 ensayos.
- **Recuerdo a largo plazo:** número de palabras recordadas después de 20 minutos.
- **Reconocimiento:** número de palabras recuperadas en el ensayo de reconocimiento.



**Figura 42:** Test de aprendizaje verbal España Complutense (TAVEC)

### 3.2.3 Valoración de las funciones motoras

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



**Figura 43:** Test de coordinación bi-manual (A) y visuo-motora (B)

### ■ Tests de coordinación bimanual

Este test consiste en un tablero perforado con dos matrices de 4 filas con 10 agujeros cada una (Figura 43A). La prueba consiste en pasar unas clavijas metálicas de una matriz a la otra del tablero. Las clavijas se han de pasar con ambas manos simultánea y simétricamente, por filas, de fuera hacia dentro. Esta tarea se realiza dos veces en cada dirección y se puntúa con el tiempo que se tarda en pasar las clavijas de una matriz a otra. Se suman las centésimas de minuto de los cuatro intentos y mediante una tabla estandarizada para el test se le da un valor de percentil al tiempo de realización, según el sexo del individuo, puesto que la tipificación del test mostró que las mujeres necesitan más tiempo para realizar la tarea.

### ■ Tests de coordinación visuo-motora

Este test consiste en un tablero con una matriz de 6 filas y 6 columnas de perforaciones rectangulares, con diferente orientación, en las cuales se tienen que encajar unas piezas metálicas utilizando solo la mano dominante. Se realiza por filas, de izquierda a derecha y todas las piezas caben en cualquier agujero, siempre que se coloquen en la orientación correcta. La prueba se realiza dos veces y se puntúa según el tiempo que se tarda en colocar todas las piezas. Se suma el tiempo en centésimas de minuto de los dos intentos y mediante una tabla estandarizada para el test se le da un valor de percentil al tiempo de realización, según el sexo del individuo, por el mismo motivo que el test anterior (Figura 43B).

## 3.2.4 Adquisición de las imágenes de Resonancia Magnética

Una semana después de la valoración neuropsicológica, los pacientes (26 sin EHM y 13 con EHM) y controles (n=24) fueron valorados radiológicamente en el centro de

radiodiagnóstico ERESA. Se utilizó un escáner Philips Achieva de 3 T (*Philips Medical Systems*®) y se adquirieron para cada uno de los participantes las siguientes secuencias:

- Imágenes estructurales tridimensionales sagitales de alta resolución 3D MPRAGE T1 (TR = 8,42 ms, TE = 3,8 ms, matriz = 320 x 320 x 250, tamaño de vóxel = 1 x 1 x 1 mm, ángulo de inclinación = 8°).
- Secuencia de estado de reposo de fMRI de imágenes eco-planar ponderada con eco de gradiente (EPI) T2 \* (5 min, 150 volúmenes, TR = 2000 ms, TE = 30 ms, matriz = 80 x 80 x 31, tamaño de vóxel = 3 x 3 x 3 mm, ángulo de inclinación = 85°). Durante la adquisición de esta secuencia, los sujetos fueron instruidos para mantener los ojos abiertos, permanecer inmóviles, relajarse y no pensar en nada en particular.

### 3.2.4.1 Análisis del volumen de sustancia gris y conectividad funcional en redes ICA

#### ■ Morfometría basada en voxel

Las imágenes 3D ponderadas en T1 se reorientaron tomando como referencia la comisura blanca anterior y posterior y se pre-procesaron con un protocolo optimizado de VBM (del inglés *Voxel Based Morphometry*) utilizando la herramienta DARTEL (*Diffeomorphic Anatomical Registration Through Exponential Lie Algebra*) incluida en SPM12 (*Centro Wellcome Trust para Neuroimaging, Londres, Reino Unido*). El pre-procesado de las imágenes VBM incluyó los siguientes pasos: segmentación de las imágenes en sustancia gris, blanca y líquido cefalorraquídeo en el espacio nativo, normalización espacial a una plantilla específica de la población, modulación (para asegurar la preservación de la cantidad media de tejido de sustancia gris) y finalmente suavizado de 8 mm FWHM.

#### ■ Conectividad funcional basada en análisis de componentes independientes

Las imágenes de RM funcional en estado de reposo se pre-procesaron utilizando la herramienta DPARSF Advanced v.4 (Chao-Gan y Yu-Feng, 2010). El pre-procesado de las imágenes incluyó los siguientes pasos: eliminación de los 10 primeros volúmenes para permitir la calibración del escáner y la adaptación de los sujetos al ruido del escáner, corrección del tiempo de adquisición para una adquisición intercalada, realineamiento con el primer volumen de cada sesión, corrección del movimiento de la cabeza, corrección de registro, normalización espacial al espacio MNI (Montreal Neurological Institute) y suavizado de 4 mm FWHM.



Después del pre-procesado se excluyeron 4 sujetos (1 sujeto control y 2 pacientes con EHM) del análisis estadístico posterior debido al excesivo movimiento de cabeza.

El análisis de componentes independientes (ICA) se realizó utilizando la herramienta del Grupo ICA para resonancia magnética (RM) funcional (<http://mialab.mrn.org/software/gift>, version 3.0a) para encontrar las redes de estado de reposo predefinidas. Se aplicó un ICA espacial a nivel de grupo utilizando el criterio de descripción de longitud mínima para determinar el número óptimo de componentes independientes (CI), y utilizando el algoritmo Infomax ICA para extraer 30 CI. Cincuenta interacciones ICA se realizaron utilizando ICASSO para determinar la estabilidad del algoritmo ICA (Himberg et al., 2004) y los centrotipos estimados se utilizaron como CI representativos. Los mapas de CI individuales y las series temporales se calcularon utilizando una reconstrucción basada en los componentes agregados de CI y los resultado de los datos del paso de reducción y su conversión a una puntuación Z. Finalmente, se seleccionaron seis redes relacionadas con procesos cognitivos: la DMN (*Default Mode Network*), red frontoparietal izquierda (RFPI), la red de atención dorsal (RAD), la red sensitivo-motora (RSM), la red de saliencia (RS) y la red de ganglios basales (RGB).

### ■ Análisis estadístico

Los volúmenes regionales de sustancia gris y la CF-er de las redes entre los grupos se analizaron utilizando un diseño ANCOVA del SPM12® (Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, UCL, London, UK). Todos los resultados se analizaron con un valor de  $p < 0,05$  corregido por cluster por múltiples comparaciones (FWE, *Family-Wise Error*) en combinación con un umbral a nivel de vóxel no corregido de  $p < 0,001$  incluyendo el sexo como covariable. Los volúmenes de sustancia gris y los valores de CF-er de los clusters dónde hay diferencias significativas derivados de anteriores ANCOVAs (SPM *eigenvalues*) se extrajeron y se incluyeron en los análisis de correlación y en el análisis de curva ROC (del inglés *Receiver Operating Characteristic*) para evaluar el valor diagnóstico (discriminación de pacientes con y sin EHM) del volumen y CF-er.

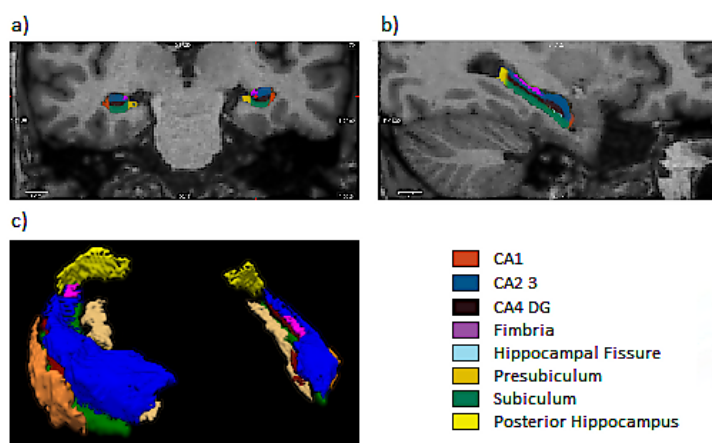
En este estudio se utilizaron los resultados obtenidos en el PHES para evaluar el deterioro cognitivo y los resultados obtenidos en otros test psicométricos para evaluar el deterioro cognitivo en múltiples dominios. Las diferencias significativas entre grupos en las variables demográficas, clínicas y neurofisiológicas fueron analizadas utilizando ANOVA con un post-hoc Bonferroni. Las diferencias significativas se estipularon a partir de una  $p < 0,05$ . Para realizar los cálculos, los datos fueron analizados con el software SPSS Version 20.0 (SPSS, Chicago, IL ®).

### 3.2.4.2 Análisis del volumen de sustancia gris y conectividad funcional del hipocampo

#### ■ Análisis de imágenes morfométricas del hipocampo

Las imágenes anatómicas ponderadas en T1 se procesaron y analizaron con la herramienta Freesurfer 5.3, en concreto se utilizó una herramienta específica para la segmentación volumétrica del hipocampo en subregiones (<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>). El procedimiento incluyó los siguientes pasos: corrección del movimiento de la cabeza, eliminación del tejido no cerebral, transformación automática de las imágenes a un espacio Talariach, segmentación de las estructuras subcorticales de sustancia blanca, sustancia gris subcortical, normalización de la intensidad, teselación de los límites de sustancia blanca y gris, corrección topológica automatizada y deformación de la superficie después de localizar los bordes de sustancia blanca, gris y líquido cefalorraquídeo de manera óptima en los lugares donde hay un mayor cambio de intensidad, que es lo que define la transición de un tejido a otro. La segmentación subcortical se logra al alinear la imagen de interés con un atlas (creado a partir de un conjunto de imágenes etiquetadas).

Posteriormente, se ejecuta el comando de reconstrucción automática de segmentación de subregiones del hipocampo. Este procedimiento utiliza la inferencia bayesiana y un atlas probabilístico de la formación del hipocampo, basado en segmentaciones manuales de las subregiones de imágenes de RM ponderadas en T1 de diferentes sujetos (Van Leemput et al., 2009). El proceso segmenta ambos hipocampos de cada sujeto en ocho subregiones, incluyendo *cornu ammonis 1* (CA1), *cornu ammonis 2-3* (CA2-3), *cornu ammonis 4-dentade gyrus* (CA4-DG), *subiculum*, *presubiculum*, *fimbria*, fisura del hipocampo e hipocampo posterior (Figura 44).



**Figura 44:** Segmentación de las subregiones del hipocampo en un sujeto. a) Corte coronal b) Corte axial de la segmentación del hipocampo en detalle. c) Vista 3d de las subregiones de hipocampo de interés binarias en el espacio MNI.



Se obtuvieron dos resultados en este análisis: 1) Una región de interés (ROI probabilística) para cada sujeto y para cada subregión del hipocampo en espacio nativo y 2) volúmenes estimados para cada sujeto para cada subregión en mm<sup>3</sup>. Las medidas de volumen de las subregiones del hipocampo se normalizan por el volumen intracraneal del sujeto utilizando la siguiente fórmula:  $\text{volumen}_{\text{normalizado}} = \text{volumen}_{\text{bruto}} \times 1000 / \text{ICV en cm}^3$ . Todos los volúmenes fueron examinados visualmente por un experto para garantizar la correcta segmentación de las distintas regiones del hipocampo. No se descartaron sujetos por errores de segmentación.

### ■ Conectividad funcional basada en voxel-semilla

Como se ha especificado anteriormente en el apartado de introducción (ver apartado 1.4.1), existen distintos métodos para describir las interacciones dinámicas cerebrales, en esta tesis hemos utilizado el método de conectividad funcional basada en vóxel-semilla para estudiar la conectividad funcional del hipocampo con el resto de áreas cerebrales. Para ello hemos utilizado la herramienta de MatLab DPARSF v.4 ®(Chao-Gan y Yu-Feng, 2010)

El preprocesado para el análisis de conectividad funcional, incluyó los siguientes pasos: eliminación de los 10 primeros volúmenes, corrección del tiempo de adquisición, realineamiento de las imágenes al primer volumen funcional, corrección del movimiento de la cabeza utilizando el modelo de 24 parámetros, corrección de registro, regresión de variables de no interés para eliminar posibles artefactos (incluye movimientos de cabeza, señales de sustancia blanca y líquido cefalorraquídeo), normalización espacial y suavizado de 4 mm FWHM (*full width at Half maximum*). Finalmente, se aplicó un filtro temporal del rango de frecuencias 0,01-0,008 Hz para reducir los efectos de fluctuación de muy bajas frecuencias (ej: ruido del escáner) y los ruidos de altas frecuencias (ej: ritmo cardíaco de mayor de 1 Hz). Después de todos estos pasos, 9 pacientes (6 sin EHM y 3 con EHM) y 6 controles fueron excluidos debido a un excesivo movimiento de cabeza.

Doce ROIs correspondientes a CA1, CA2-3, CA4-DG bilateral, fimbria, *presubiculum*, *subiculum* en el espacio MNI se usaron como semillas en los análisis conectividad funcional promediando las series temporales de cada ROI y correlacionándolas con las series temporales de cada vóxel en el cerebro. Se descartaron las ROI de la fisura y fimbria del hipocampo debido a su localización no tisular de sustancia gris.

### ■ Análisis estadístico

Las diferencias significativas entre grupos en las variables demográficas, clínicas y neurofisiológicas fueron analizadas utilizando ANOVA con un post-hoc Bonferroni. Las diferencias significativas se estipularon a partir de una  $p < 0,05$ . Para realizar los cálculos,

los datos fueron analizados con el software SPSS Version 20.0 (SPSS, Chicago, IL). Se utilizaron los resultados obtenidos en el PHES para evaluar el deterioro cognitivo y los resultados obtenidos en el TAVEC para evaluar el deterioro en el aprendizaje.

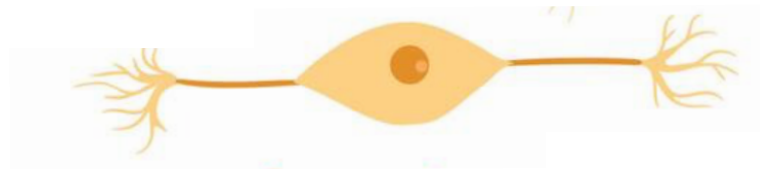
Para observar posibles diferencias entre grupos en cuanto al volumen de sustancia gris de las subregiones hipocampales se realizó una ANCOVA (covariable género) empleando la herramienta SPSS (SPSS, Chicago, IL®).

Para estudiar posibles diferencias en cuanto a la conectividad funcional de las distintas regiones del hipocampo con el resto del cerebro se empleó una ANCOVA (covariables género) utilizando el programa SPM12 (*Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, UCL, London, UK®*). Todos los datos de conectividad funcional se analizaron con un valor estadístico de  $p < 0,05$  corregido por cluster por múltiples comparaciones (FWE, *Family-Wise Error*) en combinación con un umbral a nivel de vóxel no corregido de  $p < 0,001$ . Finalmente se utilizó una máscara de corrección implícita para asegurar que todas las diferencias significativas de conectividad funcional estaban incluidas en las redes funcionales asociadas a las distintas regiones hipocampales.

El volumen de sustancia gris y los valores de intensidad de señal medios de los clusters donde hay diferencias significativas derivados de anteriores ANCOVAs (SPM *eigenvalues*) se extrajeron y se incluyeron en los análisis de correlación y en el análisis de curva ROC para evaluar el valor diagnóstico (discriminación de pacientes con y sin EHM) del volumen y conectividad funcional.



## 4.RESULTADOS



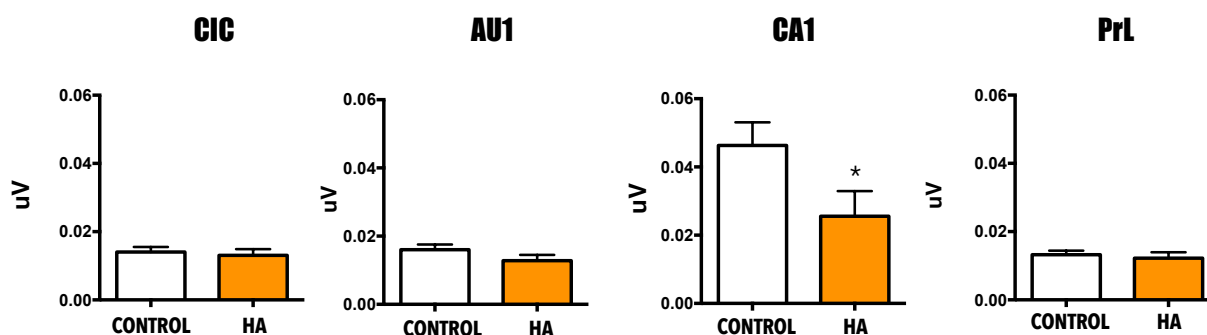
## ALTERACIONES EN LA CONECTIVIDAD FUNCIONAL EN MODELOS ANIMALES

### 4.1 El potencial MMN en ratas hiperamonémicas

Los datos que se van a presentar se obtuvieron en ratas con HA tras 6-7 semanas de dieta rica en acetato de amonio y una semana después de la cirugía estereotáxica para la inserción de los electrodos en CIC, AU1, CA1 y PrL. Se realizó el registro electroencefalográfico al mismo tiempo que se emitían los estímulos auditivos mediante el paradigma *roaring*, con la rata anestesiada con hidrato de cloral para asegurar que los potenciales auditivos que se generaban eran consecuencia del parámetro de estimulación del experimento y no de ruidos producidos por el movimiento de la rata. Se procesaron los registros para la obtención del ERP (del inglés *Event Related Potential*) MMN y se calcularon los siguientes parámetros en las ratas control y ratas HA:

#### 4.1.1 Amplitud del pico máximo del potencial MMN

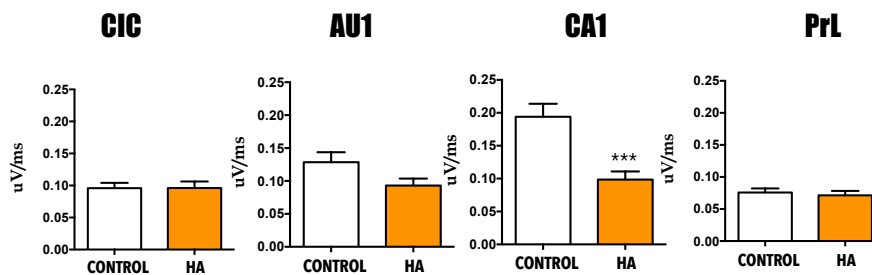
Para los dos grupos el área con mayor amplitud en el pico máximo es la región CA1 del hipocampo. En ratas HA el pico máximo del potencial MMN disminuye ( $0,026 \pm 0,0074 \mu\text{V}$ ;  $p < 0,05$ ) respecto al de las ratas control ( $0,046 \pm 0,007 \mu\text{V}$ ) en la región CA1 del hipocampo. La amplitud del pico máximo del potencial MMN en resto de áreas del estudio, CIC ( $0,013 \pm 0,002 \mu\text{V}$ ), AU1 ( $0,013 \pm 0,002 \mu\text{V}$ ) y PrL ( $0,012 \pm 0,002 \mu\text{V}$ ) no muestra cambios significativos respecto a sus ratas control ( $C_{\text{CIC}} = 0,014 \pm 0,002 \mu\text{V}$ ;  $C_{\text{AU1}} = 0,016 \pm 0,002 \mu\text{V}$ ;  $C_{\text{PrL}} = 0,013 \pm 0,001 \mu\text{V}$ ) (Figura 45).



**Figura 45: Amplitud del pico máximo del potencial MMN.** Los electrodos se insertaron estereotáxicamente en CIC (colículo inferior), AU1 (corteza auditiva primaria), región CA1 del hipocampo y PrL (corteza prefrontal). Se adquirieron los registros electroencefalográficos mientras se emitían los sonidos necesarios mediante el paradigma *roaring* para evocar el potencial MMN. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*post-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media  $\pm$  MEE (media del error estándar) de la amplitud en  $\mu\text{V}$  del pico máximo de la onda MMN. El número de animales del grupo control fue 47 y del grupo con HA 34. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos ( $*p < 0,05$ ).

### 4.1.2 Área bajo la curva del potencial MMN

El área bajo la curva del potencial MMN de las ratas HA también disminuye ( $0,098 \pm 0,012 \mu\text{V}/\text{ms}$ ;  $p < 0,001$ ) respecto al de las ratas control ( $0,19 \pm 0,02 \mu\text{V}/\text{ms}$ ) en la región CA1 del hipocampo. El área bajo la curva del potencial MMN en HA en el resto de áreas del estudio, CIC ( $0,096 \pm 0,011 \mu\text{V}/\text{ms}$ ), AU1 ( $0,093 \pm 0,011 \mu\text{V}/\text{ms}$ ) y PrL ( $0,071 \pm 0,007 \mu\text{V}/\text{ms}$ ), no muestra cambios significativos respecto a sus ratas control ( $C_{\text{CIC}} = 0,096 \pm 0,008 \mu\text{V}/\text{ms}$ ;  $C_{\text{AU1}} = 0,13 \pm 0,02 \mu\text{V}/\text{ms}$ ;  $C_{\text{PrL}} = 0,076 \pm 0,006 \mu\text{V}/\text{ms}$ ). En controles tiende a aumentar el área bajo la curva desde CIC a CA1, que es el área con mayor respuesta (Figura 46).



**Figura 46:** Área bajo la curva del potencial MMN. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*post-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media  $\pm$  MEE del área bajo la curva en  $\mu\text{V}/\text{ms}$  de la onda MMN. El número de animales del grupo control fue 47 y del grupo con HA 34. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ). CIC (colículo inferior), AU1 (corteza auditiva primaria), región CA1 del hipocampo y PrL (corteza prelímbica).

### 4.1.3 Frecuencia dominante

Se calculó la frecuencia dominante (FD) del espectro de potencias de los PEs por el sonido estándar, por el sonido extraño y del MMN. La FD de los PEs obtenidos durante la emisión del sonido estándar y el sonido extraño y para la respuesta MMN no es diferente en ratas con HA crónica respecto a las ratas control en ninguna de las áreas analizadas (Tabla 5).

**TABLA 5:** Frecuencia dominante del potencial evocado por el sonido estándar (std), sonido extraño y del MMN en ratas control y ratas hiperamonémicas.

|                | CONTROLES     |               |               |               | HIPERAMONÉMICAS |               |               |               |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|
|                | CIC           | AU1           | CA1           | PrL           | CIC             | AU1           | CA1           | PrL           |
| <b>STD</b>     | 2,9 $\pm$ 0,3 | 3,3 $\pm$ 0,4 | 1,9 $\pm$ 0,2 | 2,3 $\pm$ 0,3 | 2,4 $\pm$ 0,4   | 3 $\pm$ 0,3   | 1,9 $\pm$ 0,3 | 2,1 $\pm$ 0,3 |
| <b>EXTRAÑO</b> | 1,8 $\pm$ 0,3 | 2,9 $\pm$ 0,3 | 2,2 $\pm$ 0,3 | 2,5 $\pm$ 0,4 | 2,4 $\pm$ 0,4   | 2,2 $\pm$ 0,3 | 2,5 $\pm$ 0,3 | 1,8 $\pm$ 0,4 |
| <b>MMN</b>     | 2,6 $\pm$ 0,4 | 2,8 $\pm$ 0,4 | 2,1 $\pm$ 0,2 | 2,3 $\pm$ 0,3 | 2,4 $\pm$ 0,3   | 3 $\pm$ 0,4   | 1,9 $\pm$ 0,3 | 2,2 $\pm$ 0,3 |

Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*post-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media  $\pm$  MEE de la frecuencia dominante (Hz) de los potenciales evocados por el sonido estándar, por el sonido extraño y en la respuesta MMN. El número de animales del grupo control fue 47 y del grupo con HA 34. CIC (colículo inferior), AU1 (corteza auditiva primaria), región CA1 del hipocampo y PrL (corteza prelímbica).

#### 4.1.4 Media de las desviaciones estándar (*mstd*)

La irregularidad de la respuesta eléctrica cerebral se calculó a partir de la media de las desviaciones estándar de todos los puntos que conforman el PE durante la emisión de sonidos estándar, extraños y del MMN. No se encontraron diferencias en la irregularidad en la señal eléctrica ni entre grupos ni entre patrones de sonido (Tabla 6).

**TABLA 6:** Media de las desviaciones estándar (*mstd*) del potencial eléctrico evocado por el sonido estándar (std), el sonido extraño y en la respuesta MMN.

|                | CONTROLES   |             |             |             | HIPERAMONÉMICAS |             |             |             |
|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
|                | CIC         | AU1         | CA1         | PrL         | CIC             | AU1         | CA1         | PrL         |
| <b>STD</b>     | 0,040±0,004 | 0,050±0,004 | 0,070±0,006 | 0,030±0,002 | 0,050±0,005     | 0,040±0,004 | 0,050±0,005 | 0,030±0,003 |
| <b>EXTRAÑO</b> | 0,040±0,004 | 0,050±0,004 | 0,050±0,004 | 0,030±0,001 | 0,040±0,005     | 0,040±0,004 | 0,040±0,004 | 0,030±0,002 |
| <b>MMN</b>     | 0,060±0,006 | 0,080±0,006 | 0,080±0,006 | 0,040±0,002 | 0,070±0,007     | 0,060±0,006 | 0,070±0,007 | 0,040±0,004 |

Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media del *mstd* en  $\mu V \pm MEE$ . El número de animales del grupo control fue 47 y del grupo con HA 34. CIC (colículo inferior), AU1 (corteza auditiva primaria), región CA1 del hipocampo y PrL (corteza prelímbica).

#### 4.1.5 Entropía

La medida de la entropía nos da una idea del nivel de desorden de la señal eléctrica. Se calculó la entropía del PE por el sonido extraño, el sonido estándar y el MMN. No se observaron diferencias en el nivel de desorden entre controles y ratas HA en ninguno de los PEs, ni entre las diferentes áreas entre sí, ni entre los diferentes PEs dentro del mismo grupo (Tabla 7).

**TABLA 7:** Entropía de los potenciales evocados por el sonido estándar (std), el sonido extraño y en la respuesta MMN.

|                | CONTROLES |           |           |           | HIPERAMONÉMICAS |           |           |           |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|-----------|
|                | CIC       | AU1       | CA1       | PrL       | CIC             | AU1       | CA1       | PrL       |
| <b>STD</b>     | 0,20±0,01 | 0,20±0,01 | 0,20±0,01 | 0,20±0,01 | 0,20±0,02       | 0,20±0,01 | 0,20±0,02 | 0,20±0,01 |
| <b>EXTRAÑO</b> | 0,20±0,01 | 0,20±0,01 | 0,20±0,02 | 0,20±0,01 | 0,20±0,01       | 0,30±0,02 | 0,20±0,02 | 0,20±0,01 |
| <b>MMN</b>     | 0,20±0,02 | 0,20±0,01 | 0,20±0,01 | 0,20±0,01 | 0,20±0,01       | 0,30±0,02 | 0,20±0,02 | 0,20±0,02 |

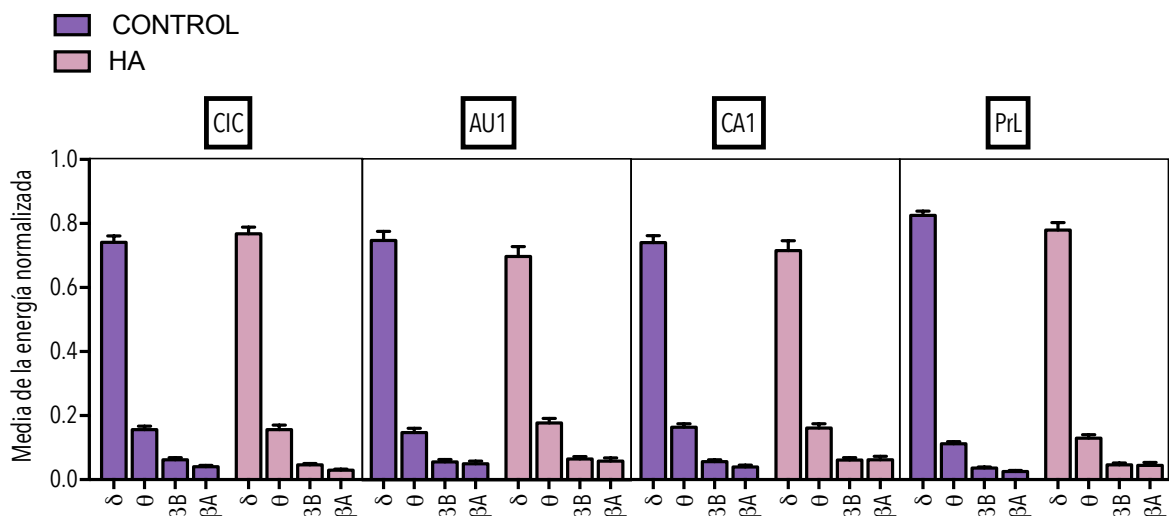
Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media de la entropía en Clasius (J/K)  $\pm MEE$ . El número de animales del grupo control fue 47 y del grupo con HA 34. CIC (colículo inferior), AU1 (corteza auditiva primaria), región CA1 del hipocampo y PrL (corteza prelímbica).

## 4.2 Análisis de los potenciales locales de campo durante la estimulación auditiva en ratas hiperamonémicas

Tras 6-7 semanas de dieta rica en acetato de amonio y una semana después de la cirugía estereotáxica para la inserción de los electrodos en CIC, AU1, CA1 y PrL, se realizó un registro electroencefalográfico mientras se emitían sonidos mediante el paradigma *roaring*, con la rata anestesiada con hidrato de cloral para asegurar que los cambios en el potencial de campo local eran consecuencia del parámetro de estimulación del experimento y no de ruidos producidos por el movimiento de la rata. Se calcularon los parámetros que se detallan a continuación en el registro de potencial de campo local (LFP, *Local Field Potential*) para las bandas del espectro delta [ $\delta$  =1-4 Hz], theta [ $\theta$ = 4-8 Hz], beta baja [ $\beta_B$ = 8-12 Hz] y beta alta [ $\beta_A$ =12-30 Hz].

### 4.2.1 Media de la energía espectral normalizada en la banda de interés

Se calculó la potencia de cada banda de frecuencia (ponderada por la frecuencia de cada banda) respecto a la media de la energía para obtener una representación por frecuencias de la potencia del registro (Potencia Espectral). Se calculó la potencia espectral para las ratas control y para las ratas con HA (Figura 47).



**Figura 47:** Media de la energía espectral normalizada en la banda de interés en las ratas control y con HA en la condición de estimulación auditiva (MMN). Los registros electroencefalográficos se realizaron en condiciones basales sin estimulación auditiva (EEG) y mientras se emitían los estímulos auditivos necesarios se siguiendo el paradigma *roaring* para evocar el potencial de MMN (MMN). Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*post-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media  $\pm$  MEE de la potencia total ponderada por la banda de frecuencia de interés ( $\mu$ V) de 28 controles y 25 con HA. CIC (colículo inferior), AU1 (corteza auditiva primaria), región CA1 del hipocampo y PrL (corteza prefrontal).



Tanto los controles como las ratas con HA presentan una potencia espectral similar, con mayores potencias localizadas en la banda delta y no existen diferencias entre los dos grupos.

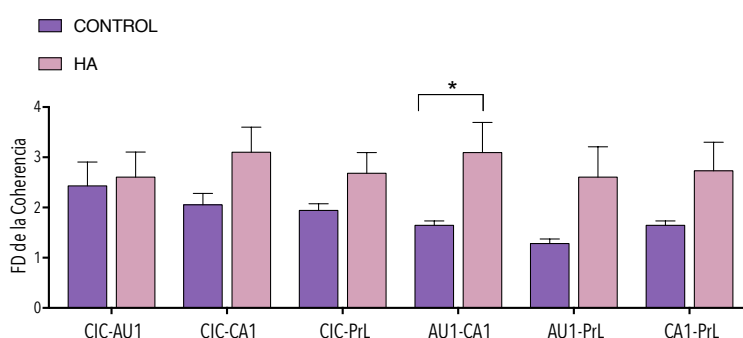
#### 4.2.2 Coherencia

Los espectros de coherencia entre pares de áreas (CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL y CA1-PrL) se calcularon siguiendo los métodos de FFT. La coherencia es una medida para la interdependencia de dos señales en el dominio de frecuencia con valores entre 0 y 1. Un valor de 0 significa que las dos señales son independientes en la frecuencia considerada, mientras que un valor de 1 significa que las señales son idénticas en frecuencia y tienen una relación de fase constante. El aumento de la coherencia significa un aumento de la similitud de frecuencia y la consistencia de fase entre las señales oscilatorias en dos regiones cerebrales.

#### ■ Frecuencia dominante en la coherencia

Se calculó la FD en la coherencia entre cada una de las combinaciones de áreas, para las ratas control e HA (Tabla 8 y Figura 48).

|         | CIC-AU1   | CIC-CA1   | CIC-PrL   | AU1-CA1          | AU1-PrL   | CA1-PrL   |          |
|---------|-----------|-----------|-----------|------------------|-----------|-----------|----------|
| CONTROL | 3,9 ± 1,1 | 2,0 ± 0,2 | 1,9 ± 0,1 | 1,6 ± 0,1        | 1,3 ± 0,1 | 1,6 ± 0,1 | [1-4 Hz] |
| HA      | 2,6 ± 0,5 | 3,1 ± 0,5 | 2,7 ± 0,4 | <b>3,0 ± 0,6</b> | 2,6 ± 0,6 | 2,7 ± 0,6 |          |



**TABLA 8 y Figura 48: Frecuencia dominante (FD) en la coherencia de ratas control y con HA durante la estimulación auditiva.** Se calculó la frecuencia dominante en la coherencia entre: CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1 y CA1-PrL. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media de la frecuencia dominante (Hz) ± MEE de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo con HA respectivamente. En la tabla los rangos de frecuencia de la banda delta [1-4 Hz] se muestran en color naranja. CIC (colículo inferior), AU1 (corteza auditiva primaria), región CA1 del hipocampo y PrL (corteza prelámbica). Las diferencias significativas se indican con \* ( $p < 0,05$ ) en la figura y en negrita en la tabla.

La coherencia en las ratas control opera a frecuencias del rango delta en todas las combinaciones de áreas.

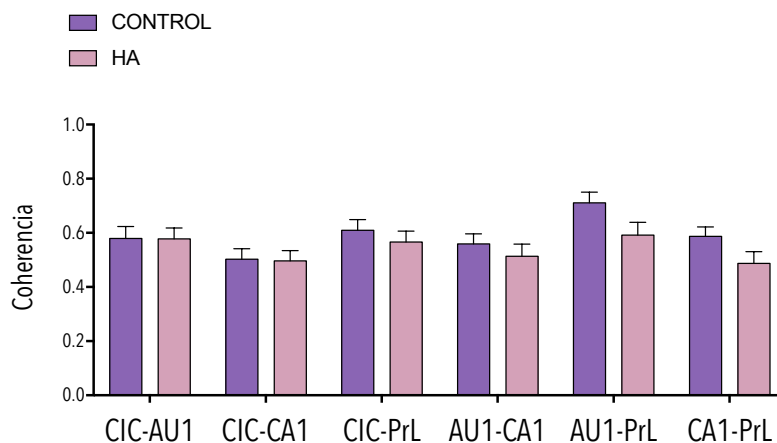
En las ratas HA aumenta la FD de la coherencia entre AU1-CA1 (HA=3,5 ± 0,6; C= 1,6 ± 0,1;  $p < 0,05$ ) y tiende a aumentar la FD en la coherencia en la banda delta para todas las combinaciones de áreas a excepción entre CIC-CA1.

■ **Coherencia en la banda de frecuencia dominante**

Se calculó la coherencia en la banda de FD para todas las combinaciones de áreas: CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL. Se analizaron las diferencias en la coherencia entre el grupo control y el grupo de HA (Figura 49 y Tabla 9).

|         | CIC-AU1     | CIC-CA1     | CIC-PrL     | AU1-CA1     | AU1-PrL     | CA1-PrL     |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| CONTROL | 0,58 ± 0,04 | 0,49 ± 0,04 | 0,60 ± 0,04 | 0,55 ± 0,04 | 0,69 ± 0,04 | 0,59 ± 0,03 |
| HA      | 0,58 ± 0,04 | 0,50 ± 0,04 | 0,44 ± 0,04 | 0,57 ± 0,04 | 0,60 ± 0,04 | 0,49 ± 0,04 |

■ [1-4 Hz]



**TABLA 9 y Figura 49: Coherencia en la banda de frecuencia dominante en ratas control y con HA durante la estimulación auditiva.** Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Sidak) y se expresan como la media ± MEE de la coherencia (Hz) de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo con HA respectivamente. La coherencia en la banda delta [1-4 Hz] se muestran en color naranja.

El aumento de la FD con la HA no produce cambios en la coherencia entre las diferentes áreas.

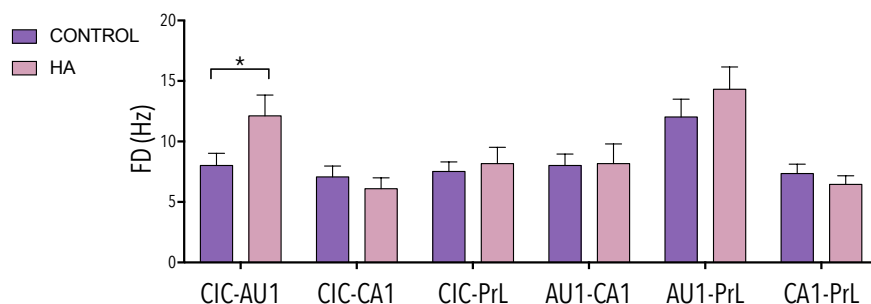
### 4.2.3 Causalidad funcional de Wiener-Granger

Aplicando el test de causalidad de Wiener-Granger podemos comprobar si la diferencia de potencial cerebral de un área puede predecir los cambios en la diferencia de potencial de otra área, es decir, si la actividad cerebral de un área es la causa de la actividad de otra. También nos permite comprobar si la causalidad tiene carácter unidireccional o bidireccional. Aplicando este test a los registros electroencefalográficos con estimulación auditiva podemos evaluar si las diferentes áreas analizadas en este estudio se comunican de forma diferente en ratas control y con HA.

#### ■ Frecuencia dominante de la relación de causalidad entre las áreas

A continuación exponemos los resultados de la FD de la causalidad para los grupos de ratas control y con HA (Tabla 10 y Figura 50).

|         | CIC-AU1           | CIC-CA1   | CIC-PrL   | AU1-CA1   | AU1-PrL    | CA1-PrL   |            |
|---------|-------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|
| CONTROL | 8,0 ± 1,0         | 7,0 ± 0,9 | 7,5 ± 0,8 | 8,0 ± 0,9 | 12,0 ± 1,5 | 7,4 ± 0,7 | [4-8 Hz]   |
| HA      | <b>12,1 ± 1,7</b> | 6,1 ± 0,9 | 8,2 ± 1,3 | 8,2 ± 1,6 | 14,3 ± 1,8 | 6,5 ± 0,7 | [8-12 Hz]  |
|         |                   |           |           |           |            |           | [12-30 Hz] |



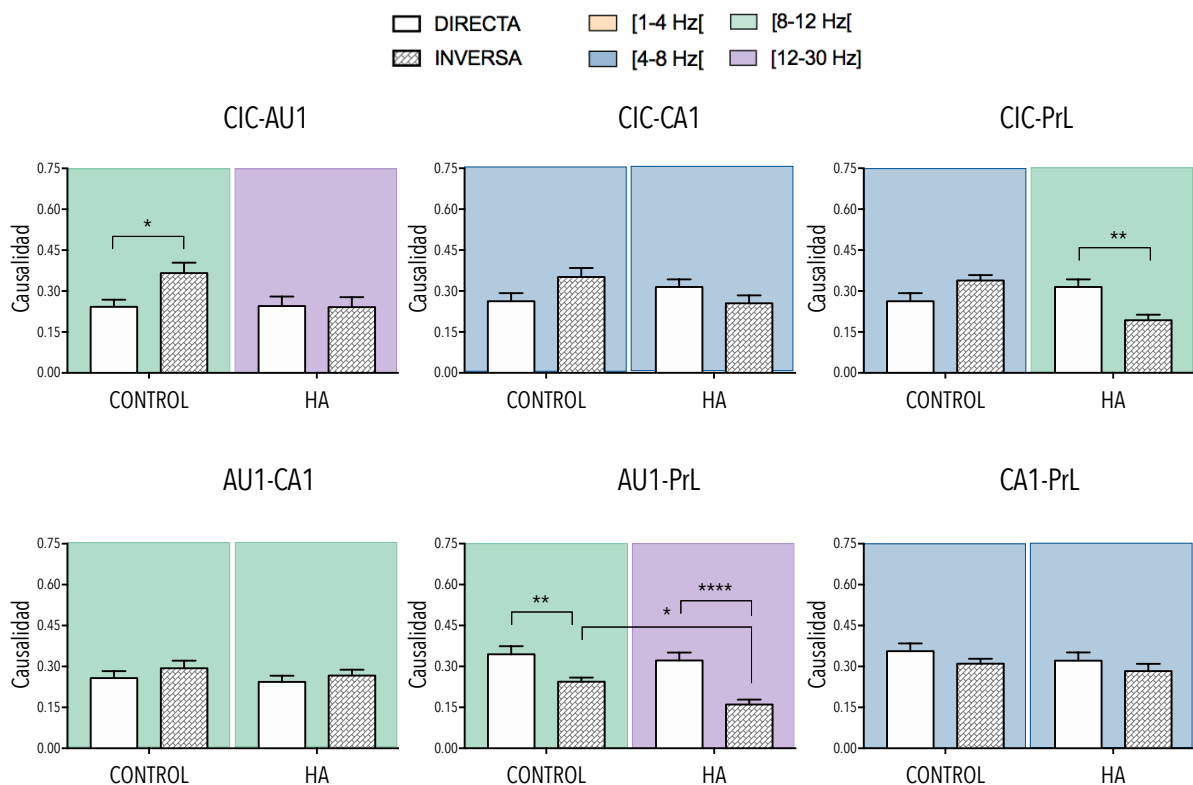
**TABLA 10 y Figura 50: Frecuencia dominante en la relación de causalidad entre las diferentes áreas durante la estimulación auditiva.** La frecuencia dominante en la causalidad se calculó en todas las combinaciones de áreas posibles: CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media ± MEE de la frecuencia dominante en la causalidad (Hz) de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo con HA respectivamente. Los rangos de frecuencia en la banda delta [1-4 Hz] se muestran en color naranja, en la banda theta [4-8 Hz] en color azul, en la banda beta baja [8-12] en color verde y en la banda beta alta [12-30 Hz]. Los resultados significativamente diferentes se indican con asteriscos en la figura y con negrita en la tabla.

Para los dos grupos la FD entre AU1-PrL fue la más alta y la más baja entre CIC-CA1. En controles la FD de la causalidad de CIC-AU1, AU1-CA1 y AU1-PrL se encuentra en el rango de frecuencias beta baja y la de CIC-CA1 y CIC-PrL en el theta.

En HA la FD de la causalidad en CIC-AU1 es mayor ( $12,1 \pm 1,7$  Hz;  $p < 0,05$ ) que en controles ( $8,0 \pm 1,0$  Hz) y opera en el rango de frecuencias beta alta. La FD de la causalidad entre CIC-PrL (beta baja) y AU1-PrL (beta alta) tiende a ser mayor que en controles. En el resto de combinaciones de áreas: CIC-CA1 (theta), AU1-CA1 (beta baja) y CA1-PrL (theta) la FD de la causalidad se encuentra en el mismo rango de frecuencias que las controles.

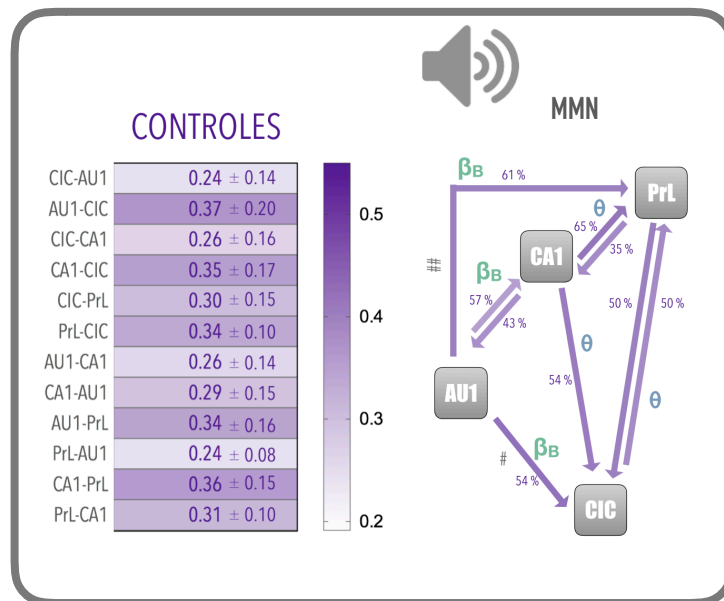
■ **Causalidad directa e inversa. ¿Qué sentido predomina durante la generación de la respuesta MMN?**

Queríamos saber si el flujo de información entre dos áreas en un sentido es mayor que en el sentido contrario, es decir, si la causalidad directa entre las áreas "A" y "B" ( $A > B$ ) es diferente de la causalidad inversa ( $B > A$ ). Calculamos la causalidad directa (D) y la causalidad inversa (I) en el rango de frecuencias donde predomina la causalidad entre las áreas: CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL, en los LFP durante la estimulación auditiva. De esta forma podemos ver cómo fluye la información entre las diferentes áreas en las ratas control (Figura 51 y 52) y en las ratas con HA (Figura 51 y 53).



**Figura 51:** Causalidad directa e inversa de ratas control y con HA entre CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL, durante la estimulación auditiva. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Bonferroni) y se expresan como la media  $\pm$  MEE de la causalidad de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo con HA respectivamente. Las diferencias de causalidad se indican con \* ( $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). La FD de cada causalidad se indica con diferentes colores  $\delta$  = naranja,  $\theta$  = azul,  $\beta_B$  = verde y  $\beta_A$  = lila.

### Causalidad en ratas control durante la generación del MMN



**Figura 52:** Causalidad directa (D) e inversa (I) en ratas control con estimulación auditiva y mapa de los principales sentidos de causalidad entre CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL, durante la estimulación auditiva. Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE (desviación estándar) de la causalidad directa y la del sentido contrario de 28 animales. Los valores de causalidad se gradúan por intensidad de color de acuerdo con la barra de la derecha. El sentido mayoritario de causalidad entre dos áreas se indica con flechas. También se representan la FD (frecuencia dominante) de la causalidad ( $\theta$  (theta) = [4-8 Hz] y  $\beta_B$  (beta baja) = [8-12 Hz]), el porcentaje de ratas que responde en los sentidos mayoritarios (ver en ratio de causalidad neta en la siguiente sección). Las causalidades que son significativamente mayores en un sentido que en el sentido contrario se indican con # (# $p$ <0,05; ## $p$ <0,01).

**AU1-CIC:** durante la generación de la respuesta MMN la causalidad directa en sentido AU1→CIC es mayor que en sentido contrario (AU1→CIC =  $0,37 \pm 0,2$ ; CIC→AU1 =  $0,24 \pm 0,14$ ;  $p$ <0,05), lo que indica una mayor influencia causal desde AU1 a CIC.

**CA1-CIC:** aunque no existen diferencias entre la causalidad directa e inversa parece que el flujo de información tiende a fluir desde CA1 a CIC, es decir, parece que haya una mayor influencia causal desde áreas superiores a inferiores.

**CIC-PrL:** la causalidad entre CIC-PrL parece ser bidireccional, ya que tanto la causalidad directa como la inversa tienen valores muy similares.

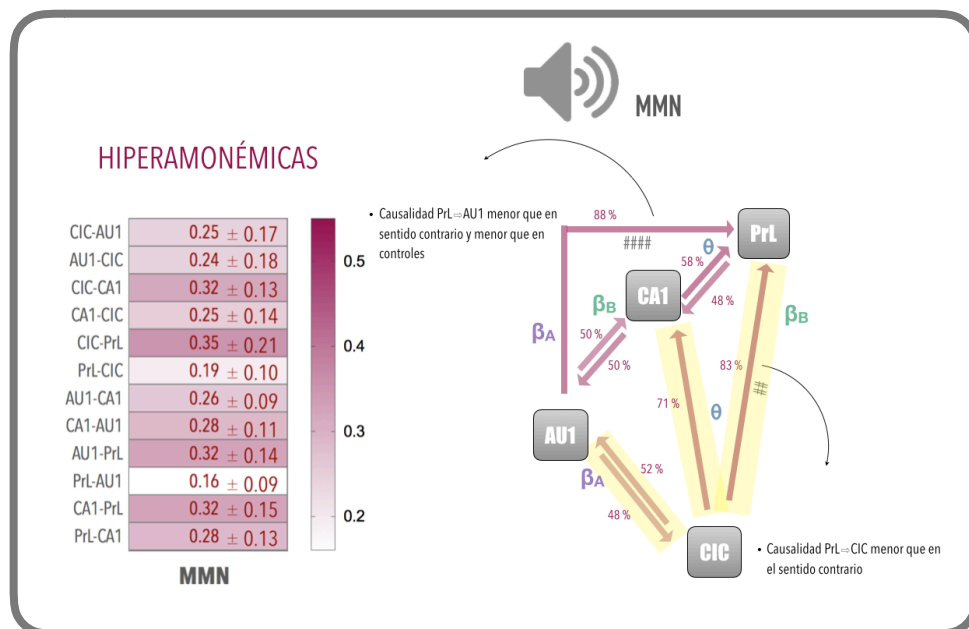
**AU1-CA1:** los valores similares de causalidad directa e inversa entre AU1-CA1 indican también bidireccionalidad entre estas dos áreas.

**AU1-PrL:** la causalidad directa AU1→PrL es mayor que la causalidad en el sentido contrario (AU1→PrL = 0,34 ± 0,16; PrL→AU1 = 0,24 ± 0,08;  $p < 0,01$ ), por lo que el flujo de información fluye desde AU1 a PrL.

**CA1-PrL:** la causalidad D e I entre CA1 y PrL tienen valores similares por lo que estas dos áreas durante la generación del potencial MMN se comunican bidireccionalmente.

Podemos decir que con la estimulación auditiva la dinámica de causalidad fluye desde AU1 y CA1 a CIC, desde AU1 a PrL y entre CIC-PrL, PrL-CA1 y CA1-AU1 de forma bidireccional.

### Causalidad en hiperamonemia durante la generación del MMN



**Figura 53:** Causalidad directa (D) e inversa (I) en ratas con HA con estimulación y mapa de los principales sentidos de causalidad entre CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL, durante la estimulación auditiva. Los datos se expresan como la media ± DE (desviación estándar) de la causalidad directa y la del sentido contrario de 25 animales. Los valores de causalidad se gradúan por intensidad de color de acuerdo con la barra de la derecha. El sentido mayoritario de causalidad entre dos áreas se indica con flechas. También se representan la FD (frecuencia dominante) de la causalidad ( $\theta$  (theta)= [4-8 Hz] y  $\beta_B$  (beta baja)= [8-12 Hz];  $\beta_A$  (beta alta)= [12-30 Hz]), el porcentaje de ratas que responde en los sentidos mayoritarios (ver en ratio de causalidad neta en la siguiente sección) y los cambios en la coherencia (ver sección 4.1.2.2). Las causalidades que son significativamente mayores en un sentido que en sentido contrario se indican con # ( $##p < 0,01$ ;  $###p < 0,001$ ). Las causalidades en un sentido diferente al de las ratas control se marcan con amarillo.

**AU1-CIC:** durante la generación de la respuesta MMN la causalidad directa en sentido AU1→CIC tiene valores similares a los del sentido CIC→AU1 lo que indica una influencia

bidireccional entre estas dos áreas, y una alteración respecto a la comunicación que presentan las controles.

**CA1-CIC:** aunque no existen diferencias entre la causalidad directa e inversa parece que el flujo de información tiende a fluir desde CIC a CA1, es decir al contrario de lo que ocurre en controles, el flujo de información tiende a ir desde áreas inferiores a superiores.

**CIC-PrL:** la influencia causal en sentido  $CIC \rightarrow PrL$  es mayor ( $0,35 \pm 0,21$ ;  $p < 0,01$ ;) que la del sentido contrario ( $0,19 \pm 0,10$ ), lo que indica una alteración en el sentido de comunicación entre estas dos áreas respecto al de las ratas control ya que las áreas inferiores tienen una mayor influencia causal sobre las superiores en lugar de comunicarse bidireccionalmente.

**AU1-CA1:** lo valores similares de causalidad directa e inversa entre AU1-CA1 indican, al igual que los controles, bidireccionalidad entre estas dos áreas.

**AU1-PrL:** al igual que en controles, la causalidad  $PrL \rightarrow AU1$  es menor que la causalidad en el sentido contrario ( $AU1 \rightarrow PrL = 0,32 \pm 0,14$ ;  $PrL \rightarrow AU1 = 0,16 \pm 0,09$   $p < 0,001$ ), por lo que el flujo de información fluye desde AU1 a PrL.

**CA1-PrL:** la causalidad D e I entre CA1 y PrL tienen valores similares por lo que estas dos áreas durante la generación del potencial MMN se comunican bidireccionalmente, al igual que ocurre en controles.

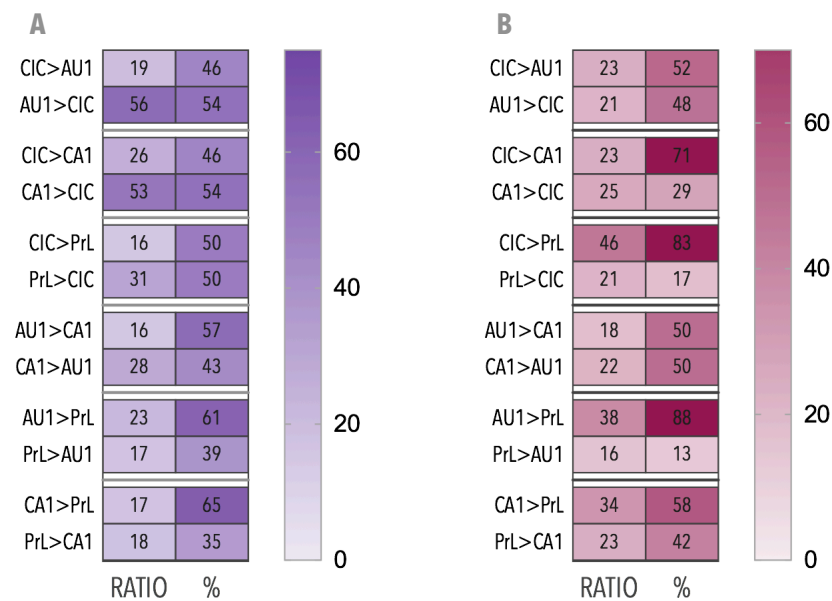
En resumen en ratas con HA durante la condición de estimulación auditiva la dinámica de causalidad está alterada respecto a la de las ratas control entre: CIC-AU1, CIC-CA1 y CIC-PrL. La comunicación entre AU1-CA1, AU1-PrL y CA1-PrL no está alterada respecto a las de las ratas control. La información por tanto tiende a fluir desde CIC a CA1 y PrL y desde AU1 a PrL y es bidireccional entre CIC-AU1, AU1-CA1 y CA1-PrL. En las combinaciones de áreas donde se produce un aumento o una tendencia a aumentar la FD de la causalidad se evidencian mejor las distintas influencias causales (en cuanto a sentido o intensidad en cada sentido) entre controles e HA.

### ■ Ratio de causalidad neta durante la respuesta MMN

La causalidad de una rata puede ser mayor en el sentido D que en el I ó viceversa. En el apartado anterior obteníamos medias de causalidad D e I independientemente de que la causalidad individual de cada rata fuera mayor en un sentido que en el otro. Quisimos calcular el valor de causalidad neta para cada sentido, es decir, el valor de causalidad en un sentido a partir de la media de únicamente las causalidades de las ratas que responden en dicho sentido mayoritariamente. Para ello separamos los valores de causalidad de las ratas que respondían en un sentido de los valores de las que respondían en sentido contrario y calculamos el ratio de la causalidad dividiendo el valor de causalidad en dicho sentido por



el del sentido contrario. De esta forma podemos evaluar cuánto mayor es la causalidad neta de una dirección respecto a su contraria. También analizamos el porcentaje de ratas que responde en una dirección y el que responde en la contraria para evaluar si el valor de causalidad D o I se debe al efecto de un pequeño porcentaje de ratas que está respondiendo fuertemente en una dirección y que por lo tanto no está reflejando el comportamiento en conjunto (Figura 54).



**Figura 54:** Ratio de causalidad neta entre las áreas CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL y porcentaje (%) de ratas que responde en cada sentido en A) ratas control y B) con HA, durante la estimulación auditiva. Se calculó el ratio de causalidad entre las diferentes combinaciones de áreas en el sentido directo e inverso. La dirección de causalidad de un área a otra se indica con el símbolo >. Los datos se expresan como la media del ratio de causalidad y el porcentaje de ratas que responden únicamente en la dirección indicada de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo con HA respectivamente. Los valores están graduados por intensidad de colores (barra derecha de cada tabla).

En controles durante la estimulación auditiva se obtienen los mismos sentidos de causalidad que los obtenidos con el análisis de causalidad de Granger: AU1>CIC, CA1>CIC, AU1>PrL y bidireccionalidad entre CA1 y PrL. Por otro lado, pesar de tener valores de causalidad neta muy similares en un sentido y en otro, el porcentaje de ratas que responden en sentido CA1>PrL es mayor que el que responden en sentido contrario, indicando una respuesta más constante en sentido CA1>PrL. En las otras combinaciones de áreas, aunque predomina el ratio de causalidad en un sentido, el porcentaje de ratas que responden en un sentido y en el contrario es muy similar, lo que indica que aunque prácticamente la mitad de las ratas respondan en un sentido y la otra mitad en el otro, la mayor influencia causal se explica por la respuesta de sólo la mitad de las ratas. Por otro lado, las causalidades bidireccionales obtenidas con la causalidad de Granger entre PrL-CIC y CA1-AU1 muestran sentidos prioritarios con el cálculo de la causalidad neta: desde PrL a CIC y desde CA1 a AU1. El

porcentaje de ratas que responden en sentido PrL>CIC es el mismo que el del sentido contrario, por lo que el sentido de causalidad mayoritario está definido solo por la mitad de las ratas. El porcentaje de ratas que responden en sentido CA1>AU1 es mayor que en el sentido contrario, indicando una mayor influencia y una respuesta más constante en este sentido. Como en el análisis de Granger obtenemos bidireccionalidad entre estas 2 combinaciones de áreas, es posible que valores de causalidad de Granger altos en sentido PrL>CIC y CA1>AU1 se estén contrarrestando con valores de causalidad bajos de ratas que tengan poca influencia causal en este sentido.

En HA con estimulación auditiva el ratio de causalidad en los dos sentidos entre CIC y AU1 son muy similares al igual que el porcentaje de ratas que responden en un sentido y en el otro. Por lo tanto, las respuestas en un sentido y en otro son iguales. Esto coincide con los resultados de causalidad de Granger donde obteníamos una causalidad bidireccional entre estas dos áreas.

Con la estimulación auditiva el ratio de causalidad CA1>CIC y el del sentido contrario son muy similares pero porcentaje de ratas que responden en sentido CIC>CA1 es mayor. La causalidad de Granger también indicó un flujo de causalidad desde CIC a CA1, lo que indica que la influencia causal en este sentido es más constante y que la causalidad de Granger en el sentido contrario podría estar enmascarada por valores bajos de algunas ratas.

El ratio de causalidad neta y el porcentaje de ratas que responden en sentido CIC>PrL es mayor que los valores en el sentido contrario, en concordancia con el flujo unidireccional y significativamente mayor que obteníamos con Granger en el mismo sentido.

Al igual que obteníamos con la causalidad de Granger, las causalidades netas entre AU1-CA1 muestran bidireccionalidad y además el mismo porcentaje de ratas responde en un sentido y en el otro.

Con la estimulación auditiva el ratio de causalidad AU1>PrL y el porcentaje de ratas que responden en esta dirección son mayores que los del sentido inverso. El mismo sentido prioritario que obteníamos con la causalidad de Granger.

Con la estimulación auditiva, el ratio de causalidad CA1>PrL es mayor que el del sentido contrario. Prácticamente el mismo porcentaje de ratas responde en una dirección que en la otra. En este caso, los resultados de causalidad de Granger mostraban una causalidad bidireccional entre estas dos áreas, por lo que puede que los valores de causalidad de Granger CA1>PrL estén siendo enmascarados.

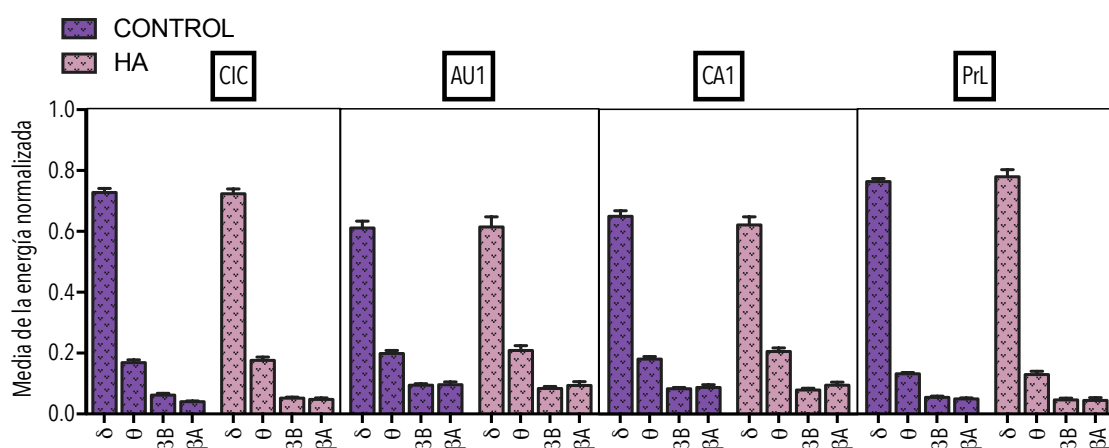
### 4.3 Análisis de los potenciales locales de campo en condiciones basales en ratas hiperamonémicas

La alteración de la actividad oscilatoria en condiciones basales a determinadas frecuencias se relaciona directamente con el deterioro cognitivo y se ha descrito la alteración de la conectividad funcional en estado de reposo en numerosas patologías. En base a esto decidimos estudiar la actividad oscilatoria y la conectividad funcional de la red implicada en el procesamiento del MMN en el estado basal mediante el análisis de los potenciales de campo local (LFP, *Local Field Potential*).

Tras 6-7 semanas de dieta rica en acetato de amonio y una semana después de la cirugía estereotáxica para la inserción de los electrodos en CIC, AU1, CA1 y PrL, se realizó un registro electroencefalográfico basal, sin estimulación auditiva, después de un periodo de media hora de habituación en el lugar de registro. En este caso no se utilizó hidrato de cloral para estudiar con la mayor reproducibilidad posible la conectividad funcional fisiológica del estado basal. Se calcularon los mismos parámetros que en el apartado anterior en el registro de LFP para las bandas del espectro delta [ $\delta$  =1-3,9 Hz], theta [ $\theta$ = 4-7,9 Hz], beta bajo [ $\beta$ B= 8-11,8] y beta alto [ $\beta$ A=12-30], que se detallan a continuación.

#### 4.3.1 Media de la energía espectral normalizada en la banda de interés

Se calculó la potencia de cada banda de frecuencia (ponderada por la frecuencia de cada banda) respecto a la media de la energía para obtener una representación por frecuencias de la potencia del registro (Potencia Espectral) para las ratas control e hiperamonémicas en condiciones basales (Figura 55).



**Figura 55:** Media de la energía espectral normalizada en la banda de interés en las ratas control y con HA en condiciones basales. Los registros electroencefalográficos se realizaron en condiciones basales, sin estimulación auditiva. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media  $\pm$  MEE de la potencia total ponderada por la banda de frecuencia de interés ( $\mu$ V) de 28 controles y 25 con HA. CIC (colículo inferior), AU1 (corteza auditiva primaria), región CA1 del hipocampo y PrL (corteza prefrontal).

Tanto los controles como las ratas con HA presentan una potencia espectral similar durante el estado basal, con mayores potencias localizadas en la banda delta.

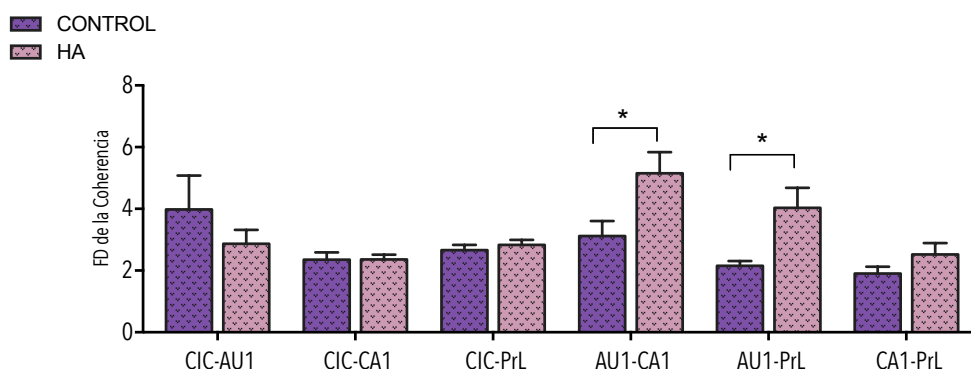
### 4.3.2 Coherencia en condiciones basales

Los espectros de coherencia entre pares de áreas (CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL y CA1-PrL) se calcularon para la condición basal de las ratas controles e HA con libre movimiento y sin estimulación. El aumento de la coherencia significa un aumento de la similitud de frecuencia y la consistencia de fase entre las señales oscilatorias en dos regiones cerebrales.

#### ■ Frecuencia dominante en la coherencia

Se calculó la FD en la coherencia entre cada una de las combinaciones de áreas, para las ratas control e HA (Tabla 11 y Figura 55).

|         | CIC-AU1   | CIC-CA1   | CIC-PrL   | AU1-CA1         | AU1-PrL          | CA1-PrL   |          |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------------|------------------|-----------|----------|
| CONTROL | 3,9 ± 1,1 | 2,3 ± 0,2 | 2,7 ± 0,1 | 3,1 ± 0,5       | 2,1 ± 0,1        | 1,9 ± 0,2 | [1-4 Hz] |
| HA      | 2,9±0,45  | 2,4±0,15  | 2,8±0,2   | <b>5,15±0,7</b> | <b>4,03±0,65</b> | 2,5±0,37  | [4-8 Hz] |



**TABLA 11 y Figura 55: Frecuencia dominante en la coherencia en ratas control y con HA durante la estimulación auditiva.** Se calculó la frecuencia dominante en la coherencia entre: CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1 y CA1-PrL. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media de la frecuencia dominante (Hz) ± MEE de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo con HA respectivamente. Los rangos de frecuencia de la banda delta [1-4 Hz] se muestran en color naranja y de la banda theta [4-8] Hz en color azul. CIC (colículo inferior), AU1 (corteza auditiva primaria), región CA1 del hipocampo y PrL (corteza prelámbica).

La FD de la coherencia en las ratas control en condiciones basales se encuentra en el rango de frecuencias delta en todas las combinaciones de áreas. En HA la FD de la coherencia se

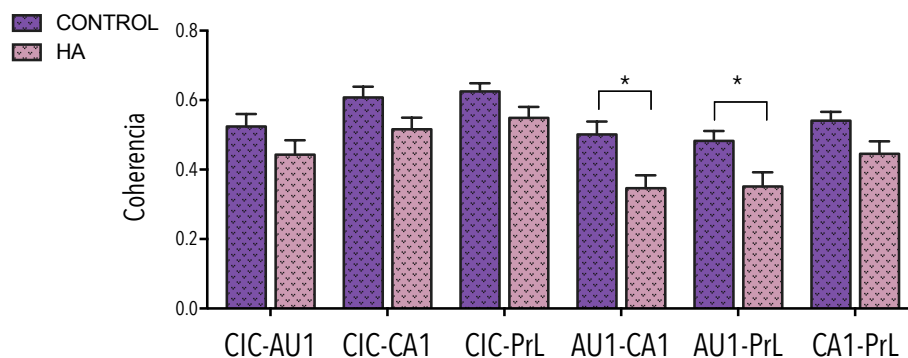
encuentra también en la banda de frecuencias delta en todas las combinaciones de áreas excepto entre AU1-CA1 ( $5,15 \pm 0,7$ ;  $p < 0,05$ ) y AU1-PrL ( $4,03 \pm 0,65$ ;  $p < 0,05$ ), donde hay un aumento de la frecuencia dominante a la banda theta.

En los dos grupos, la coherencia entre AU1-CA1 opera a los rangos de frecuencia más altos y la coherencia entre CIC-CA1 en los más bajos.

■ **Coherencia en la banda de frecuencia dominante**

Se calculó la coherencia durante las condiciones basales en la banda de FD para todas las combinaciones de áreas: CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL. Se analizaron las diferencias en la coherencia entre el grupo control y el grupo de HA (Figura 56 y Tabla 12).

|         | CIC-AU1   | CIC-CA1   | CIC-PrL   | AU1-CA1          | AU1-PrL          | CA1-PrL   |          |
|---------|-----------|-----------|-----------|------------------|------------------|-----------|----------|
| CONTROL | 0,5 ± 0,0 | 0,6 ± 0,0 | 0,6 ± 0,0 | 0,5 ± 0,0        | 0,5 ± 0,0        | 0,5 ± 0,0 | [1-4 Hz] |
| HA      | 0,4 ± 0,0 | 0,5 ± 0,0 | 0,5 ± 0,0 | <b>0,3 ± 0,0</b> | <b>0,4 ± 0,0</b> | 0,4 ± 0,0 | [4-8 Hz] |



**TABLA 12 y Figura 56: Coherencia en la banda de frecuencia dominante en ratas control y con HA en condiciones basales.** Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*post-hoc* Sidak) y se expresan como la media ± MEE de la coherencia (Hz) de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo con HA respectivamente. La coherencia en la banda delta [1-4 Hz] se muestran en color naranja y en la banda theta [4-8 Hz] en color azul.

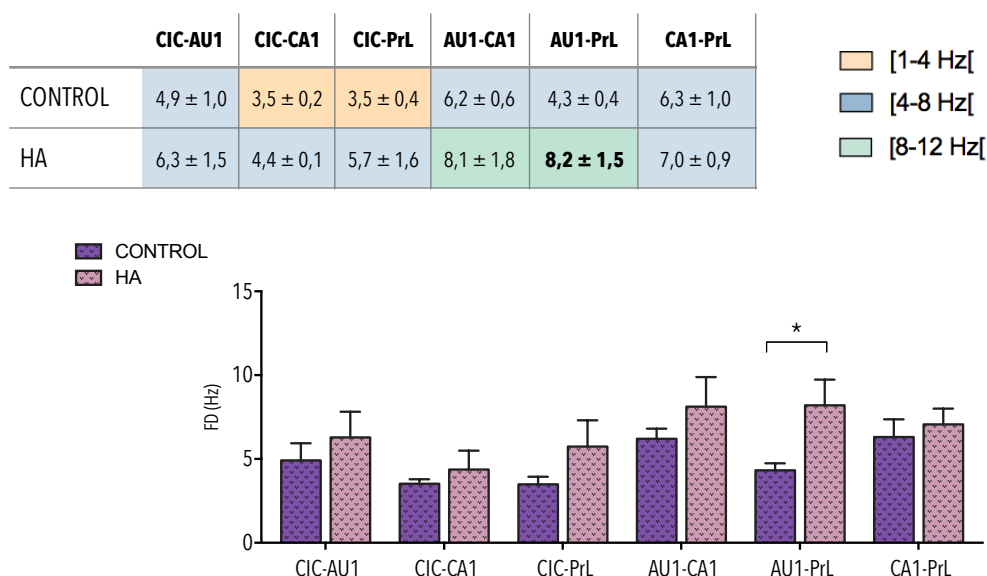
Aunque las diferencias entre controles e HA no son significativas en todas las áreas, observamos una tendencia a que las ratas HA tengan una menor coherencia entre las diferentes áreas en las condiciones basales. La coherencia entre las áreas AU1-CA1 y AU1-PrL son menores en las ratas HA (AU1-CA1=  $0,39 \pm 0,04$ ;  $p < 0,05$ ; AU1-PrL=  $0,39 \pm 0,04$ ;  $p < 0,05$ ) que en controles. Estas son las mismas áreas que presentan una mayor FD en la coherencia.

### 4.3.3 Causalidad funcional de Wiener-Granger en condiciones basales

Aplicando el test de causalidad de Wiener-Granger podemos comprobar si la diferencia de potencial cerebral de un área puede predecir los cambios en la diferencia de potencial de otra área, es decir, si la actividad cerebral de un área es la causa de la actividad de otra. También nos permite comprobar si la causalidad tiene carácter unidireccional o bidireccional. Aplicando este test a los registros electroencefalográficos basales sin que exista estimulación podemos evaluar si las diferentes áreas analizadas en este estudio se comunican de forma diferente en controles e HA en condiciones basales.

#### ■ Frecuencia dominante de la relación de causalidad entre las áreas

A continuación exponemos los resultados de la FD de la causalidad para los grupos de ratas control e HA en condiciones basales (Tabla 13 y Figura 57).



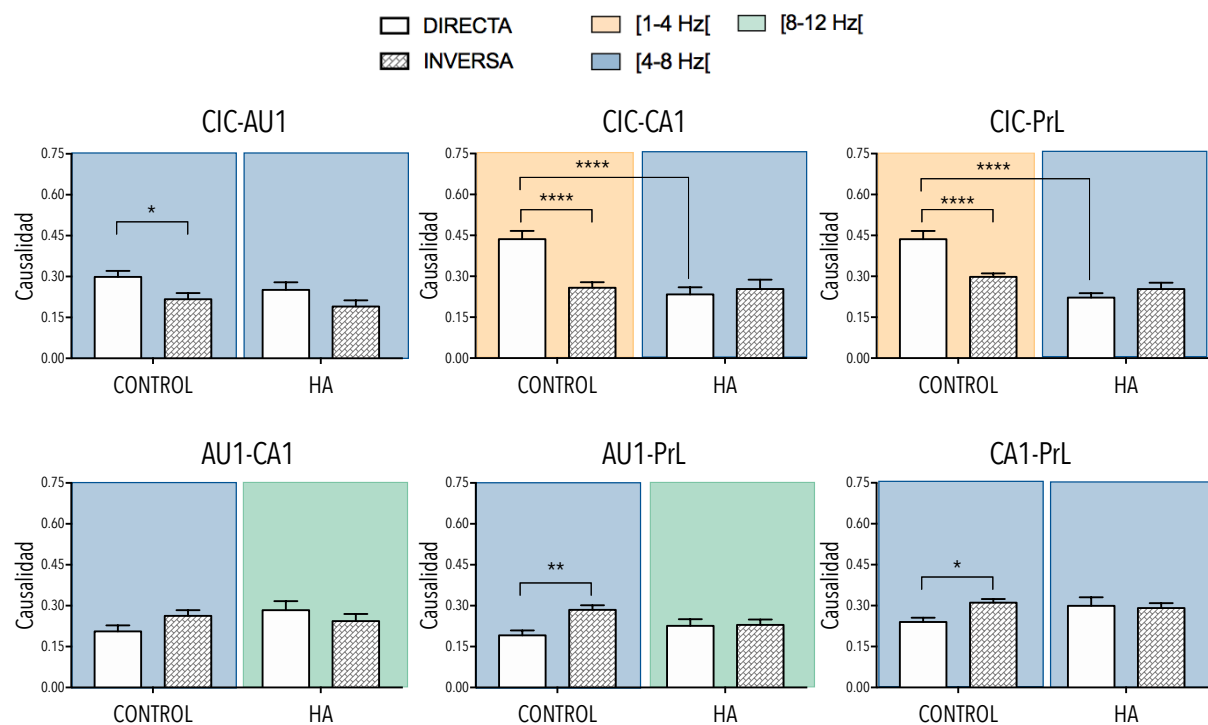
**TABLA 13 y Figura 57: Frecuencia dominante en la relación de causalidad entre las diferentes áreas en condiciones basales.** La frecuencia dominante en la causalidad se calculó en todas las combinaciones de áreas posibles: CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media ± MEE de la frecuencia dominante en la causalidad (Hz) de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo con HA respectivamente. Los rangos de frecuencia en la banda delta [1-4 Hz] se muestran en color naranja, en la banda theta [4-8 Hz] en color azul y en la banda beta baja [8-12] en color verde. Los resultados significativamente diferentes se indican con asteriscos en la figura y con negrita en la tabla.

La causalidad en las ratas control en condiciones basales entre CIC-AU1, AU1-CA1, AU1-PrL y CA1-PrL ocurre predominantemente en el rango de frecuencias de la banda theta. La causalidad entre las áreas CIC-CA1 y CIC-PrL ocurre en la banda de frecuencias delta.

La causalidad en ratas HA tiende a operar en frecuencias mayores que las de las controles en CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1 y AU1-PrL, siendo entre AU1-PrL estadísticamente significativa la diferencia (Control= 4,3 ± 0,4; HA= 8,2 ± 1,5;  $p < 0,05$ ). La FD se encuentra en el rango theta para las áreas: CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL y CA1-PrL, y en el rango beta baja para AU1-CA1 y AU1-PrL.

■ **Causalidad directa e inversa. ¿Qué sentido predomina en condiciones basales?**

Calculamos la causalidad directa (D) y la causalidad inversa (I) en el rango de frecuencias donde predomina la causalidad en condiciones basales entre las áreas: CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL. De esta forma podemos ver cómo fluye la información entre las diferentes áreas en las ratas control (Figura 58 y 59) y en las ratas con HA (Figura 58 y 60) en condiciones basales.



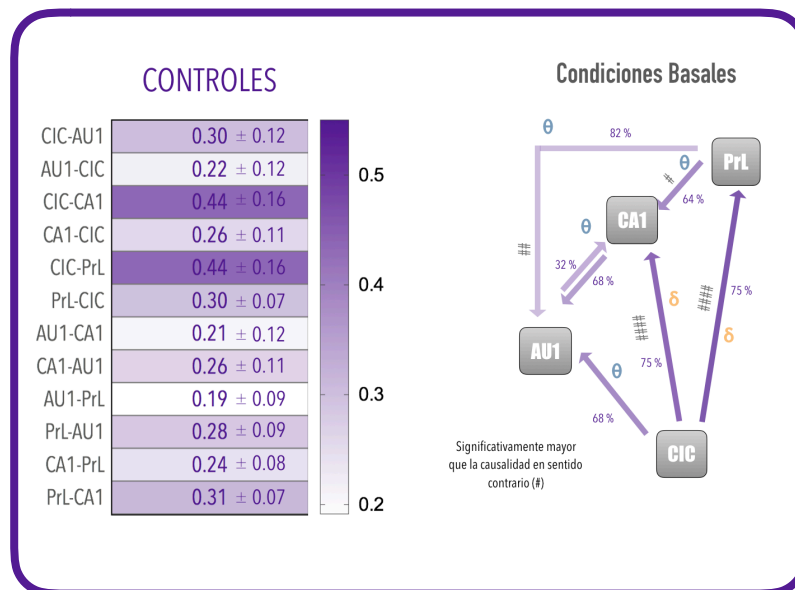
**Figura 58:** Causalidad directa e inversa en ratas control y con HA entre CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL, en condiciones basales. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*post-hoc* Bonferroni) y se expresan como la media ± MEE de la causalidad de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo con HA respectivamente. Las diferencias de causalidad se indican con \* ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ). La FD de cada causalidad se indica con diferentes colores  $\delta$  = naranja,  $\theta$  = azul bajo y  $\beta_B$  = verde.

**Causalidad en ratas control en condiciones basales**

En las ratas control en condiciones basales la información fluye en sentido CIC→CA1 y CIC→PrL, ya que la causalidad D en estos sentidos es mayor que la causalidad en los sentidos contrarios (I), lo que indica un mayor flujo de información desde el colículo inferior a áreas superiores ( $CI_{(CA1-CIC)}=0,26 \pm 0,11$ ;  $p<0,0001$ ;  $CD_{(CIC-PrL)}= 0,44 \pm 0,6$ ;  $CI_{(PrL-CIC)}= 0,30 \pm 0,07$ ;  $p<0,001$ ).

En las mismas condiciones la causalidad D es menor que la causalidad I en la combinación de áreas: AU1-PrL ( $CI_{(PrL-AU1)}= 0,28 \pm 0,09$ ;  $CD_{(AU1-PrL)}= 0,19 \pm 0,09$ ;  $p<0,01$ ) y CA1-PrL ( $CI_{(PrL-CA1)}= 0,31 \pm 0,17$ ;  $CD_{(CA1-PrL)}= 0,24 \pm 0,028$ ;  $p<0,05$ ). Esto indica un mayor flujo de información desde la corteza prelámbica a áreas inferiores. No existen diferencias significativas entre la causalidad D y la causalidad I en el resto de combinaciones de áreas, pero si hay una tendencia a que la información fluya desde CIC a AU1 y que sea bidireccional entre AU1 y CA1.

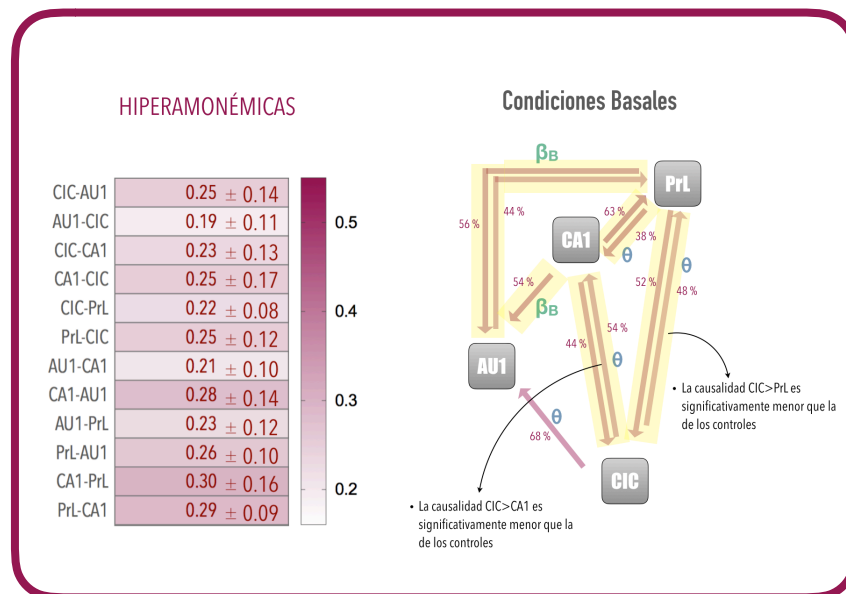
En resumen, en ratas control durante la condición de no estimulación auditiva, la causalidad fluye desde CIC a AU1, CA1 y PrL y desde PrL a CA1 y AU1 y de forma bidireccional entre AU1 y CA1 (Figura 59).



**Figura 59:** Causalidad directa (D) e inversa (I) en ratas control en condiciones basales y mapa de los principales sentidos de causalidad entre CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL, durante la estimulación auditiva. Los datos se expresan como la media ± DE (desviación estándar) de la causalidad directa y la del sentido contrario de 28 animales. Los valores de causalidad se gradúan por intensidad de color de acuerdo con la barra de la derecha. El sentido mayoritario de causalidad entre dos áreas se indica con flechas. También se representan la FD (frecuencia dominante) de la causalidad ( $\delta$  (delta)= [1-4 Hz];  $\theta$  (theta)= [4-8 Hz]), el porcentaje de ratas que responde en los sentidos mayoritarios (ver en ratio de causalidad neta en la siguiente sección). Las causalidades que son significativamente mayores en un sentido que en el sentido contrario se indican con # ( $##p<0,01$ ;  $###p<0,0001$ ).



### Causalidad en ratas hiperamonémicas en condiciones basales



**Figura 60:** Causalidad directa (D) e inversa (I) en ratas hiperamonémicas en condiciones basales y mapa de los principales sentidos de causalidad entre CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL, durante la estimulación auditiva. Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE (desviación estándar) de la causalidad directa y la del sentido contrario de 28 animales. Los valores de causalidad se gradúan por intensidad de color de acuerdo con la barra de la derecha. El sentido mayoritario de causalidad entre dos áreas se indica con flechas. También se representan la FD (frecuencia dominante) de la causalidad ( $\theta$  (theta)= [4-8 Hz];  $\beta_B$  (beta baja)= [8-12 Hz]), el porcentaje de ratas que responde en los sentidos mayoritarios (ver en ratio de causalidad neta en la siguiente sección). Las causalidades en un sentido diferente al de las ratas control se marcan con amarillo.

La causalidad D e I entre CIC-AU1 no parecen cambiar con la HA en comparación con las de las ratas control. El sentido de causalidad entre estas dos áreas se mantiene igual que en los controles, fluyendo la información desde CIC a AU1 (Figura 58 y 60).

La HA disminuye la causalidad D entre CIC→CA1 ( $0,23 \pm 0,15$ ;  $p < 0,0001$ ) en comparación con los controles en condiciones basales. Los valores de causalidad D e I son muy similares, por lo que la relación causal entre estas dos áreas es bidireccional y la información deja de fluir principalmente desde áreas inferiores a superiores como ocurría en controles (Figura 58 y 60).

La causalidad D entre CIC→PrL es menor ( $0,22 \pm 0,08$ ;  $p < 0,001$ ) que la causalidad D en controles en las mismas condiciones ( $0,44 \pm 0,16$ ). Sin embargo, los valores de causalidad I son muy similares a los de causalidad D por lo que la relación de causalidad entre estas dos áreas de nuevo está alterada respecto a la de las ratas control y la información deja de fluir en sentido CIC→PrL y se vuelve bidireccional con la HA (Figura 52 y 54).

La causalidad D entre  $AU1 \rightarrow CA1$ ,  $AU1 \rightarrow PrL$  y  $CA1 \rightarrow PrL$  no parece cambiar con la HA en comparación con el grupo control. Pero la causalidad I tiende a aumentar respecto a la causalidad I de los controles. Consecuentemente la comunicación en HA entre  $AU1-CA1$  deja de ser bidireccional y fluye desde  $CA1$  a  $AU1$ . Y por otro lado, la comunicación entre  $AU1-PrL$  y  $CA1-PrL$  deja de fluir desde áreas superiores a inferiores y se torna bidireccional (Figura 52 y 54).

En resumen, en las ratas HA no existen diferencias significativas entre la causalidad D y la causalidad I en condiciones basales, por lo que parece haber una relación de causalidad bidireccional entre  $CIC-CA1$ ,  $CIC-PrL$ ,  $CA1-PrL$ ,  $AU1-PrL$ . Existe una tendencia a que el flujo de información fluya desde el  $CIC$  a  $AU1$  y desde  $CA1$  a  $AU1$ . Vemos que la comunicación funcional en el estado basal en ratas HA está alterada en comparación con los controles ya que el sentido de la causalidad entre las diferentes áreas es diferente a las ratas control, exceptuando la causalidad entre  $CIC$  y  $AU1$  que se sigue manteniendo desde niveles inferiores a superiores.

### ■ Ratio de causalidad neta en condiciones basales

Calculamos el ratio de causalidad neta para estudiar cómo de constante es la comunicación entre las diferentes áreas en condiciones basales a través del porcentaje de ratas que responden en cada sentido y para comprobar si la influencia causal que veíamos en Granger estaba influenciada por valores de causalidad extremos de algunas ratas (Figura 61).

En condiciones basales en las ratas control se obtienen ratios de causalidad D e I con valores muy similares, aunque existe una tendencia a que la causalidad sea en sentido  $CIC > AU1$ ,  $CIC > CA1$ ,  $CIC > PrL$ ,  $PrL > AU1$  y  $PrL > CA1$ , los mismos sentidos que obteníamos con la causalidad de Granger. Además, el porcentaje de ratas que responden en estos sentidos es mayor que el porcentaje de ratas que responde en sentido contrario, indicando que es el sentido de causalidad prioritario ya que la mayor parte de las ratas responden y producen una mayor causalidad en dichos sentidos. Aunque la influencia causal  $AU1-CA1$  es igual en ambos sentidos, indicando una bidireccionalidad causal que también obteníamos con la causalidad de Granger, la causalidad  $AU1 > CA1$  depende de un número menor de ratas por lo que la respuesta en este sentido es menos constante.

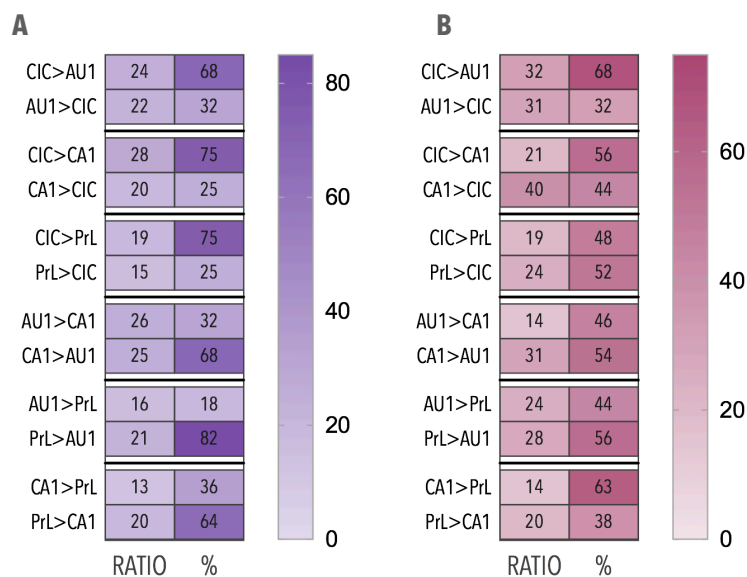
En ratas HA en condiciones basales de no estimulación el ratio de causalidad en la dirección  $CIC > AU1$  y el del sentido contrario tienen el mismo valor, sin embargo un mayor porcentaje de ratas responde en sentido  $CIC > AU1$ , en concordancia con los valores de causalidad de Granger que indicaban el sentido mayoritario de causalidad desde  $CIC$  a  $AU1$ . Un mayor porcentaje de ratas respondiendo en un sentido  $CIC > AU1$  indica una respuesta más constante en dicho sentido, sin embargo un número menor de ratas respondiendo en el sentido inverso tienen la misma influencia.

Aunque el ratio de causalidad es mayor en las direcciones CA1>CIC y PrL>CIC, el porcentaje de ratas HA que responden en un sentido ó en sentido contrario es prácticamente el mismo, en concordancia con los valores de bidireccionalidad en la causalidad de Granger. Al igual que ocurría antes en ratas control puede ocurrir que en la causalidad de Granger los valores altos de causalidad en sentido CA1>CIC y PrL>CIC se estén contrarrestando con valores de causalidad bajos de ratas que tengan poca influencia causal en este sentido.

El ratio de causalidad neta en sentido CA1>AU1 es mayor que en sentido contrario. Este sentido de causalidad coincide con el obtenido con la causalidad de Granger, sin embargo el porcentaje de ratas que responden en un sentido y en otro es prácticamente el mismo.

El ratio de causalidad y porcentaje de ratas que responden en la dirección PrL>AU1 son prácticamente los mismos que los de la dirección contraria cuando no hay estimulación auditiva, indicando una bidireccionalidad que también obteníamos con la causalidad de Granger.

El ratio de causalidad PrL>CA1 es mayor que en el sentido contrario, sin embargo un porcentaje menor de ratas responde en dicha dirección cuando no hay estimulación auditiva. En esta combinación de áreas la causalidad de Granger mostró bidireccionalidad.



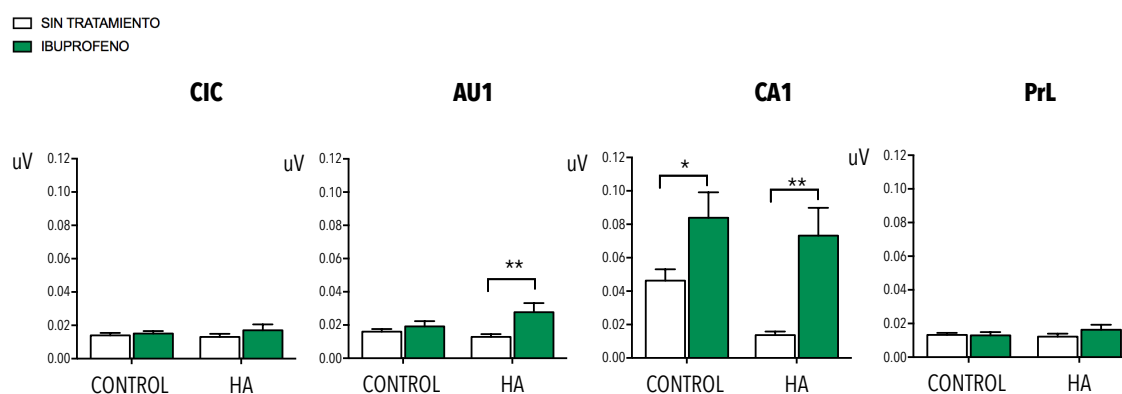
**Figura 61:** Ratio de causalidad neta entre las áreas CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL y porcentaje (%) de ratas que responde en cada sentido en A) ratas control e B) hiperamonemia, en condiciones basales. Se calculó el ratio de causalidad entre las diferentes combinaciones de áreas en el sentido directo e inverso. La dirección de causalidad de un área a otra se indica con el símbolo >. Los datos se expresan como la media del ratio de causalidad y el porcentaje de ratas que responden únicamente en la dirección indicada de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo de HA respectivamente. Los valores están graduados por intensidad de colores (barra derecha de cada tabla).

#### 4.4 El potencial MMN en ratas hiperamonémicas tratadas con Ibuprofeno

Tras 6-7 semanas de dieta rica en acetato de amonio y 4-5 semanas de tratamiento con Ibuprofeno (30 mg/Kg/día) y una semana después de la cirugía estereotáxica para la inserción de los electrodos en CIC, AU1, CA1 y PrL, se realizó el registro electroencefalográfico al mismo tiempo que se emitían los estímulos auditivos mediante el paradigma *roaring*, con la rata anestesiada con hidrato de cloral para asegurar que los potenciales auditivos que se generaban eran consecuencia del parámetro de estimulación del experimento y no de ruidos producidos por el movimiento de la rata. Se procesaron los registros para la obtención del ERP (del inglés *Event Related Potential*) MMN y se calcularon los siguientes parámetros en las ratas control y ratas HA, tratadas y sin tratar con Ibuprofeno:

##### 4.4.1 Amplitud del pico máximo del potencial MMN

El tratamiento durante 4-5 semanas con Ibuprofeno aumentó la amplitud del pico máximo en la región CA1 del hipocampo tanto en las ratas control ( $0,084 \pm 0,015 \mu\text{V}$ ;  $p < 0,05$ ) como en las ratas hiperamonémicas ( $0,073 \pm 0,017 \mu\text{V}$ ;  $p < 0,01$ ) respecto a sus correspondientes controles sin tratamiento (C=  $0,046 \pm 0,006 \mu\text{V}$ ; HA=  $0,014 \pm 0,002 \mu\text{V}$ ). El ibuprofeno aumentó también la amplitud del pico máximo de la onda en ratas HA ( $0,028 \pm 0,0055 \mu\text{V}$ ;  $p < 0,01$ ) respecto a las HA ( $0,013 \pm 0,002 \mu\text{V}$ ) sin tratar en AU1 (Figura 62).

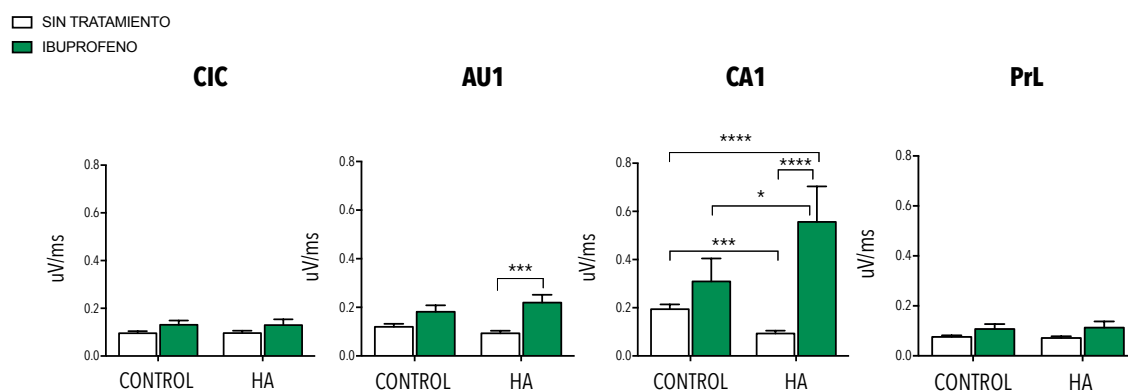


**Figura 62:** Amplitud del pico máximo del potencial MMN en ratas control y con HA con y sin tratamiento con Ibuprofeno. Los electrodos se insertaron estereotáxicamente en CIC (colículo inferior), AU1 (corteza auditiva primaria), región CA1 del hipocampo y PrL (corteza prelímbica). Se adquirieron los registros electroencefalográficos mientras se emitían los sonidos necesarios mediante el paradigma *roaring* para evocar el potencial MMN. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media  $\pm$  MEE del la amplitud en  $\mu\text{V}$  del pico máximo de la onda MMN. El número de animales del grupo control sin tratamiento fue 47 y con tratamiento 14 y del grupo con HA 34 y 10, con y sin Ibuprofeno respectivamente. Los valores significativamente diferentes se indican con asteriscos negros (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Como veíamos en el apartado 4.1.1 el pico de amplitud máxima del potencial MMN en CA1 en ratas HA sin tratar es significativamente menor que en las ratas control. Esta disminución se revierte por el tratamiento con Ibuprofeno. La amplitud del pico máximo de las ratas HA tratadas con Ibuprofeno no es diferente del de las ratas control tratadas con Ibuprofeno, siendo incluso mayor que el de las ratas control sin tratar.

#### 4.4.2 Área bajo la curva del potencial MMN

El tratamiento durante 4-5 semanas con Ibuprofeno aumentó el área bajo la curva de las ratas con HA ( $0,70 \pm 0,20 \mu\text{V}/\text{ms}$ ) respecto a los controles tratados ( $0,31 \pm 0,095 \mu\text{V}/\text{ms}$ ;  $p < 0,05$ ) y sin tratar ( $0,19 \pm 0,019 \mu\text{V}/\text{ms}$ ;  $p < 0,0001$ ) y respecto a las HA sin tratar ( $0,093 \pm 0,012 \mu\text{V}/\text{ms}$ ;  $p < 0,0001$ ) en la región CA1 del hipocampo. El tratamiento con ibuprofeno también aumentó significativamente el área bajo la curva en AU1 en ratas HA ( $0,22 \pm 0,032 \mu\text{V}/\text{ms}$ ;  $p < 0,001$ ) respecto a a las ratas HA sin tratar (Figura 63).



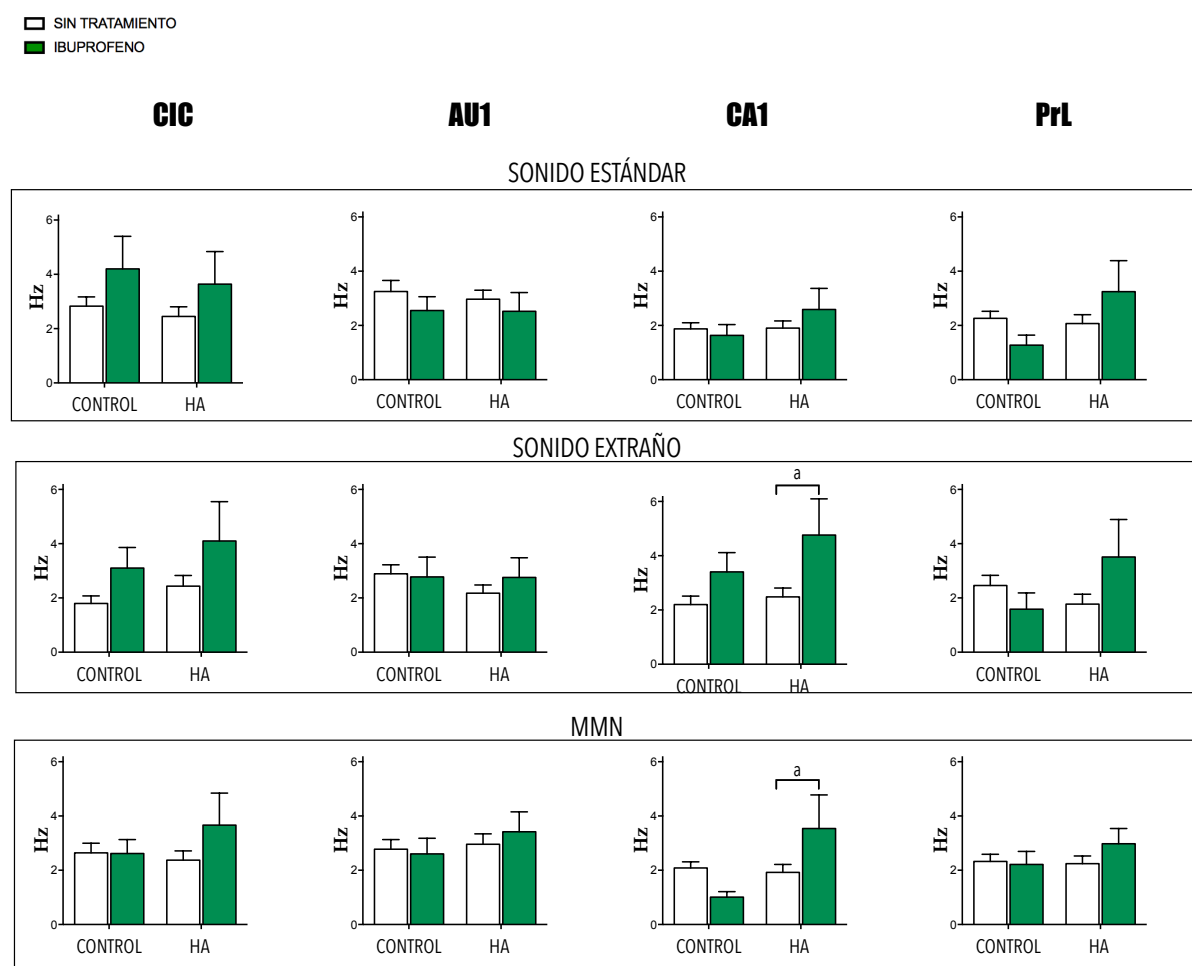
**Figura 63:** Área bajo la curva del potencial MMN en ratas control y con HA con y sin tratamiento con Ibuprofeno. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media  $\pm$  MEE del área bajo la curva del potencial MMN en  $\mu\text{V}/\text{ms}$ . El número de animales del grupo control sin tratamiento fue 47 y con tratamiento 14 y del grupo con HA 34 y 10, con y sin Ibuprofeno respectivamente. Los valores significativamente diferentes se indican con asteriscos ( $*p < 0,05$ ;  $****p < 0,0001$ ).

El área bajo la curva del potencial MMN en CA1 en ratas con HA sin tratar es significativamente menor que en las ratas control. Esta disminución se revierte por el tratamiento con Ibuprofeno. El área bajo la curva de las ratas con HA tratadas con Ibuprofeno es mayor al de las ratas control tratadas o no con Ibuprofeno.

#### 4.4.3 Frecuencia dominante

Se obtuvo la FD del espectro de potencias de los PEs cuando se emitía el sonido estándar, el sonido extraño y del MMN para posteriormente comparar el posible efecto del Ibuprofeno

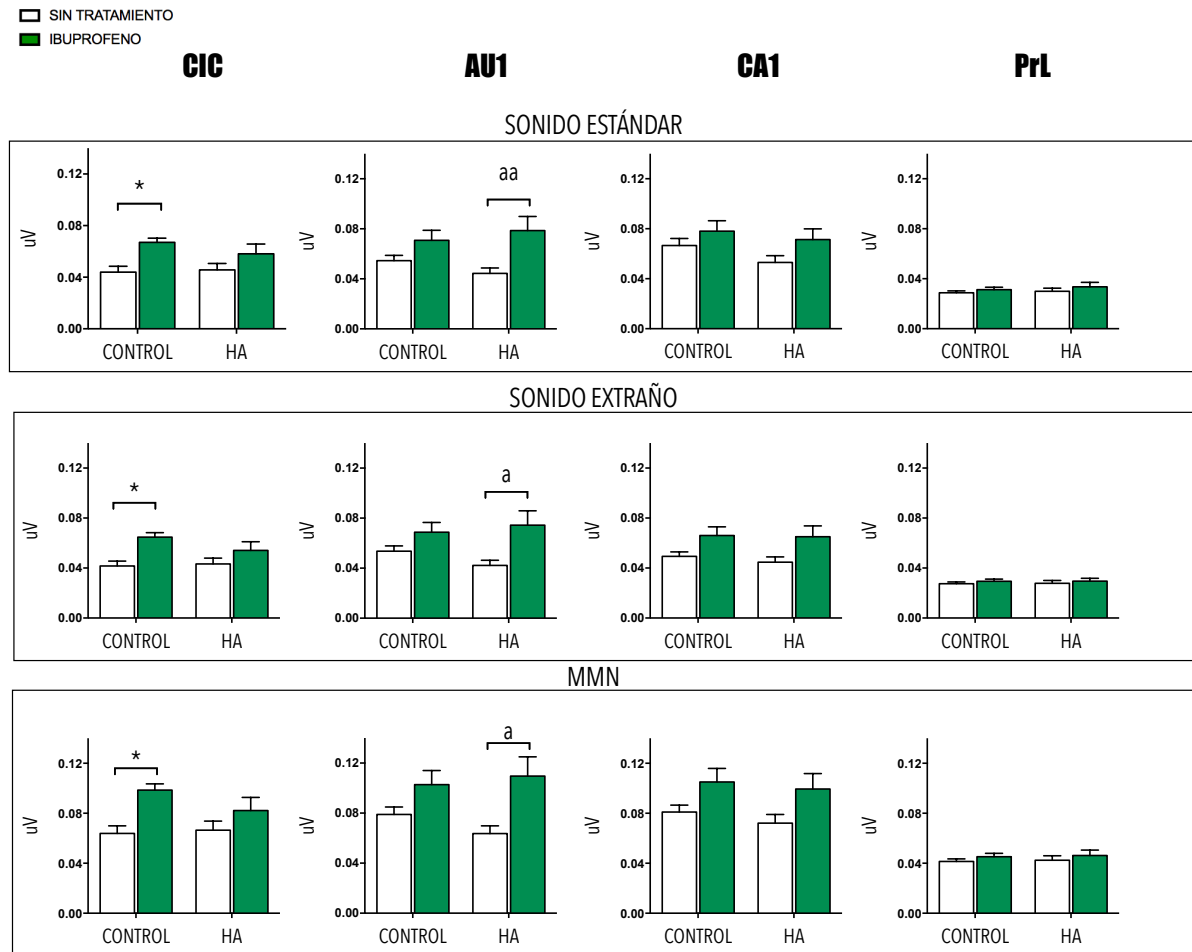
en los diferentes grupos. El tratamiento con Ibuprofeno no afectó significativamente la FD de la respuesta al sonido estándar ó al sonido extraño ó en la respuesta MMN en ninguna de las áreas analizadas, exceptuando en la región CA1 en ratas con HA en la que se produjo un aumento de la FD en el PE por el sonido extraño ( $4,8 \pm 1,2 \mu\text{V}$ ;  $p < 0,05$ ) y en la respuesta MMN ( $3,5 \pm 0,20 \mu\text{V}$ ;  $p < 0,05$ ) respecto a las con HA sin tratar ( $2,4 \pm 0,20 \mu\text{V}$ ;  $1,9 \pm 0,20 \mu\text{V}$  respectivamente). Sin embargo, se observa una clara tendencia del Ibuprofeno a aumentar la FD, tanto en las ratas control como en las ratas con HA, del PE por el sonido estándar en CIC y CA1 y en el PE por el sonido extraño en CIC. Por otro lado, el Ibuprofeno en controles tiende a disminuir la FD del MMN en CA1 y de los PEs por el sonido estándar y extraño en PrL (Figura 64).



**Figura 64:** Frecuencia dominante (FD) del PE por el sonido estándar, extraño y MMN en ratas control y con HA con y sin tratamiento con Ibuprofeno. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Sidak) y se presentan como la media  $\pm$  MEE de la frecuencia dominante (Hz) de los potenciales evocados por el sonido estándar, por el sonido extraño y en la respuesta MMN. El número de animales del grupo control sin tratamiento fue 47 y con tratamiento 14 y del grupo con HA 34 y 10, con y sin Ibuprofeno respectivamente. Los valores significativamente diferentes a los de las ratas HA sin tratamiento se indican con la letra a ( $p < 0,05$ ).

4.4.4 Media de las desviaciones estándar (*mstd*)

Para estudiar el efecto del Ibuprofeno sobre la irregularidad de la respuesta eléctrica cerebral se calculó la media de las desviaciones estándar (*mstd*) de todos los puntos que conforman los PEs por la emisión de sonidos estándar, extraños y del MMN (Figura 65).



**Figura 65:** Media de las desviaciones estándar (*mstd*) en ratas control y con HA, con y sin tratamiento con Ibuprofeno de los PEs por el sonido estándar, el sonido extraño y en la MMN. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Sidak) y se presentan como la media  $\pm$  MEE de la *mstd* ( $\mu$ V) de los potenciales evocados por el sonido estándar, por el sonido extraño y en la respuesta MMN. El número de animales del grupo control sin tratamiento fue 47 y con tratamiento 14 y del grupo con HA 34 y 10, con y sin Ibuprofeno respectivamente. Los valores significativamente diferentes al control se indican con asteriscos (\* $p < 0,05$ ) y los significativamente diferentes a los de las ratas HA sin tratamiento se indican con la letra a ( $^ap < 0,05$ ;  $^{aap} < 0,01$ ).

El tratamiento con Ibuprofeno en controles aumentó la variabilidad del PE por el sonido estándar ( $0,067 \pm 0,003 \mu$ V;  $p < 0,05$ ), el sonido extraño ( $0,065 \pm 0,003 \mu$ V;  $p < 0,05$ ) y del MMN ( $0,099 \pm 0,005 \mu$ V;  $p < 0,05$ ) en CIC respecto a los controles sin tratar ( $mstd_{STD} = 0,044 \pm 0,004 \mu$ V;  $mstd_{Extraño} = 0,042 \pm 0,004 \mu$ V;  $mstd_{MMN} = 0,064 \pm 0,006 \mu$ V).

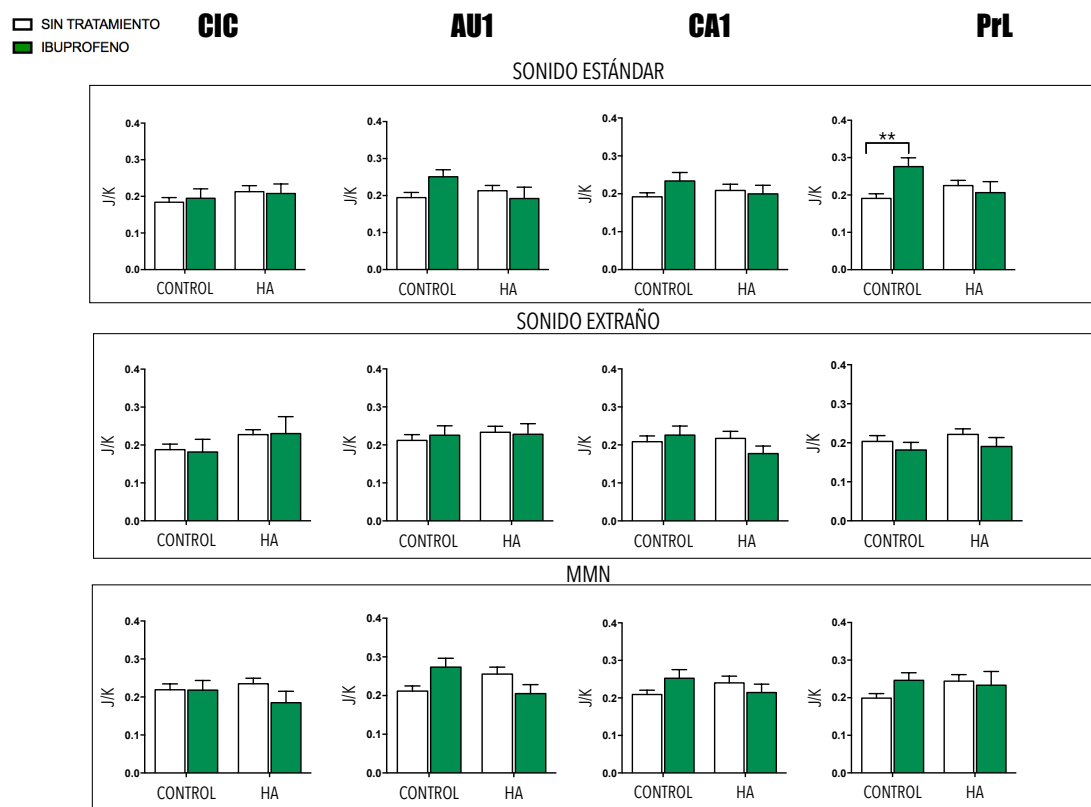
En HA el Ibuprofeno aumentó la *mstd* del PE por el sonido estándar ( $0,079 \pm 0,01 \mu$ V;  $p < 0,01$ ), el sonido extraño ( $0,074 \pm 0,0114 \mu$ V;  $p < 0,05$ ) y del MMN ( $0,109 \pm 0,015 \mu$ V;  $p < 0,05$ ) en AU1

respecto a las mismas ratas sin tratar ( $mstd_{STD} = 0,044 \pm 0,004 \mu V$ ;  $mstd_{Extraño} = 0,042 \pm 0,004 \mu V$ ;  $mstd_{MMN} = 0,064 \pm 0,0061 \mu V$ ).

En general, aunque no se alcance la significación estadística en todos los casos, podemos observar que el tratamiento con Ibuprofeno tiende a aumentar la variabilidad de los potenciales evocados producidos por el sonido estándar, el sonido extraño y el MMN en el grupo de controles e HA en todas las áreas excepto en PrL.

#### 4.4.5 Entropía

Para estudiar el efecto del Ibuprofeno sobre el nivel de desorden de la respuesta eléctrica cerebral se calculó la entropía del PE por el sonido extraño, el sonido estándar y el MMN (Figura 66).



**Figura 66:** Media de la entropía en ratas control e HA, con y sin tratamiento con Ibuprofeno de los potenciales evocados por el sonido estándar, el sonido extraño y en la MMN. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*post-hoc* Sidak) y se presentan como la media  $\pm$  MEE de la entropía (J/K) de los potenciales evocados por el sonido estándar, por el sonido extraño y en la respuesta MMN. El número de animales del grupo control sin tratamiento fue 47 y con tratamiento 14 y del grupo con HA 34 y 10, con y sin Ibuprofeno respectivamente. Los valores significativamente diferentes al control se indican con asteriscos (\*\* $p < 0,01$ ).



En el PE por los sonidos estándares en PrL se observa un aumento significativo de la entropía en las ratas control tratadas con Ibuprofeno ( $0,276 \pm 0,023$  J/K;  $p < 0,01$ ) respecto a las controles sin tratar ( $0,191 \pm 0,0125$  J/K).

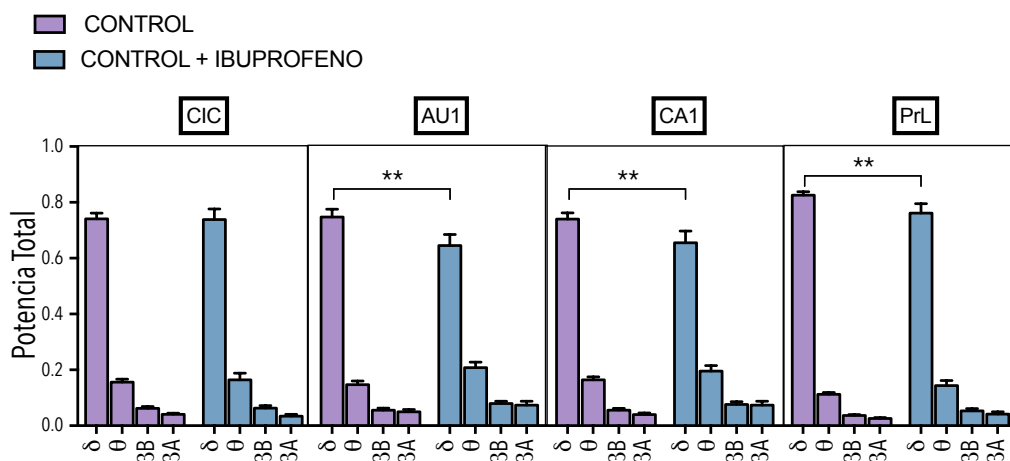
El tratamiento con Ibuprofeno no parece afectar al grado de desorden del resto de PEs en ninguno de los grupos ni en ninguna de las áreas.

#### 4.5 Análisis de los potenciales locales de campo durante la estimulación auditiva en ratas hiperamonémicas tratadas con Ibuprofeno

Tras 6-7 semanas de dieta rica en acetato de amonio, 4-5 semanas de tratamiento con ibuprofeno (30 mg/Kg/día) y una semana después de la cirugía estereotáxica para la inserción de los electrodos en CIC, AU1, CA1 y PrL, se realizó un registro electroencefalográfico mientras se emitían sonidos mediante el paradigma *roaring*. Se calcularon los siguientes parámetros en el registro de potencial de campo local (LFP, *Local Field Potential*) para las bandas del espectro delta [ $\delta = 1-4$  Hz], theta [ $\theta = 4-8$  Hz], beta bajo [ $\beta_B = 8-12$  Hz] y beta alto [ $\beta_A = 12-30$  Hz]:

##### 4.5.1 Media de la energía espectral normalizada en la banda de interés

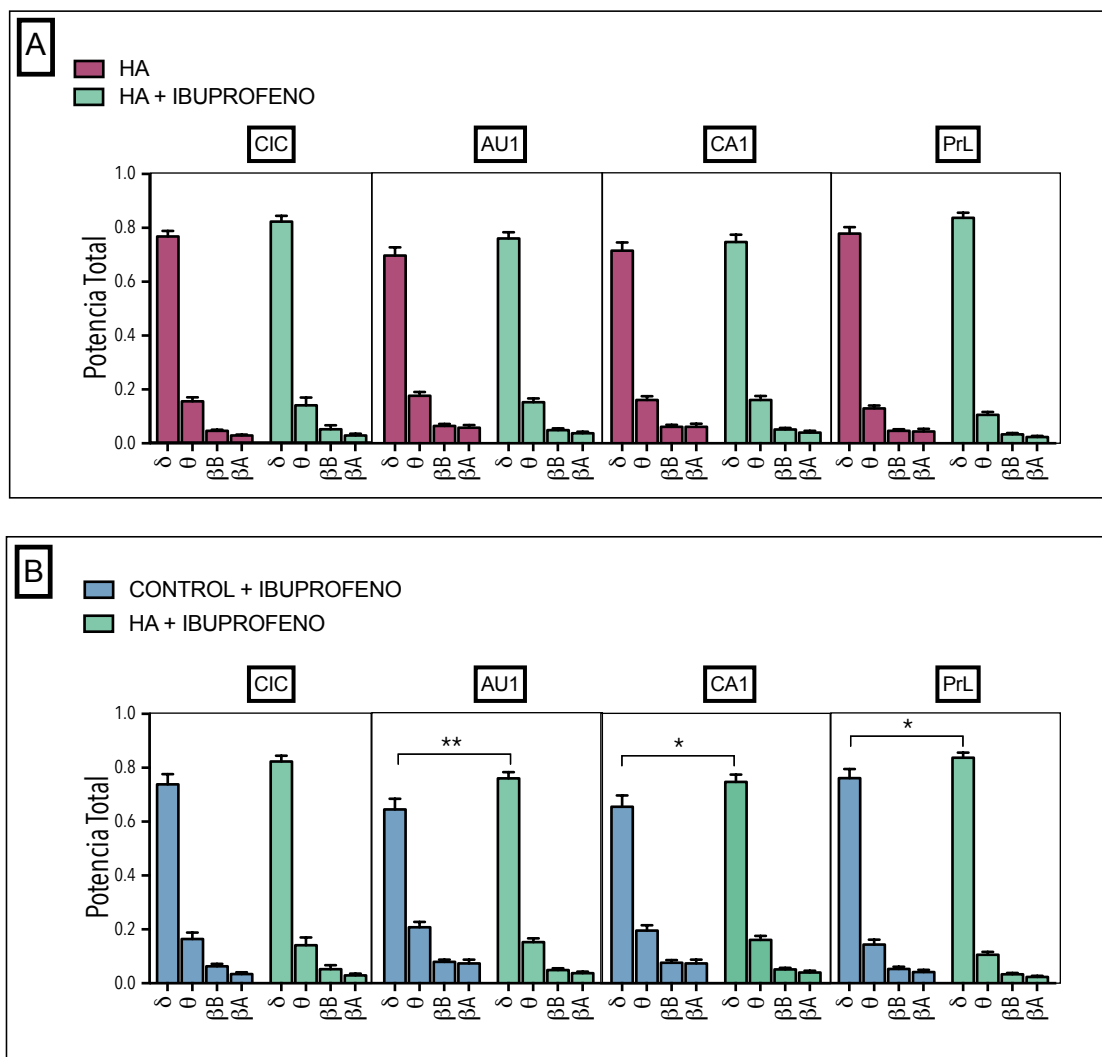
Se calculó la potencia de cada banda de frecuencia (ponderada por la frecuencia de cada banda) respecto a la potencia total del espectro para obtener una representación por frecuencias de la potencia del registro (Potencia Espectral) en ratas control e HA con y sin tratamiento con Ibuprofeno (Figura 67).



**Figura 66:** Media de la energía espectral normalizada en la banda de interés en las ratas control con y sin Ibuprofeno durante la estimulación auditiva (MMN). Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*post-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media  $\pm$  MEE de la potencia total ponderada por la banda de frecuencia de interés ( $\mu$ V) de 28 ratas control y 14 ratas control tratadas con Ibuprofeno. CIC (colículo inferior), AU1 (corteza auditiva primaria), región CA1 del hipocampo y PrL (corteza prelámbica). Las diferencias significativas se indican con \* (\*\* $p < 0,01$ ).

En ratas control con Ibuprofeno la mayor parte de la potencia se localiza en el rango de frecuencias delta [1-4 Hz] igual que las ratas control sin tratamiento. Sin embargo, el tratamiento produce una disminución de la potencia de esta banda en AU1 ( $0,6 \pm 0,0 \mu V$ ;  $p < 0,01$ ), CA1 ( $0,6 \pm 0,0 \mu V$ ;  $p < 0,01$ ) y PrL ( $0,8 \pm 0,0 \mu V$ ;  $p < 0,01$ ), respecto a los controles sin tratar ( $0,6 \pm 0,0 \mu V$ ;  $0,6 \pm 0,0 \mu V$  y  $0,8 \pm 0,0 \mu V$ , respectivamente) (Figura 66).

En las ratas con HA tratadas con Ibuprofeno la mayor parte de la potencia se concentra en el rango de frecuencias delta como sus correspondientes controles sin tratar, pero el tratamiento con Ibuprofeno tiende a aumentar la potencia de la banda delta (Figura 67A).



**Figura 67:** A) Media de la energía espectral normalizada en la banda de interés en las ratas hiperamonémicas con y sin Ibuprofeno y B) Media de la energía espectral normalizada en la banda de interés en las ratas control e hiperamonémicas con Ibuprofeno durante la estimulación auditiva. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*post-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media  $\pm$  MEE de la potencia total ponderada por la banda de frecuencia de interés ( $\mu V$ ) de 24 ratas con HA, 10 y 28 ratas control e HA tratadas con Ibuprofeno, respectivamente. CIC (colículo inferior), AU1 (corteza auditiva primaria), región CA1 del hipocampo y PrL (corteza prelímbica). Las diferencias significativas se indican con \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ).

La disminución de la potencia delta en controles con el Ibuprofeno y la tendencia a aumentarla en la HA hace que la potencia espectral en la banda delta en estos dos grupos sea significativamente mayor en ratas HA que en controles (Figura 67 B) en AU1 ( $C_{\text{Ibuprofeno}} = 0,64 \pm 0,04 \mu\text{V}$ ;  $HA_{\text{Ibuprofeno}} = 0,76 \pm 0,02$ ;  $p < 0,01$ ), en CA1 ( $C_{\text{Ibuprofeno}} = 0,65 \pm 0,04 \mu\text{V}$ ;  $HA_{\text{Ibuprofeno}} = 0,75 \pm 0,03$ ;  $p < 0,05$ ) y en PrL ( $C_{\text{Ibuprofeno}} = 0,76 \pm 0,03 \mu\text{V}$ ;  $HA_{\text{Ibuprofeno}} = 0,84 \pm 0,02$ ;  $p < 0,05$ ).

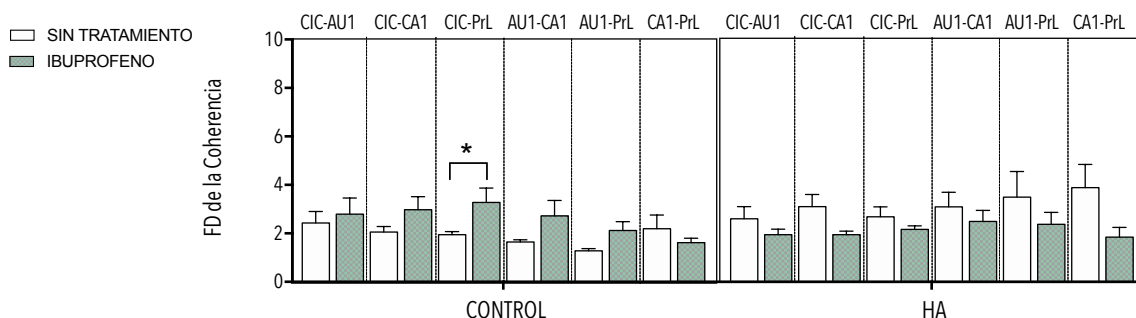
### 4.5.2 Coherencia

La coherencia, como hemos explicado en apartados anteriores, es una representación numérica de la fuerza de la relación lineal entre la actividad entre dos áreas diferentes para una banda de frecuencias elegida. Sus valores van de 0 (ninguna asociación) a 1 (asociación total), en la práctica valores por encima de 0,6 indicarían una fuerte semejanza.

#### ■ Frecuencia dominante en la coherencia

Se calculó la FD en la coherencia entre todas las combinaciones de áreas durante la respuesta MMN evocada con el paradigma *roaring*. Posteriormente se calculó la coherencia en la banda de FD (Tabla 14 y Figura 68).

|                     | CIC-AU1   | CIC-CA1   | CIC-PrL          | AU1-CA1          | AU1-PrL   | CA1-PrL   |            |
|---------------------|-----------|-----------|------------------|------------------|-----------|-----------|------------|
| CONTROL             | 3,9 ± 1,1 | 2,0 ± 0,2 | 1,9 ± 0,1        | 1,6 ± 0,1        | 1,3 ± 0,1 | 1,6 ± 0,1 |            |
| HA                  | 2,6 ± 0,5 | 3,1 ± 0,5 | 2,7 ± 0,4        | <b>3,0 ± 0,6</b> | 2,6 ± 0,6 | 2,7 ± 0,6 | ■ [1-4 Hz] |
| CONTROL+ Ibuprofeno | 2,8 ± 0,7 | 2,9 ± 0,5 | <b>3,2 ± 0,6</b> | 2,7 ± 0,6        | 2,1 ± 0,3 | 1,6 ± 0,2 |            |
| HA+ Ibuprofeno      | 1,9 ± 0,3 | 1,9 ± 0,1 | 2,5 ± 0,4        | 2,5 ± 0,5        | 2,4 ± 0,5 | 1,8 ± 0,4 |            |



**TABLA 14 y Figura 68: Frecuencia dominante (FD) en la coherencia en controles y con HA con y sin Ibuprofeno durante la estimulación auditiva.** Se calculó la frecuencia dominante en la coherencia entre: CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1 y CA1-PrL. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media de la frecuencia dominante (Hz) ± MEE de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo de HA respectivamente, y 14 y 10 controles e HA tratados con Ibuprofeno, respectivamente. Los rangos de frecuencia de la banda delta [1-4 Hz] se muestran en color naranja. CIC (colículo inferior), AU1 (corteza auditiva primaria), región CA1 del hipocampo y PrL (corteza prelímbica). Las diferencias significativas se indican con \* ( $*p < 0,5$ ) en la figura y en negrita en la tabla.

El tratamiento con Ibuprofeno en controles aumenta la FD de la coherencia entre CIC-PrL ( $C = 1,9 \pm 0,1$  Hz;  $C_{\text{Ibuprofeno}} = 3,2 \pm 0,6$  Hz;  $p < 0,05$ ) y tiende a aumentarla entre CIC-CA1, AU1-CA1 y AU1-PrL, manteniéndose en el rango de frecuencias delta.

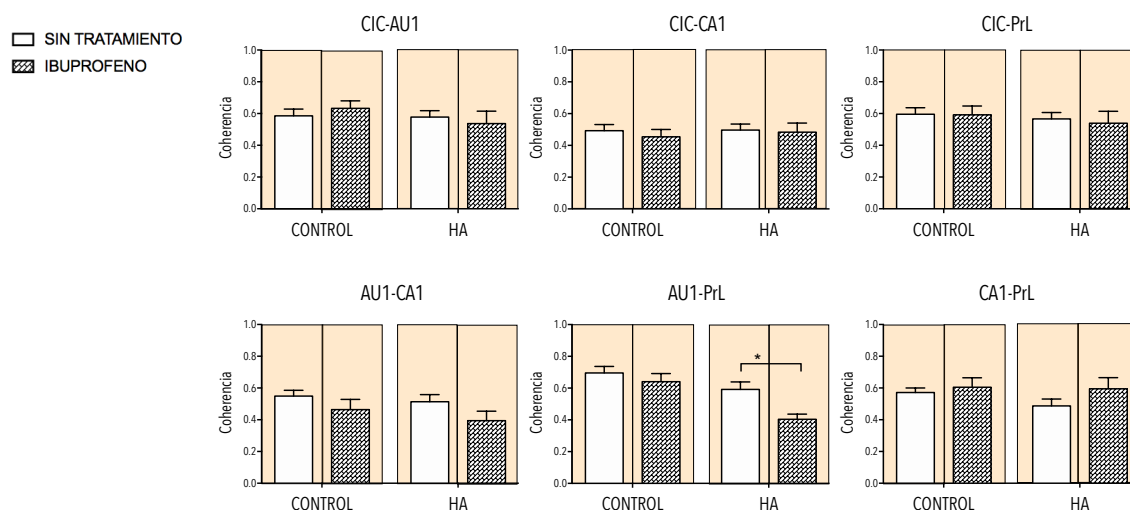
En ratas HA el tratamiento con Ibuprofeno tiende a disminuir ligeramente la FD de la coherencia en todas las combinaciones de áreas, especialmente entre CIC-CA1 y CA1-PrL.

■ **Coherencia en la banda de frecuencia dominante**

Se calculó la coherencia en la banda de FD para todas las combinaciones de áreas: CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL. Se analizaron las diferencias en la coherencia entre el grupo control y el grupo HA con los grupos con tratamiento con Ibuprofeno. Se incluyen las diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de HA analizados en el apartado 4.1.2.2 (Tabla 15 y Figura 68).

|                    | CIC-AU1     | CIC-CA1     | CIC-PrL     | AU1-CA1     | AU1-PrL            | CA1-PrL     |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------|-------------|
| CONTROL            | 0,58 ± 0,04 | 0,49 ± 0,04 | 0,60 ± 0,04 | 0,55 ± 0,04 | 0,69 ± 0,04        | 0,59 ± 0,03 |
| HA                 | 0,58 ± 0,04 | 0,50 ± 0,04 | 0,44 ± 0,04 | 0,57 ± 0,04 | 0,60 ± 0,04        | 0,49 ± 0,04 |
| CONTROL+Ibuprofeno | 0,63 ± 0,05 | 0,45 ± 0,05 | 0,59 ± 0,05 | 0,46 ± 0,06 | 0,64 ± 0,05        | 0,56 ± 0,04 |
| HA+Ibuprofeno      | 0,53 ± 0,08 | 0,48 ± 0,06 | 0,54 ± 0,07 | 0,40 ± 0,06 | <b>0,40 ± 0,03</b> | 0,60 ± 0,07 |

■ [1-4 Hz]



**TABLA 15 y Figura 69: Coherencia en la banda de frecuencia dominante durante la estimulación auditiva en ratas control y con HA, con y sin Ibuprofeno.** Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*post-hoc* Sidak) y se expresan como la media ± MEE de la coherencia (Hz) de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo de HA respectivamente, y 14 y 10 controles e HA tratados con Ibuprofeno, respectivamente. La coherencia en la banda delta [1-4 Hz] se muestran en color naranja y en la banda theta [4-8 Hz] en color azul. Las diferencias respecto al grupo control se indican con \* ( $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ) y se resaltan en negrita en la tabla.

El tratamiento con Ibuprofeno en HA disminuye la coherencia entre AU1-PrL ( $0,59 \pm 0,05$ ;  $0,40$   $0,06$ ;  $p < 0,5$ ) y tiende a disminuirla entre AU1-CA1 y aumentarla entre CA1-PrL.

### 4.5.3 Causalidad funcional de Wiener-Granger

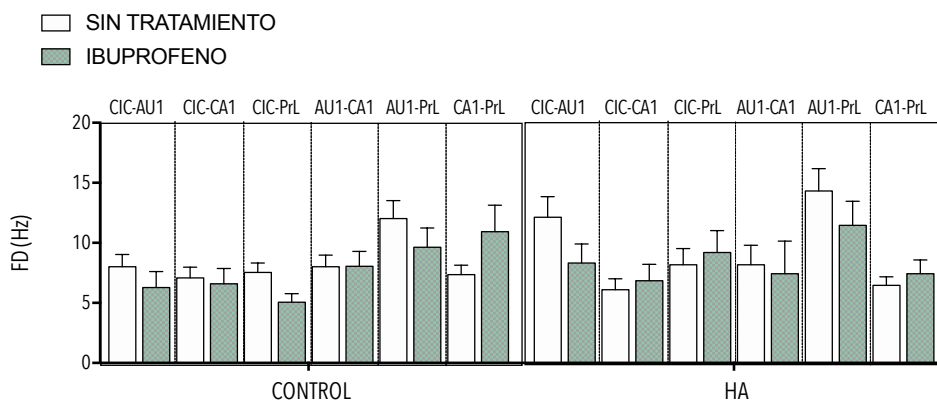
Siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 4.1.2.2 aplicamos este test de nuevo en las ratas controles e hiperamonémicas tratadas con Ibuprofeno para ver el efecto del antiinflamatorio sobre la influencia causal entre las distintas combinaciones de áreas.

#### ■ Frecuencia dominante de la relación de causalidad entre las áreas

A continuación exponemos los resultados de la FD de la causalidad para los grupos de ratas control e HA, con y sin tratamiento con Ibuprofeno (Tabla 16 y Figura 69).

|                    | CIC-AU1    | CIC-CA1   | CIC-PrL   | AU1-CA1   | AU1-PrL    | CA1-PrL    |  |
|--------------------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|--|
| CONTROL            | 8,0 ± 1,0  | 7,0 ± 0,9 | 7,5 ± 0,8 | 8,0 ± 0,9 | 12,0 ± 1,5 | 7,4 ± 0,7  |  |
| HA                 | 12,1 ± 1,7 | 6,1 ± 0,9 | 8,2 ± 1,3 | 8,2 ± 1,6 | 14,3 ± 1,8 | 6,5 ± 0,7  |  |
| CONTROL+Ibuprofeno | 6,3 ± 1,3  | 6,6 ± 1,3 | 5,1 ± 0,7 | 8,0 ± 1,2 | 9,6 ± 1,6  | 10,9 ± 2,2 |  |
| HA+Ibuprofeno      | 8,3 ± 1,6  | 6,8 ± 1,4 | 9,2 ± 1,8 | 7,4 ± 2,7 | 11,5 ± 2,0 | 7,4 ± 1,1  |  |

[1-4 Hz[
  [4-8 Hz[
  [8-12 Hz[
  [12-30 Hz]



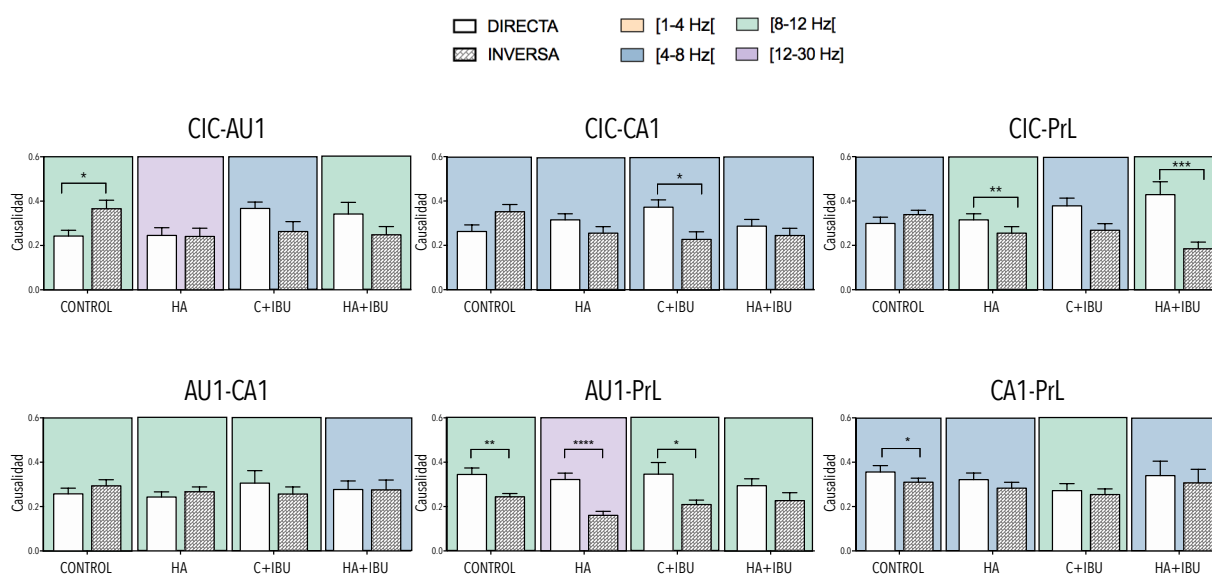
**TABLA 16 y Figura 69: Frecuencia dominante (FD) en la causalidad en controles y con HA, con y sin Ibuprofeno durante la estimulación auditiva.** Se calculó la frecuencia dominante en la causalidad entre: CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1 y CA1-PrL. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media de la frecuencia dominante (Hz) ± MEE de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo de HA respectivamente, y 14 y 10 controles e HA tratados con Ibuprofeno, respectivamente. Los rangos de frecuencia de la banda delta [1-4 Hz[ se muestran en color naranja, de la banda theta [4-8[ Hz] en color azul, de beta baja [8-12 Hz[ en color verde y beta alta [12-30 Hz] en lila. CIC (colículo inferior), AU1 (corteza auditiva primaria), región CA1 del hipocampo y PrL (corteza prelímbica). Se resaltan en las HA las FD que se restauran con el tratamiento con Ibuprofeno.

En controles, aunque las diferencias no son significativas se observa una clara tendencia del Ibuprofeno a disminuir la FD de la causalidad entre CIC-PrL y AU1-PrL. Por otro lado, el Ibuprofeno tiende a aumentar la frecuencia en la que la influencia causal entre CA1-PrL es mayoritaria de la banda theta a la banda beta baja.

En ratas HA el Ibuprofeno restaura la FD de la causalidad entre CIC-AU1 y AU1-PrL al disminuirla de la banda beta alta a la banda beta baja, alcanzando el mismo rango de frecuencias que los controles.

■ **Causalidad directa e inversa. ¿Se restaura la comunicación durante la respuesta MMN con el Ibuprofeno?**

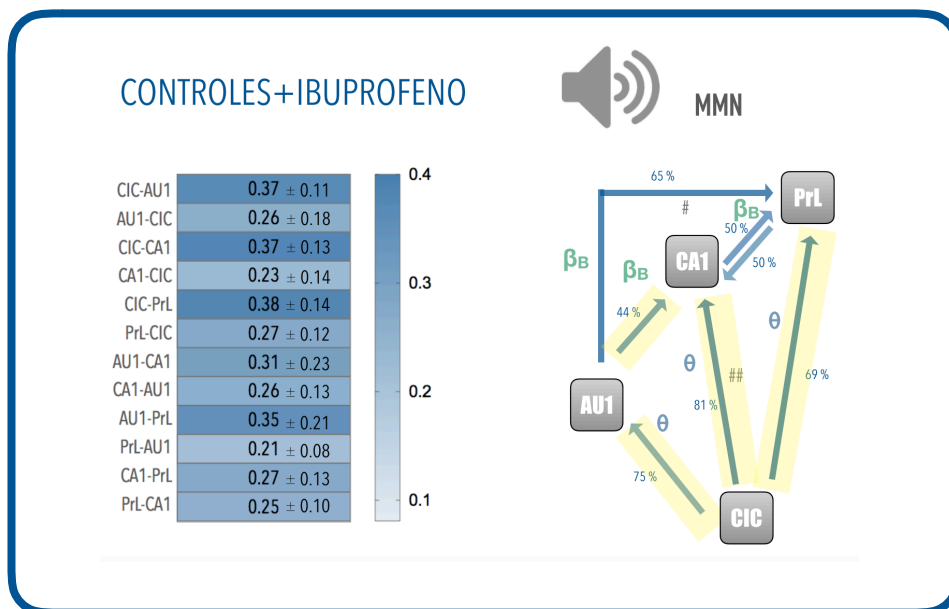
Calculamos en los registros de potencial local de campo obtenidos durante la generación de la respuesta MMN la causalidad directa (D) y la causalidad inversa (I) en el rango de frecuencias donde predomina la causalidad entre las áreas: CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL, ratas controles e HA tratadas con Ibuprofeno. Comparando la influencia causal directa o inversa en las ratas tratadas con Ibuprofeno podemos analizar si la causalidad entre las diferentes áreas se modifica respecto a su correspondiente grupo sin tratar y si en las ratas HA se restaura a valores similares a los de las ratas control sin tratar (Figura 70, 71 y 72).



**Figura 70: Causalidad directa e inversa en ratas control y con HA, tratadas ó no con Ibuprofeno, entre CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL, durante la estimulación auditiva.** Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Sidak) y se expresan como la media ± MEE de la causalidad de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo de HA respectivamente y 14 y 10 controles e HA tratadas con Ibuprofeno, respectivamente. Las diferencias de causalidad se indican con \* ( $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). La FD de cada causalidad se indica con diferentes colores  $\delta$  = naranja,  $\theta$  = azul bajo,  $\beta_B$  = verde y  $\beta_A$  = lila.

**Causalidad durante la estimulación auditiva en ratas control tratadas con Ibuprofeno:**

Durante la estimulación auditiva, la comunicación en las ratas control tratadas con Ibuprofeno es igual que en las ratas control sin tratar entre CA1 y PrL que ocurre de forma bidireccional y entre AU1 y PrL que se mantiene en sentido AU1→PrL, siendo la influencia causal mayor en este sentido ( $0,3 \pm 0,2$ ;  $p < 0,05$ ) que el contrario ( $0,20 \pm 0,08$ ). Sin embargo, la influencia causal cambia respecto a las ratas control sin tratar entre CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL y AU1-CA1: la comunicación fluye desde CIC a AU1, en lugar de fluir en sentido contrario; entre CIC-CA1 también fluye en sentido contrario ya que la influencia causal es mayor desde CA1 a CIC ( $0,4 \pm 0,1$ ;  $p < 0,01$ ) que en el sentido contrario ( $0,2 \pm 0,1$ ); y desde CIC a PrL y desde AU1 a CA1, en lugar de ser bidireccional (Figura 71).



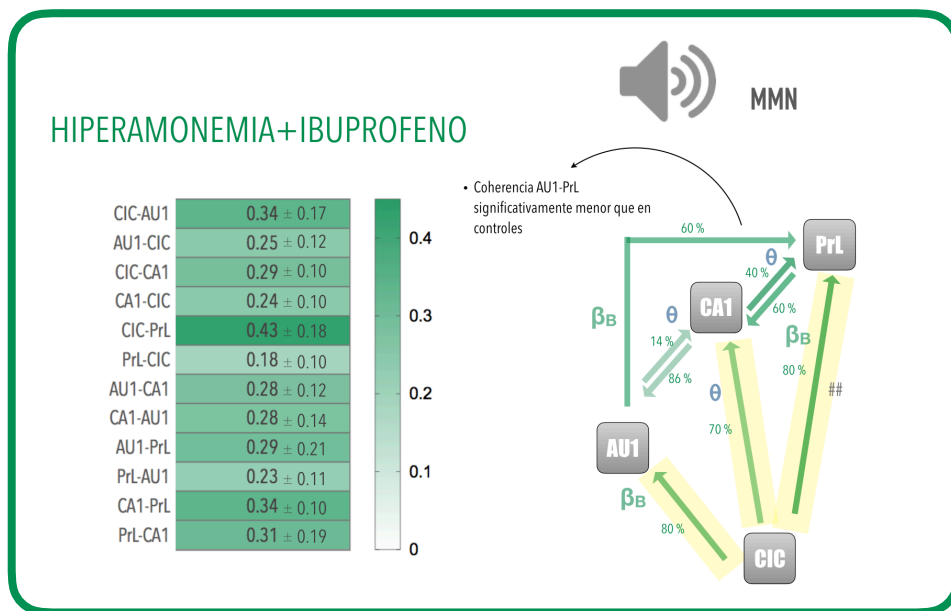
**Figura 71:** Causalidad directa e inversa en ratas control tratadas con Ibuprofeno con estimulación auditiva y mapa de los principales sentidos de causalidad entre CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL. Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE (desviación estándar) de la causalidad directa y la del sentido contrario de 14 animales. Los valores de causalidad se gradúan por intensidad de color de acuerdo con la barra de la derecha. El sentido mayoritario de causalidad entre dos áreas se indica con flechas. También se representan la FD (frecuencia dominante) de la causalidad ( $\delta$  (delta)= [1-4 Hz];  $\theta$  (theta)= [4-8 Hz]) y el porcentaje de ratas que responde en los sentidos mayoritarios (ver en ratio de causalidad neta en sección siguiente). Las causalidades en un sentido significativamente mayores que las del sentido contrario se indican con # (## $p < 0,01$ ). Las causalidades en un sentido diferente al de las ratas control se marcan con amarillo.

**Causalidad durante la estimulación auditiva en ratas HA tratadas con Ibuprofeno :**

Las ratas HA tratadas con Ibuprofeno tienen alterada la causalidad entre CIC-AU1, CIC-CA1 y CIC-PrL en comparación con las ratas control.

El flujo de información entre CIC-AU1 que era bidireccional en la HA pasa a fluir desde CIC a AU1, el sentido contrario al de las ratas control; la comunicación entre CIC-CA1 que tenía el sentido contrario a los controles en ratas con HA, no se modifica con el Ibuprofeno y continúa siendo la causalidad en sentido CIC→CA1 ( $0,37 \pm 0,13$ ;  $p < 0,01$ ) mayor que la del sentido contrario ( $0,23 \pm 0,14$ ). La influencia causal se mantiene igual que en las HA sin tratar desde CIC→PrL, en lugar de ser bidireccional como en controles. El tratamiento con Ibuprofeno no parece alterar la comunicación en el resto de áreas que se mantienen igual que en los controles y las HA sin tratar: en sentido AU1→PrL, y de forma bidireccional entre AU1↔CA1 y CA1↔PrL (Figura 72).

El Ibuprofeno produce los mismos cambios en la influencia causal en controles e HA en todas las áreas, a excepción de la comunicación entre AU1-CA1, que en controles tiene el sentido AU1→CA1 y en HA es bidireccional, como en controles sin tratar.



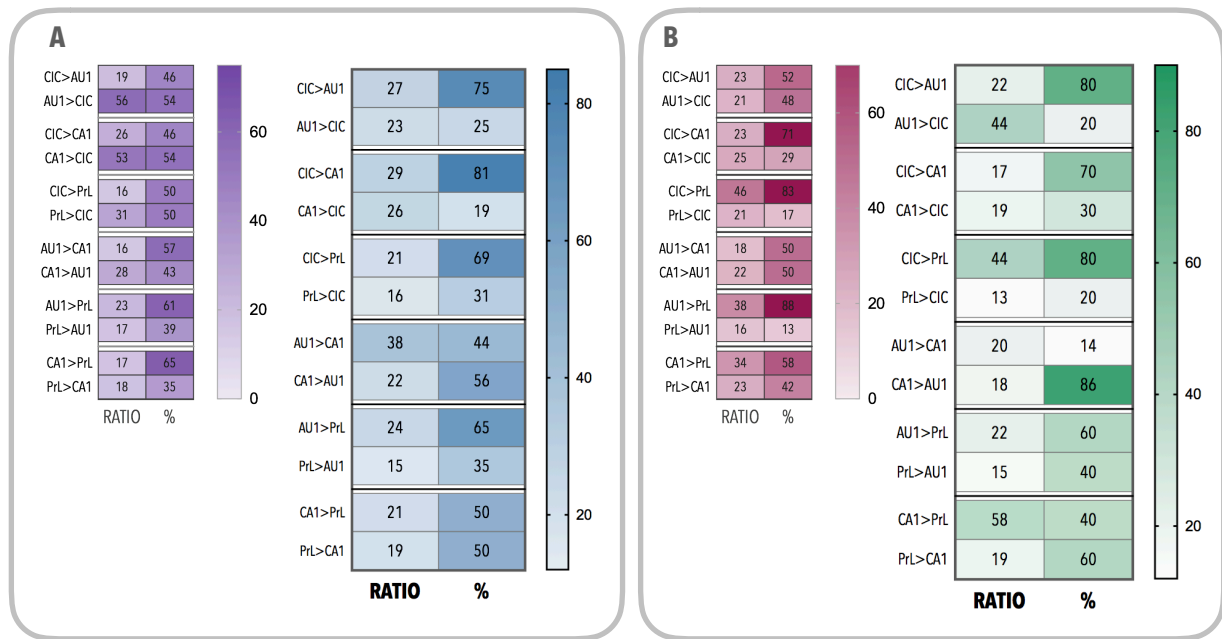
**Figura 72:** Causalidad directa e inversa en ratas HA tratadas con Ibuprofeno con estimulación auditiva y mapa de los principales sentidos de causalidad entre CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL. Los datos se expresan como la media ± DE (desviación estándar) de la causalidad directa y la del sentido contrario de 10 animales. Los valores de causalidad se gradúan por intensidad de color de acuerdo con la barra de la derecha. El sentido mayoritario de causalidad entre dos áreas se indica con flechas. También se representan la FD (frecuencia dominante) de la causalidad (( $\delta$  (delta)= [1-4 Hz];  $\theta$  (theta)= [4-8 Hz])) y el porcentaje de ratas que responde en los sentidos mayoritarios (ver en ratio de causalidad neta en sección siguiente). Las causalidades en un sentido diferente al de las ratas control se marcan con amarillo.

### ■ Ratio de causalidad neta en ratas tratadas con Ibuprofeno

En controles el tratamiento con Ibuprofeno disminuye el ratio de causalidad neta AU1>CIC y aumenta el del sentido contrario, alcanzando ambos valores muy similares. La causalidad



de Granger por el contrario indicaba un predominio de la influencia de CIC sobre AU1, lo que podría estar indicando que la causalidad en sentido AU1>CIC esté disminuida por algunos valores bajos. El porcentaje de ratas que responde en sentido CIC>AU1 aumenta con el tratamiento con Ibuprofeno, haciendo más constantes las respuestas en este sentido.



**Figura 73:** Ratio de causalidad neta entre las áreas CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL en ratas tratadas con Ibuprofeno A) control e B) hiperamoniémicas, durante la estimulación auditiva. Se calculó el ratio de causalidad entre las diferentes combinaciones de áreas en el sentido directo e inverso. La dirección de causalidad de un área a otra se indica con el símbolo >. Los datos se expresan como la media del ratio de causalidad y el porcentaje de ratas que responden únicamente en la dirección indicada de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo de HA respectivamente. Se muestran también los ratios de causalidad neta de las ratas sin tratar en la parte izquierda de cada recuadro.

El Ibuprofeno aumenta hasta el 75% el porcentaje de ratas que responden en sentido CIC>CA1 pero disminuye el ratio de causalidad neta de dicho sentido, alcanzando valores similares a los del ratio de causalidad CA1>CIC. La causalidad de Granger mostraba una influencia mayor en el sentido CIC>CA1, por lo que la causalidad del 25% de ratas que responden en el sentido contrario podría estar enmascarada por valores bajos de causalidad del resto de las ratas.

El tratamiento con Ibuprofeno hace más constante la influencia causal CIC>PrL ya que aumenta el porcentaje de ratas que responden en este sentido y la causalidad neta pasa de ser mayor en el sentido PrL>CIC a tener valores similares en ambos sentidos. La causalidad de Granger mostraba el sentido CIC>PrL como el mayoritario. La causalidad de las ratas que responden en el otro sentido podría estar enmascarada por valores bajos de causalidad pero el mayor porcentaje de ratas que responden en sentido CIC>PrL indica que esta debe ser la causalidad más constante y predominante.

El Ibuprofeno aumenta el ratio de causalidad en sentido  $AU1 > CA1$ , en concordancia con los resultados del análisis de Granger que mostraban una influencia mayor de  $AU1$  sobre  $CA1$ . El porcentaje de ratas que responden en un sentido y en otro no parece cambiar.

Ni los ratios de causalidad entre  $AU1$ -PrL ni el porcentaje de ratas que responden en cada sentido parece modificarse con el tratamiento con Ibuprofeno.

El tratamiento con Ibuprofeno aumenta el porcentaje de ratas que responden en sentido  $PrL > CA1$  y disminuye el del sentido contrario, sin embargo los ratios de causalidad no se ven afectados (Figura 73).

En HA el Ibuprofeno aumenta el porcentaje de ratas que responden en sentido  $CIC > AU1$  pero aumenta el ratio de causalidad neta del sentido contrario. La causalidad de Granger mostraba una mayor influencia causal de  $CIC$  sobre  $AU1$ , lo que podría estar indicando que la causalidad en el sentido contrario podría estar enmascarada por valores de causalidad bajos, sin embargo hay que tener en cuenta que los valores de causalidad altos en sentido  $AU1 > CIC$  son solo de un 20% de las ratas.

El tratamiento con Ibuprofeno en HA parece disminuir ligeramente los ratios de causalidad neta en ambos sentidos, permaneciendo ambos con valores similares, sin afectar al porcentaje de ratas que responde en cada uno. La respuesta en sentido  $CIC > PrL$  es más constante porque un porcentaje elevado de ratas responde en este sentido. El análisis de Granger mostró una mayor causalidad en sentido  $CIC > PrL$ , por lo que aunque los valores altos de causalidad en sentido contrario podrían estar enmascarados, éstos serían el resultado de la respuesta de sólo el 30% de las ratas.

El tratamiento con Ibuprofeno en ratas HA no parece modificar el ratio de causalidad ni el porcentaje de ratas que responden en sentido  $CIC > PrL$ , manteniéndose como el sentido mayoritario y más constante. Esto coincide con los valores de causalidad de Granger.

El porcentaje de ratas con HA que responden en sentido  $CA1 > AU1$  aumenta con el tratamiento con Ibuprofeno, sin embargo los valores de causalidad neta no se ven afectados, manteniéndose ambos con valores similares. Esta bidireccionalidad causal también la obteníamos con los análisis de Granger, pero cabe recalcar que la respuesta en sentido  $CA1 > AU1$  es más constante con el tratamiento con Ibuprofeno.

El tratamiento con Ibuprofeno en HA disminuye el ratio de causalidad neta y el porcentaje de ratas que responden en sentido  $AU1 > PrL$ , sin embargo ambos valores continúan siendo los mayores. El análisis de causalidad de Granger también mostraba este sentido como mayoritario, sin embargo el análisis de causalidad neta nos muestra como el Ibuprofeno disminuye la regularidad y la potencia de esta influencia causal desde  $AU1$  a  $PrL$ .

El tratamiento con Ibuprofeno en HA tiende a aumentar el ratio de causalidad neta en sentido  $CA1 > PrL$  pero aumenta el porcentaje de ratas que responden en sentido contrario.

La causalidad de Granger mostraba una mayor influencia de CA1 sobre PrL, pero hay que tener en cuenta que sólo el 40% de las ratas responden realmente en este sentido (Figura 73).

#### 4.6 Análisis de los potenciales locales de campo en ratas hiperamonémicas tratadas con Ibuprofeno en condiciones basales

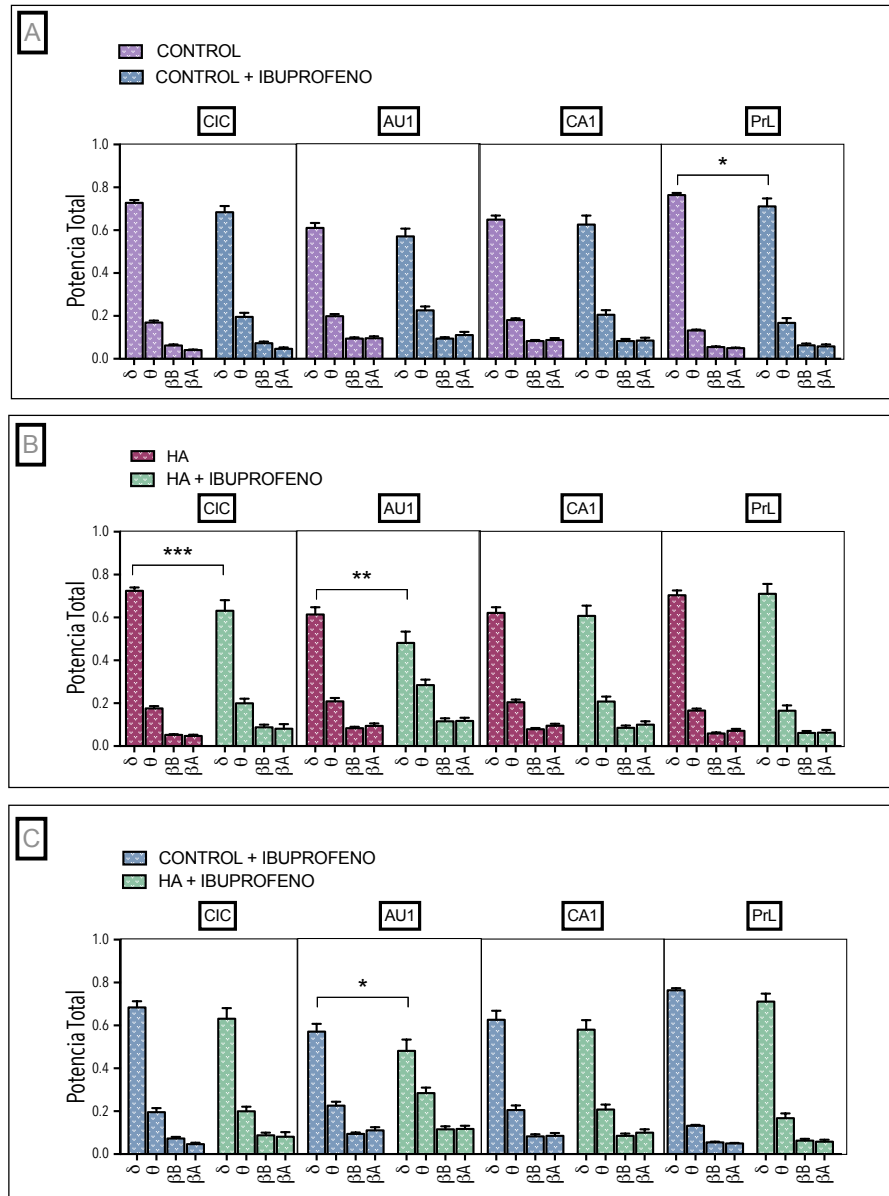
Siguiendo con la idea del apartado 4.3, repetimos el mismo análisis en las ratas tratadas con Ibuprofeno. Tras 6-7 semanas de dieta rica en acetato de amonio, 4-5 semanas de tratamiento con ibuprofeno (30 mg/Kg/día) y una semana después de la cirugía estereotáxica para la inserción de los electrodos en CIC, AU1, CA1 y PrL, se realizó un registro electroencefalográfico basal, sin estimulación auditiva. En este caso no se utilizó hidrato de cloral para estudiar con la mayor reproducibilidad posible la conectividad funcional fisiológica del estado basal y los cambios que se producen en ésta con el tratamiento con Ibuprofeno. Se calcularon los mismos parámetros que en el apartado anterior en el registro de potencial de campo local (LFP, *Local Field Potential*) para las bandas del espectro delta [ $\delta$  =1-3,9 Hz], theta [ $\theta$  = 4-7,9 Hz], beta bajo [ $\beta_B$  = 8-11,8] y beta alto [ $\beta_A$  =12-30], que se detallan a continuación:

##### 4.6.1 Media de la energía espectral normalizada en la banda de interés

Se calculó la potencia de cada banda de frecuencia (ponderada por la frecuencia de cada banda) respecto a la media de la energía para obtener una representación por frecuencias de la potencia del registro (Potencia Espectral) en condiciones basales para las ratas control e hiperamonémicas tratadas con Ibuprofeno en (Figura 74A y B).

El tratamiento con Ibuprofeno mantiene en ambos grupos la mayor potencia en la banda delta, pero produce una disminución de la potencia de la banda delta en PrL de controles ( $C=0,8 \pm 0,0 \mu V$ ;  $C_{Ibuprofeno}=0,7 \pm 0,0 \mu V$ ;  $p<0,05$ ) y en HA en CIC ( $HA=0,7 \pm 0,0 \mu V$ ;  $HA_{Ibuprofeno}=0,6 \pm 0,0 \mu V$ ;  $p<0,01$ ) y AU1 ( $HA=0,6 \pm 0,0 \mu V$ ;  $HA_{Ibuprofeno}=0,5 \pm 0,0 \mu V$ ;  $p<0,01$ ).

Los grupos tratados con Ibuprofeno, control e HA, no se diferencian en la potencia espectral en ninguna de las áreas, exceptuando en AU1 donde la potencia de delta es menor en las ratas con HA tratadas con Ibuprofeno ( $HA_{Ibuprofeno}=0,48 \pm 0,05 \mu V$ ;  $p<0,05$ ) que en las ratas control tratadas con Ibuprofeno ( $C_{Ibuprofeno}=0,57 \pm 0,04 \mu V$ ) (Figura 74C).



**Figura 74:** Media de la energía espectral normalizada en la banda de interés en condiciones basales en ratas **A)** control sin y con ibuprofeno, **B)** con HA sin y con Ibuprofeno y **C)** control y con HA con Ibuprofeno. Los registros electroencefalográficos se realizaron en condiciones basales, sin estimulación auditiva. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media  $\pm$  MEE de la potencia total ponderada por la banda de frecuencia de interés ( $\mu$ V) de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo de HA respectivamente, y 14 y 10 controles e HA tratados con Ibuprofeno, respectivamente. CIC (colículo inferior), AU1 (corteza auditiva primaria), región CA1 del hipocampo y PrL (corteza prelímbica). Las diferencias estadísticamente significativas se indican con \* ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ).

#### 4.6.2 Coherencia en condiciones basales

La coherencia, como hemos explicado en apartados anteriores, es una representación numérica de la fuerza de la relación lineal entre la actividad entre dos canales diferentes para

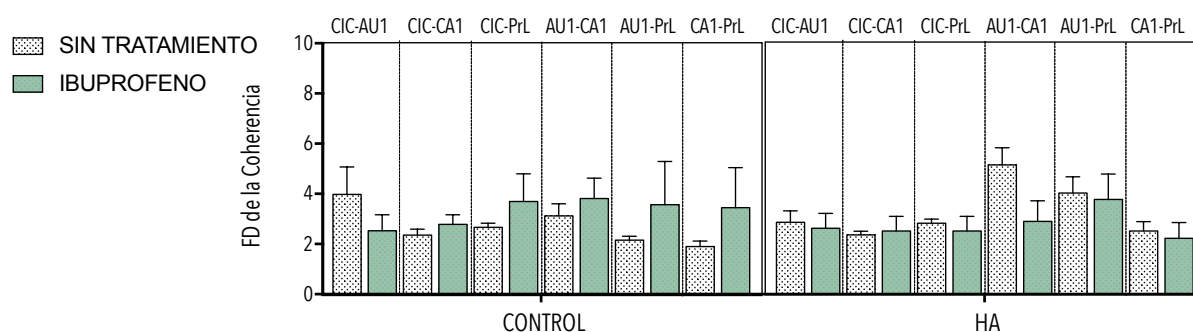
una banda de frecuencias elegida. Sus valores van de 0 (ninguna asociación) a 1 (asociación total), en la práctica valores por encima de 0,6 indicarían una fuerte semejanza.

■ **Frecuencia dominante en la coherencia**

Se calculó la FD en la coherencia entre todas las combinaciones de áreas en condiciones basales, sin estimulación y sin hidrato de cloral. Posteriormente se calculó la coherencia en la banda de FD (Tabla 17 y Figura 75).

|                    | CIC-AU1   | CIC-CA1   | CIC-PrL   | AU1-CA1         | AU1-PrL          | CA1-PrL   |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|------------------|-----------|
| CONTROL            | 3,9 ± 1,1 | 2,3 ± 0,2 | 2,7 ± 0,1 | 3,1 ± 0,5       | 2,1 ± 0,1        | 1,9 ± 0,2 |
| HA                 | 2,9±0,45  | 2,4±0,15  | 2,8±0,2   | <b>5,15±0,7</b> | <b>4,03±0,65</b> | 2,5±0,37  |
| CONTROL+Ibuprofeno | 4,0±1,6   | 2,8±0,4   | 3,7±1,1   | 3,8±0,8         | 3,6±1,7          | 3,4±1,6   |
| HA+Ibuprofeno      | 2,6±0,6   | 2,5±0,6   | 2,5±0,6   | 2,9±0,8         | 3,8±1,0          | 2,2±0,6   |

■ [1-4 Hz]  
■ [4-8 Hz]



**TABLA 17 y Figura 75: Frecuencia dominante (FD) en la coherencia de controles y con HA con y sin Ibuprofeno en condiciones basales.** Se calculó la frecuencia dominante en la coherencia entre: CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1 y CA1-PrL. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media de la frecuencia dominante (Hz) ± MEE de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo de HA respectivamente, y 14 y 10 controles e HA tratados con Ibuprofeno, respectivamente. Los rangos de frecuencia de la banda delta [1-4 Hz] se muestran en color naranja y de la banda theta [4-8 Hz] en color azul. CIC (colículo inferior), AU1 (corteza auditiva primaria), región CA1 del hipocampo y PrL (corteza prelímbica). Las FD que se restauran con Ibuprofeno se resaltan en la Tabla.

El tratamiento con Ibuprofeno no parece afectar a la FD de la coherencia en controles. Por otro lado, normaliza la FD de la coherencia en HA al disminuirla desde el rango theta al delta entre AU1-CA1.

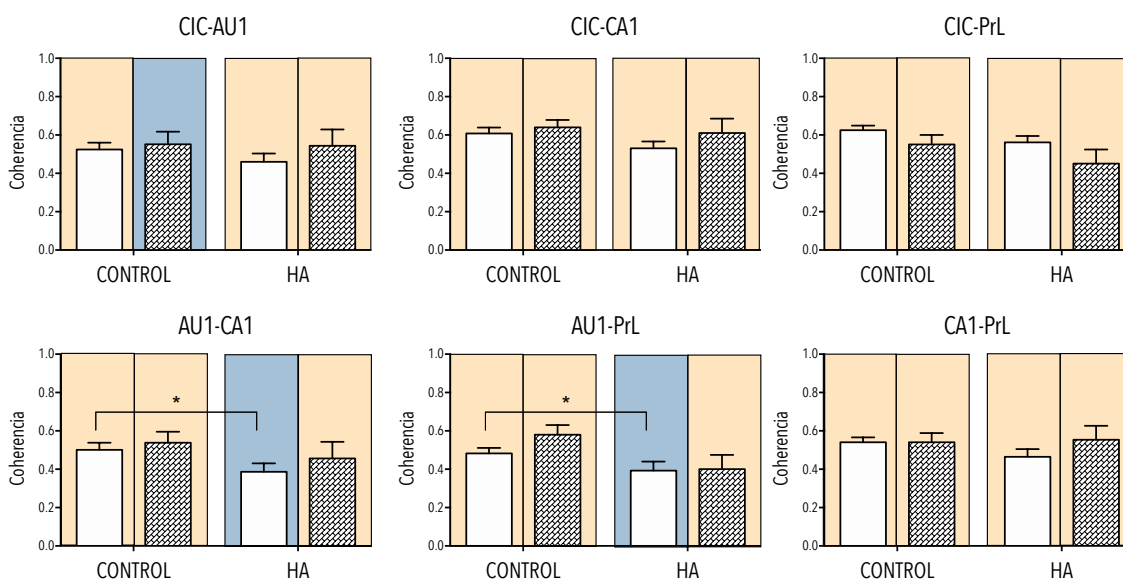
■ **Coherencia en la banda de frecuencia dominante**

Se calculó la coherencia en la banda de FD para todas las combinaciones de áreas en condiciones basales: CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL. Se analizaron las diferencias en la coherencia entre el grupo control y el grupo de hiperamonémicas con los grupos con tratamiento con Ibuprofeno (Tabla 18 y Figura 76).

|                    | CIC-AU1     | CIC-CA1     | CIC-PrL     | AU1-CA1            | AU1-PrL            | CA1-PrL     |
|--------------------|-------------|-------------|-------------|--------------------|--------------------|-------------|
| CONTROL            | 0,52 ± 0,04 | 0,6 ± 0,03  | 0,62 ± 0,02 | 0,51 ± 0,04        | 0,48 ± 0,03        | 0,51 ± 0,03 |
| HA                 | 0,46 ± 0,04 | 0,53 ± 0,03 | 0,56 ± 0,03 | <b>0,39 ± 0,04</b> | <b>0,39 ± 0,04</b> | 0,46 ± 0,04 |
| CONTROL+Ibuprofeno | 0,55 ± 0,07 | 0,64 ± 0,04 | 0,55 ± 0,05 | 0,05 ± 0,06        | 0,58 ± 0,05        | 0,54 ± 0,05 |
| HA+Ibuprofeno      | 0,54 ± 0,08 | 0,61 ± 0,07 | 0,45 ± 0,07 | 0,46 ± 0,09        | 0,40 ± 0,07        | 0,55 ± 0,07 |

■ [1-4 Hz]  
■ [4-8 Hz]

□ SIN TRATAMIENTO  
▨ IBUPROFENO



**TABLA 18 y Figura 76: Coherencia en la bada de frecuencia dominante en ratas control y con HA con y sin Ibuprofeno en condiciones basales.** Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Sidak) y se expresan como la media ± MEE de la la coherencia (Hz) de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo de HA respectivamente y 14 y 10 animales controles y con HA con Ibuprofeno, respectivamente. La coherencia en la banda delta [1-4 Hz] se muestran en color naranja y en la banda theta [4-8 Hz] en color azul. La diferencias significativas se indican con \* ( $p < 0,05$ ) y en negrita en la tabla.

El tratamiento con Ibuprofeno no produjo cambios en la coherencia entre las diferentes áreas ni en las ratas control ni en las HA, aunque existe una ligera tendencia a aumentar la

coherencia en HA con el tratamiento con Ibuprofeno entre AU1-CA1, en las mismas áreas donde restauraba la FD de la coherencia.

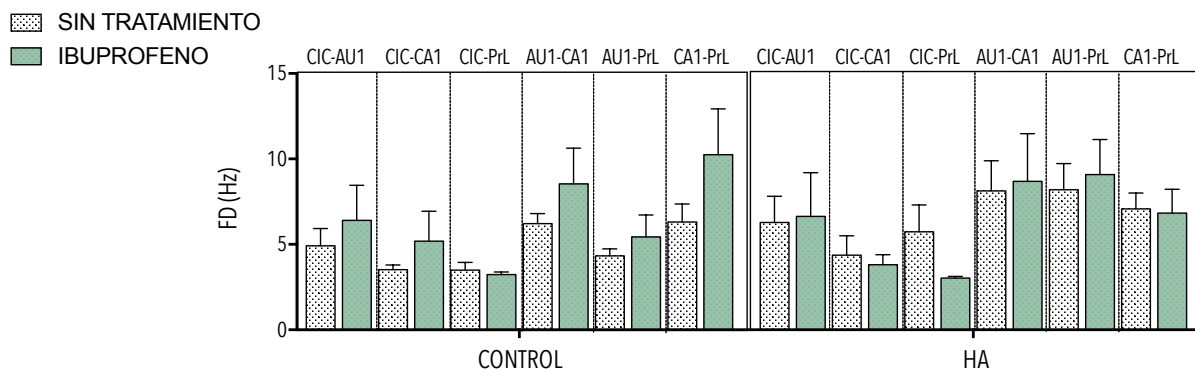
### 4.6.3 Causalidad funcional de Wiener-Granger

Siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 4.1.2.2 aplicamos este test de nuevo en las ratas controles e hiperamonémicas tratadas con Ibuprofeno para ver el efecto del antiinflamatorio sobre la influencia causal entre las distintas combinaciones de áreas.

#### ■ Frecuencia dominante de la relación de causalidad entre las áreas

A continuación exponemos los resultados de la FD de la causalidad para los grupos de ratas control e HA, con y sin tratamiento con Ibuprofeno en condiciones basales (Tabla 19 y Figura 77).

|                    | CIC-AU1   | CIC-CA1   | CIC-PrL   | AU1-CA1   | AU1-PrL          | CA1-PrL    |           |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------|------------|-----------|
| CONTROL            | 4,9 ± 1,0 | 3,5 ± 0,2 | 3,5 ± 0,4 | 6,2 ± 0,6 | 4,3 ± 0,4        | 6,3 ± 1,0  | [1-4 Hz]  |
| HA                 | 6,3 ± 1,5 | 4,4 ± 0,1 | 5,7 ± 1,6 | 8,1 ± 1,8 | <b>8,2 ± 1,5</b> | 7,0 ± 0,9  | [4-8 Hz]  |
| CONTROL+Ibuprofeno | 6,4 ± 2,0 | 5,2 ± 1,7 | 3,2 ± 0,1 | 8,5 ± 2,0 | 5,4 ± 1,3        | 10,2 ± 2,7 | [8-12 Hz] |
| HA+Ibuprofeno      | 6,6 ± 2,5 | 3,8 ± 0,6 | 3,0 ± 0,1 | 8,7 ± 2,8 | 9,1 ± 1,5        | 6,8 ± 1,4  |           |

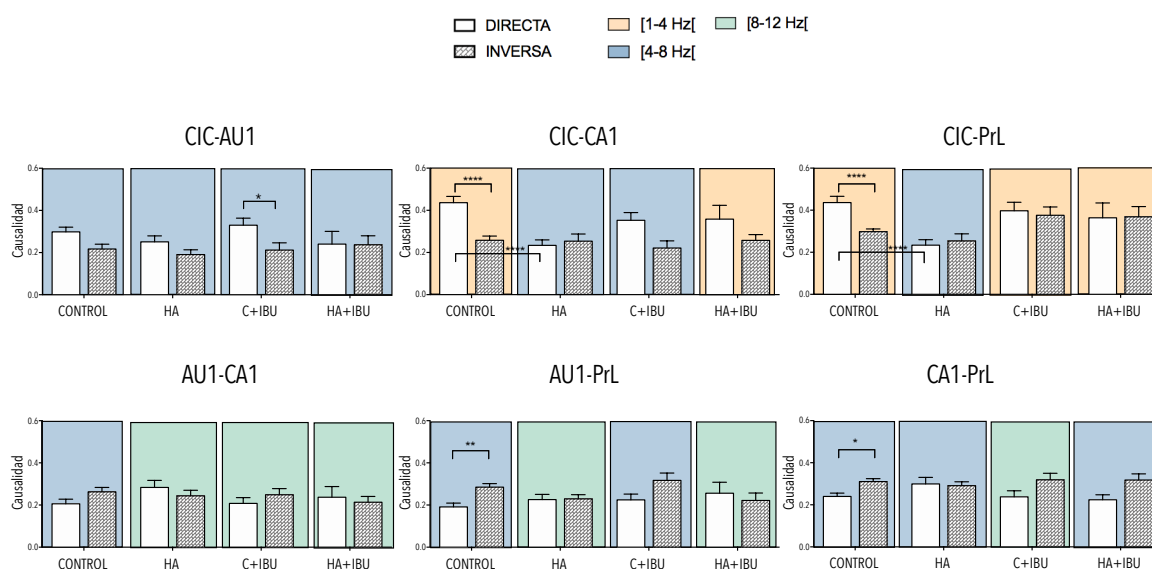


**TABLA 19 y Figura 77: Frecuencia dominante (FD) en la causalidad en controles y con HA con y sin Ibuprofeno en condiciones basales.** Se calculó la frecuencia dominante en la causalidad entre: CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1 y CA1-PrL. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Bonferroni) y se presentan como la media de la frecuencia dominante (Hz) ± MEE de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo de HA respectivamente, y 14 y 10 controles e HA tratados con Ibuprofeno, respectivamente. Los rangos de frecuencia de la banda delta [1-4 Hz] se muestran en color naranja, de la banda theta [4-8 Hz] en color azul, de beta baja [8-12 Hz] en color verde y beta alta [12-30 Hz] en lila. CIC (colículo inferior), AU1 (corteza auditiva primaria), región CA1 del hipocampo y PrL (corteza prelímbica). Se resaltan en las HA las FD que se restauran con el tratamiento con Ibuprofeno. El tratamiento con Ibuprofeno en controles tiende a aumentar la FD de la causalidad entre todas las áreas excepto en la causalidad entre CIC-PrL.

En ratas HA el Ibuprofeno normaliza la FD de la causalidad entre CIC-CA1 y CIC-PrL al disminuirla de la banda theta a la delta, alcanzando los mismos valores que las ratas control.

### ■ Causalidad directa e inversa. ¿Se restaura la comunicación basal con el Ibuprofeno?

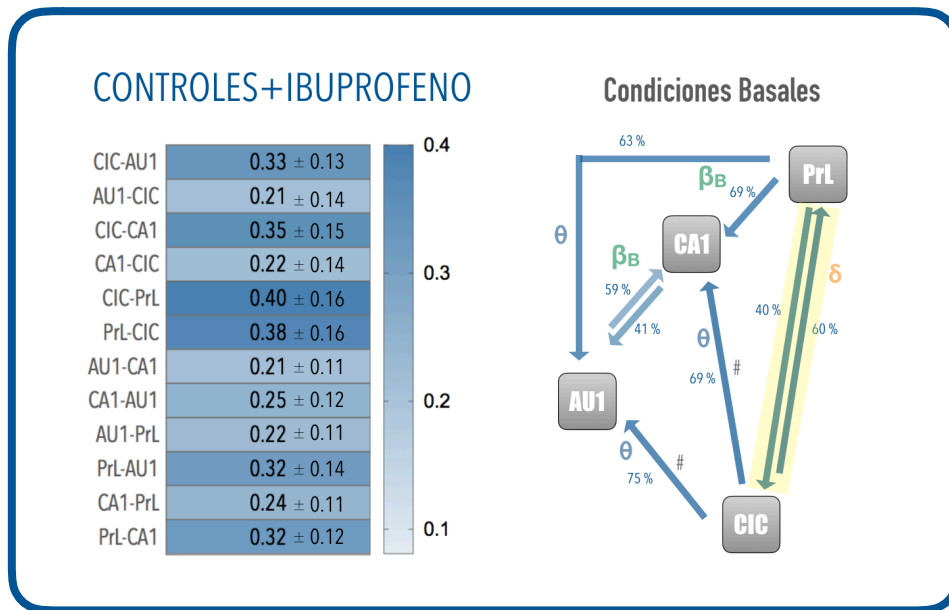
Calculamos en los registros de potencial local de campo obtenidos en condiciones basales la causalidad directa (D) y la causalidad inversa (I) en el rango de frecuencias donde predomina la causalidad entre las áreas: CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL, ratas controles e HA tratadas con Ibuprofeno. Comparando la influencia causal directa o inversa en las ratas tratadas con Ibuprofeno podemos analizar si la causalidad entre las diferentes áreas se modifica respecto a su correspondiente grupo sin tratar o se restaura respecto al grupo control sin tratar (Figura 78).



**Figura 78: Causalidad directa e inversa en ratas control y con HA, tratadas ó no con Ibuprofeno, entre CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL, en condiciones basales.** Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*pos-hoc* Sidak) y se expresan como la media  $\pm$  MEE de la causalidad de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo de HA respectivamente y 14 y 10 controles e HA tratadas con Ibuprofeno, respectivamente. Las diferencias de causalidad se indican con \* ( $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). La FD de cada causalidad se indica con diferentes colores  $\delta$  = naranja,  $\theta$  = azul bajo y  $\beta_B$  = verde.



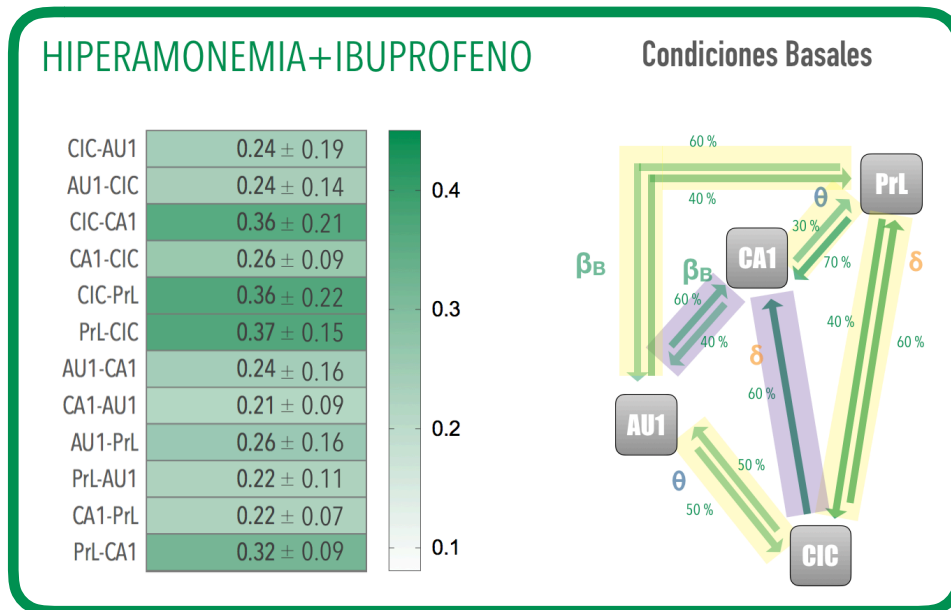
**Causalidad en condiciones basales en ratas control tratadas con Ibuprofeno:**



**Figura 79:** Causalidad directa e inversa en ratas control tratadas con Ibuprofeno en condiciones basales y mapa de los principales sentidos de causalidad entre CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL. Los datos se expresan como la media ± DE (desviación estándar) de la causalidad directa y la del sentido contrario de 14 animales. Los valores de causalidad se gradúan por intensidad de color de acuerdo con la barra de la derecha. El sentido mayoritario de causalidad entre dos áreas se indica con flechas. También se representan la FD (frecuencia dominante) de la causalidad ( $\delta$  (delta)= [1-4 Hz];  $\theta$  (theta)= [4-8 Hz];  $\beta_B$  (beta baja)= [8-12 Hz]) y el porcentaje de ratas que responde en los sentidos mayoritarios (ver en ratio de causalidad neta en sección siguiente). Las causalidades en un sentido significativamente mayores que las del sentido contrario se indican con # (## $p < 0,01$ ). Las causalidades en un sentido diferente al de las ratas control se marcan con amarillo.

En la ratas control tratadas con Ibuprofeno la dinámica de causalidad en la condición de no estimulación la información fluye igual que en las ratas control sin tratar: desde CIC a →AU1 y →CA1, siendo estas causalidades significativamente mayores (CIC→AU1=0,3 ± 0,1;  $p < 0,05$  y CIC→CA1= 0,3 ± 0,1;  $p < 0,05$ ) que las causalidades en sentido contrario (0,2 ± 0,1 y 0,2 ± 0,2 respectivamente). La causalidad fluye desde PrL a AU1 y desde CA1 a PrL. Por otro lado, la comunicación entre CA1 y AU1 es bidireccional. Sin embargo la comunicación entre PrL y CIC pasa a ser bidireccional, en lugar de fluir desde CIC a PrL, como ocurre en las ratas control sin tratar (Figura 79).

El tratamiento con Ibuprofeno tiende a disminuir la causalidad D entre CIC-CA1 y aumentar la I entre CIC-PrL en comparación con los controles sin tratar. En el resto de combinaciones de áreas no parece producir cambios en la causalidad D o I (Figura 79).

**Causalidad en condiciones basales en ratas hiperamonémicas tratadas con Ibuprofeno:**

**Figura 80:** Causalidad directa e inversa en ratas con HA tratadas con Ibuprofeno en condiciones basales y mapa de los principales sentidos de causalidad entre CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL. Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE (desviación estándar) de la causalidad directa y la del sentido contrario de 10 animales. Los valores de causalidad se gradúan por intensidad de color de acuerdo con la barra de la derecha. El sentido mayoritario de causalidad entre dos áreas se indica con flechas. También se representan la FD (frecuencia dominante) de la causalidad ( $\delta$  (delta)= [1-4 Hz];  $\theta$  (theta)= [4-8 Hz]) y el porcentaje de ratas que responde en los sentidos mayoritarios (ver en ratio de causalidad neta en sección siguiente). Las causalidades en un sentido diferente al de las ratas control se marcan con amarillo.

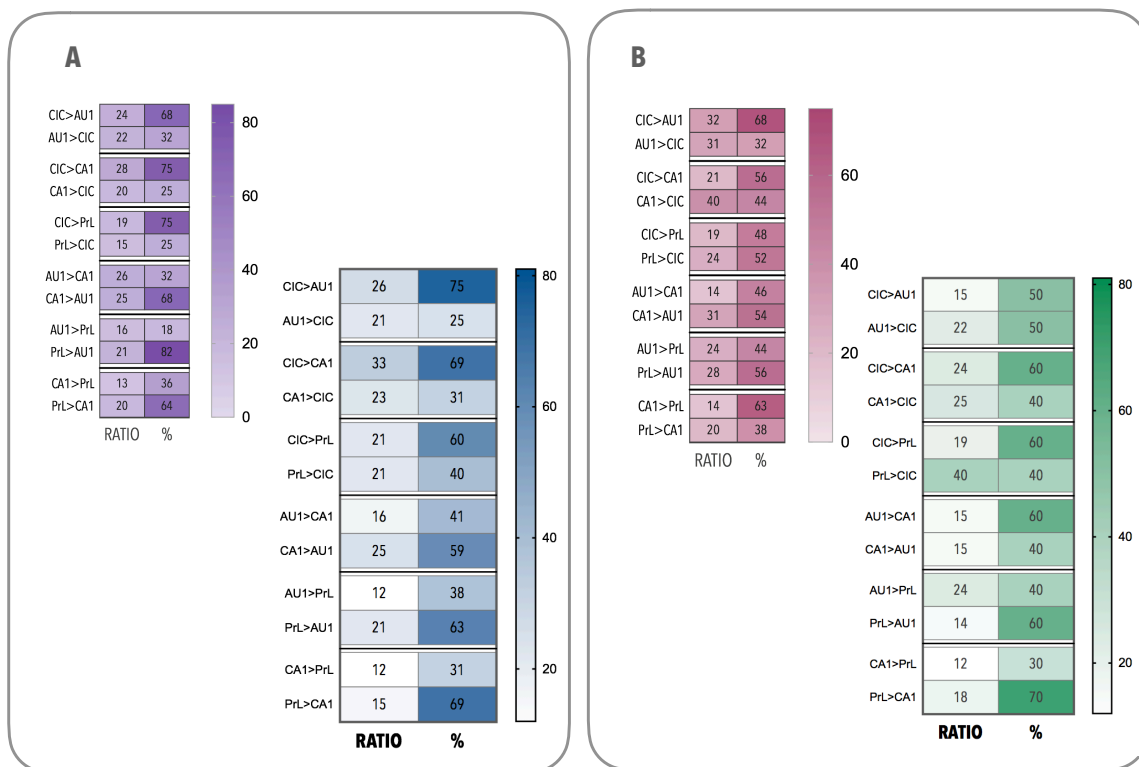
El Ibuprofeno tiende a disminuir la causalidad D entre AU1-CA1 y a aumentar la causalidad D entre CIC-CA1 en ratas HA en las áreas CIC-AU1 y CIC-PrL, restaurando la influencia de causalidad en condiciones basales en las ratas HA entre estas áreas a niveles similares a los de las ratas control sin tratar. La causalidad entre CIC y CA1, que en las ratas HA era bidireccional, con el Ibuprofeno fluye desde CIC a CA1, como en las ratas control. La causalidad entre CA1 y AU1 con el tratamiento con Ibuprofeno pasa a ser bidireccional como en controles, en lugar de tener sentido CIC→AU1 (Figura 80).

La comunicación entre CIC-PrL, CIC-AU1, AU1-PrL y CA1-PrL se mantiene bidireccional y no revierte con el tratamiento con Ibuprofeno (Figura 80).

■ **Ratio de causalidad neta en ratas tratadas con Ibuprofeno en condiciones basales**

El Ibuprofeno no afecta ni al ratio de causalidad ni al porcentaje de ratas que responden entre CIC-AU1. CIC-CA1 y CIC-PrL, manteniéndose mayoritarios los valores para los sentidos CIC>AU1, CIC>CA1 y la bidireccionalidad entre CIC-PrL.

El tratamiento con Ibuprofeno disminuye el ratio de causalidad neta en sentido AU1>CA1, pero el porcentaje de ratas que responde en este sentido continúa siendo mayor que en el sentido contrario. El análisis de causalidad de Granger mostró bidireccionalidad entre estas dos áreas, lo que indica que alguno de los dos valores de causalidad está disminuido por valores bajos de algunas ratas.



**Figura 81: Ratio de causalidad neta entre las áreas CIC-AU1, CIC-CA1, CIC-PrL, AU1-CA1, AU1-PrL, CA1-PrL en ratas tratadas con Ibuprofeno A) control y B) con HA, en condiciones basales.** Se calculó el ratio de causalidad entre las diferentes combinaciones de áreas en el sentido directo e inverso. La dirección de causalidad de un área a otra se indica con el símbolo >. Los datos se expresan como la media del ratio de causalidad y el porcentaje de ratas que responden únicamente en la dirección indicada de 28 y 25 animales en el grupo control y en el grupo de HA respectivamente. Se muestran también los ratios de causalidad neta de las ratas sin tratar en la parte izquierda de cada recuadro.

El Ibuprofeno parece disminuir el porcentaje de ratas que responden en sentido PrL>AU1, pero este sentido continúa siendo el que tiene mayores valores de ratio y de porcentaje de ratas que responden. Este sentido prioritario coincide con el obtenido con el análisis de Granger.

El Ibuprofeno disminuye el ratio de causalidad en sentido  $PrL > CA1$ , pero el ratio y el porcentaje de ratas en este sentido siguen teniendo los mayores valores, lo que coincide con el análisis de Granger.

En HA el tratamiento con Ibuprofeno disminuye el ratio de causalidad  $CIC > AU1$  y hace igual de constantes las respuestas en ambos sentidos al igualar el porcentaje de ratas que responden. Estos valores coinciden con los obtenidos con la causalidad de Granger en los que se mostraba bidireccionalidad entre estas dos áreas.

El tratamiento con Ibuprofeno en HA iguala los ratios de causalidad en ambos sentidos y mantienen la respuesta  $CIC > CA1$  como la más constante. La causalidad de Granger mostró la normalización del sentido de causalidad al ser el sentido  $CIC > CA1$  el mayoritario. El tratamiento con Ibuprofeno en HA aumenta el ratio de causalidad neta en sentido  $PrL > CIC$  pero hace más constante la respuesta en el otro sentido. La causalidad de Granger mostró bidireccionalidad.

El Ibuprofeno disminuye el ratio de causalidad neta en sentido  $CA1 > AU1$  igualándolo con el del sentido contrario y aumenta el porcentaje de ratas que responden en sentido contrario. La causalidad de Granger mostró bidireccionalidad entre estas dos áreas. Esto nos indica que aunque exista la misma influencia causal en los dos sentidos, el sentido  $AU1 > CA1$  es más constante.

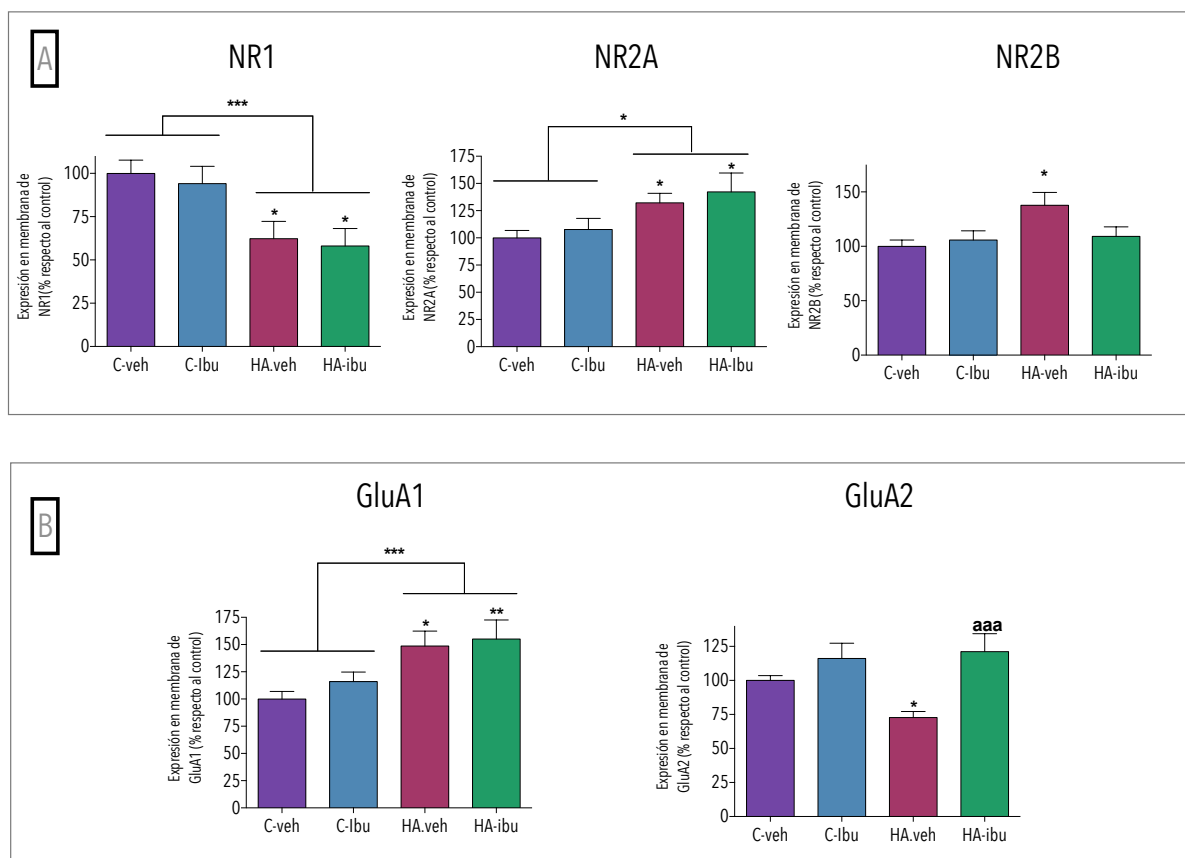
El tratamiento con Ibuprofeno en HA disminuye el valor del ratio de causalidad  $PrL > AU1$  sin afectar al porcentaje de ratas que responden en un sentido y en otro, permaneciendo un porcentaje mayor de ratas en sentido  $PrL > AU1$ . Tampoco afecta al ratio de causalidad  $AU1 > PrL$ , que es el ratio mayoritario. El análisis de Granger mostró bidireccionalidad.

El tratamiento con Ibuprofeno en HA no afecta a los ratios de causalidad en ninguno de los sentidos pero hace más constante la respuesta en sentido  $PrL > CA1$  al aumentar el porcentaje de ratas que responden en este sentido. La causalidad de Granger mostró bidireccionalidad.

## ALTERACIÓN EN LA NEUROTRANSMISIÓN EN MODELOS ANIMALES

## 4.7 Expresión en membrana de receptores de glutamato y GABA

Se analizó la expresión en membrana de los receptores de glutamato tipo NMDA (Figura 82A) y AMPA (Figura 82B) y de GABA (Figura 83) en el hipocampo de ratas control e HA con y sin tratamiento con Ibuprofeno. Estudiamos la expresión de receptores en esta región por ser el área que presentaba mayores diferencias en la respuesta MMN entre controles e HA y porque el Ibuprofeno restaura la alteración de la respuesta en el hipocampo de ratas HA.



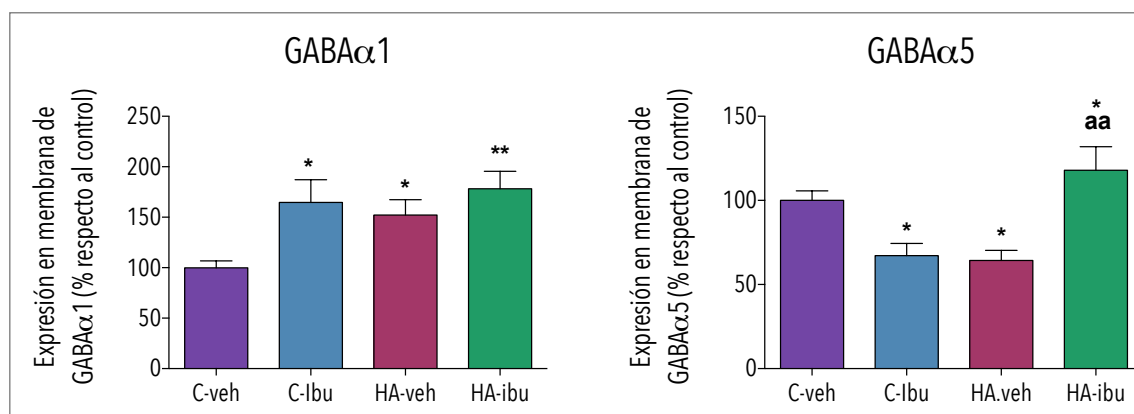
**Figura 82:** Expresión en membrana de los receptores de glutamato tipo A) NMDA y B) AMPA en el hipocampo de ratas control y con HA, con y sin Ibuprofeno. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*posthoc* Tukey) y se expresan como el porcentaje respecto a los niveles basales de los controles sin tratar  $\pm$  MEE de 27 y 22 controles y con HA, respectivamente y de 17 y 15 controles y con HA con Ibuprofeno, respectivamente. Se analizaron diferentes tipos de receptores: NR1, NR2A, NR2B, GluA1 y GluA2.

La HA disminuye la expresión en membrana de la subunidad NR1 ( $62 \pm 10\%$ ;  $p < 0,05$ ) del receptor NMDA y GluA2 ( $73 \pm 4\%$ ;  $p < 0,05$ ) del receptor AMPA. Por el contrario aumenta la expresión de las subunidades NR2A ( $132 \pm 9\%$ ;  $p < 0,05$ ) y NR2B ( $134 \pm 12\%$ ;  $p < 0,05$ ) del receptor NMDA y GluA1 ( $149 \pm 14\%$ ;  $p < 0,05$ ) del receptor AMPA.

El tratamiento con Ibuprofeno no parece afectar a la expresión en membrana de los receptores NMDA y AMPA en ratas control.

El tratamiento con Ibuprofeno en ratas HA revierte la expresión en membrana de GluA2 ( $1221 \pm 13\%$ ), alcanzando valores diferentes de las ratas HA sin tratar ( $p < 0,001$ ) y normalizando los niveles de expresión respecto a las controles. El Ibuprofeno también disminuye la expresión de NR2B, que vuelve a niveles que no son diferentes de los de las ratas control.

Por otro lado, el Ibuprofeno no afecta la expresión de GluA1, NR1 y NR2A.



**Figura 83: Expresión en membrana de los receptores GABA en el hipocampo de ratas control e HA, con y sin Ibuprofeno.** Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*posthoc* Tukey) y se expresan como el porcentaje respecto a los niveles basales de las controles  $\pm$  MEE de 27 y 22 controles e HA, respectivamente y de 17 y 15 controles e HA con Ibuprofeno, respectivamente. Se analizaron diferentes tipos de receptores: GABA $\alpha$ 1 y GABA $\alpha$ 5.

La HA aumenta la expresión en membrana de la subunidad  $\alpha$ 1 del receptor GABA ( $152 \pm 18\%$ ;  $p < 0,05$ ) y disminuye la de la subunidad  $\alpha$ 5 ( $64 \pm 6\%$ ;  $p < 0,05$ ).

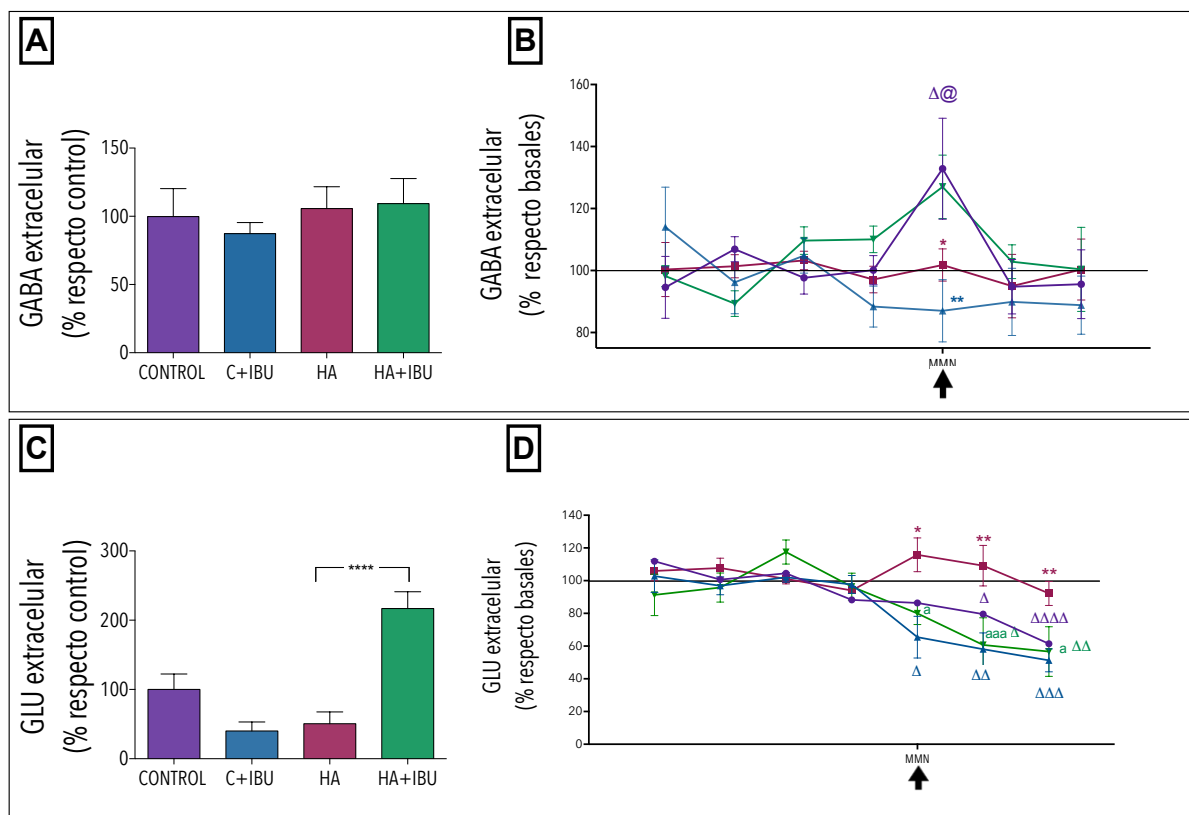
El tratamiento con Ibuprofeno aumenta la expresión en membrana de  $\alpha$ 1 en controles ( $165 \pm 22\%$ ;  $p < 0,05$ ) y los mantiene elevados en HA ( $178 \pm 17\%$ ;  $p < 0,01$ ). Por otro lado aumenta la expresión en membrana de  $\alpha$ 5 en HA ( $144 \pm 21\%$ ;  $p < 0,05$ ) alcanzando niveles incluso mayores que las ratas control sin tratamiento ( $p < 0,05$ ) y que las HA sin tratamiento ( $p < 0,01$ ) y los disminuye en controles ( $67 \pm 7\%$ ;  $p < 0,05$ ).

#### 4.8 Análisis de glutamato y GABA extracelular en hipocampo por microdiálisis *in vivo*

Mediante la técnica de microdiálisis se analizaron *in vivo* los niveles de GABA y glutamato extracelular antes, durante y después de la estimulación auditiva en el hipocampo de ratas control y con HA crónica, sin y con tratamiento con Ibuprofeno (Figura 84).

La concentración basal de GABA extracelular en el hipocampo en ratas control es similar a la de ratas con HA crónica. El Ibuprofeno no parece modificar la concentración basal de GABA extracelular en ratas HA (Figura 84A).

En ratas control la estimulación auditiva induce un aumento de los niveles de GABA extracelular en hipocampo hasta un  $133 \pm 16\%$  ( $p < 0,05$ ) de los niveles de antes de la estimulación ( $100 \pm 5\%$ ). Una vez eliminada la estimulación auditiva los niveles de GABA extracelular vuelven a sus valores basales ( $95 \pm 9\%$ ). El Ibuprofeno tiende a disminuir la concentración basal de GABA extracelular en ratas control y elimina el aumento de GABA inducido por la estimulación auditiva, produciendo por el contrario una disminución de los niveles de GABA extracelulares ( $87 \pm 10\%$ ;  $p < 0,01$ ) (Figura 84B).



**Figura 84:** Concentración basal extracelular respecto a la concentración basal de las ratas control de A) GABA y C) glutamato expresadas en porcentaje. Niveles extracelulares de B) GABA y D) glutamato antes, durante (MMN) y después de la estimulación auditiva en ratas control e HA, con y sin tratamiento con Ibuprofeno. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías (*posthoc* Tukey) y se expresan como el porcentaje respecto a los niveles basales de cada grupo  $\pm$  MEE de 12 controles, 12 HA, y 7 y 5 controles e HA con Ibuprofeno, respectivamente. Los valores significativamente diferentes a las ratas control se indican con \* ( $p < 0,05$ ;  $**p < 0,001$ ), y los diferentes a las ratas con HA crónica con la letra a ( $ap < 0,05$ ;  $aaaap < 0,001$ ). Las diferencias respecto a los niveles antes de la estimulación auditiva de cada grupo se representan con  $\Delta$  ( $\Delta p < 0,05$ ;  $\Delta\Delta p < 0,01$ ;  $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ ) y las diferencias después de la estimulación con @ ( $@p < 0,05$ ). A la izquierda, en diagrama de barras se indican los niveles basales de GABA y glutamato extracelulares expresados en nM  $\pm$  MEE y  $\mu$ M  $\pm$  MEE, respectivamente.

Los niveles de GABA extracelular no se alteran con la estimulación auditiva en ratas HA permaneciendo en un  $102 \pm 5\%$ . El tratamiento con Ibuprofeno no parece modificar la concentración basal de GABA extracelular. Sin embargo, el tratamiento con Ibuprofeno en ratas con HA crónica restaura la respuesta de los niveles de GABA del hipocampo a la estimulación auditiva ( $127 \pm 10\%$ ) hasta los niveles de las ratas control (Figura 84B).

Durante la estimulación auditiva en ratas control los niveles de glutamato extracelular tienden a disminuir. Esta disminución continúa después de la estimulación alcanzándose niveles inferiores a los de antes de la estimulación a los 15 ( $80 \pm 5\%$ ;  $p < 0,01$ ) y 30 minutos ( $61 \pm 8\%$ ;  $p < 0,0001$ ) después de la estimulación. El Ibuprofeno en ratas control tiende a disminuir la concentración de glutamato extracelular y en estas ratas se produce ya la disminución de glutamato durante la estimulación auditiva ( $65 \pm 13\%$ ;  $p < 0,05$ ). Esta disminución continúa aumentando después de la estimulación auditiva alcanzando valores menores ( $51 \pm 7\%$ ;  $p < 0,001$ ) a los anteriores a la estimulación (Figura 84D).

En ratas con HA la concentración de glutamato extracelular en hipocampo tiende a ser menor que la de las ratas control (Figura 84C), pero la estimulación auditiva no altera los niveles de glutamato permaneciendo más altos que los de las ratas control ( $116 \pm 10\%$ ;  $p < 0,05$ ). Después de la estimulación auditiva hay una tendencia a disminuir los niveles pero éstos no son diferentes a los de antes de la estimulación y continúan siendo mayores que los de las ratas control ( $92 \pm 7\%$ ;  $p < 0,01$ ) (Figura 84D). El tratamiento con Ibuprofeno aumenta la concentración basal de glutamato extracelular en el hipocampo de ratas con HA ( $54,6 \pm 4,4\%$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 84C). En las ratas HA el Ibuprofeno restaura la respuesta a la estimulación auditiva reduciendo los niveles de glutamato extracelular como en las ratas control ( $80 \pm 7\%$ ;  $p < 0,05$ ). Los niveles continúan disminuyendo alcanzando valores menores ( $57 \pm 15\%$ ) que antes de la estimulación auditiva ( $p < 0,01$ ) y que los de las ratas sin tratar ( $p < 0,05$ ) (Figura 84D).

Estos resultados demuestran que, en las ratas con HA está inhibida la respuesta del GABA y glutamato extracelulares al estímulo auditivo. El tratamiento con Ibuprofeno restaura completamente esta respuesta y los cambios en GABA y glutamato extracelulares en estas ratas son iguales que los de las ratas control.



## RESUMEN DE LOS RESULTADOS EN MODELOS ANIMALES

A continuación vamos a hacer un resumen de los resultados obtenidos en ratas hiperamonémicas para facilitar la comprensión de éstos:

### ■ Respuesta MMN y conectividad funcional durante la estimulación auditiva en rata anestesiada. Efecto del Ibuprofeno

- ♦ En controles se produce una respuesta MMN en las cuatro áreas analizadas, siendo CA1 el área que presenta respuesta de mayor magnitud, con mayor amplitud y área bajo la curva.
- ♦ De las cuatro áreas analizadas, solo la región CA1 del hipocampo resultó afectada en la HA, con una marcada disminución de la respuesta MMN, tanto de la amplitud como del área bajo la curva. El análisis de la FD de los potenciales y de la potencia espectral de los LFP muestra un predominio de la banda delta tanto en controles como en ratas con HA.
- ♦ El tratamiento con Ibuprofeno:
  - Restaura la respuesta MMN en CA1 de ratas con HA. Además, aumenta la respuesta en CA1 en ratas control y en AU1 en ratas con HA.
  - Aumenta la FD del potencial evocado por el sonido extraño y del MMN en CA1 de ratas con HA.
  - Aumenta la variabilidad (*mstd*) de los potenciales evocados en CIC en controles y en AU1 en ratas con HA. También aumenta la entropía del potencial evocado por el sonido estándar en PrL de controles.
  - En controles disminuye la potencia de la banda delta en AU1, CA1 y PrL, alcanzando valores inferiores a los de las ratas con HA tratadas con Ibuprofeno. Se sigue concentrando la mayor parte de la potencia en la banda delta en ratas control y con HA.
- ♦ El aumento de la FD de la coherencia de la banda delta en la HA entre AU1-CA1 no se asocia con una disminución en la coherencia entre las áreas. Las ratas con HA tienden a presentar una menor coherencia que las controles entre AU1-PrL y CA1-PrL.
- ♦ El tratamiento con Ibuprofeno:
  - Aumenta la FD de la coherencia en la banda delta entre CIC-PrL en controles y tiende a disminuirla en todas las áreas en la HA. En ratas con HA disminuye la

coherencia entre AU1-PrL y tiende a disminuirla entre AU1-CA1 y a aumentarla entre CA1-PrL.

- ♦ Las ratas con HA muestran alteraciones en la influencia causal: la información fluye bidireccionalmente entre CIC-AU1 en lugar de fluir de AU1 a CIC; de CIC a CA1 y a PrL en lugar de fluir en los sentidos contrarios. Estas son las combinaciones de áreas en las que aumenta o tiende a aumentar la FD de la causalidad y donde se hacen más evidentes las diferencias de la causalidad (en cuanto a sentido e intensidad) entre controles e HA.
- ♦ El tratamiento con Ibuprofeno:
  - En controles altera la influencia causal de forma que la comunicación entre las distintas áreas es igual a la que presentaban las ratas con HA. Además modifica la comunicación entre AU1-CA1 que deja de ser bidireccional y pasa a fluir desde AU1 a CA1.
  - Restaura la FD de la causalidad en ratas con HA entre CIC-AU1 y AU1-PrL, sin restaurar la influencia causal.

### ■ **Conectividad funcional en rata despierta en condiciones basales. Efecto del Ibuprofeno**

- ♦ La mayor parte de la potencia se centra en la banda delta tanto en controles como en hiperamonémicas, reflejando las características del estado cerebral en reposo.
- ♦ En ratas con HA los aumentos de la FD de la coherencia entre AU1-CA1 y AU1-PrL se asocian con una disminución de la coherencia entre ellas.
- ♦ El Ibuprofeno:
  - Normaliza en HA la FD de la coherencia entre AU1-CA1 y tiende a aumentar la coherencia entre estas áreas.
- ♦ En ratas con HA la FD de la causalidad aumenta entre AU1-PrL y tiende a aumentar en el resto de combinaciones de áreas. Las diferencias en la influencia causal entre ratas control y con HA son más evidentes en las condiciones basales que en las ratas anestesiadas durante la estimulación auditiva; las ratas con HA muestran alterada la comunicación entre todas las áreas a excepción de la comunicación entre CIC-AU1:  $CIC \rightleftharpoons CA1$  (en lugar de  $CIC \rightarrow CA1$ ),  $CIC \rightleftharpoons PrL$  ( $CIC \rightarrow PrL$ ),  $CA1 \rightarrow AU1$  (en lugar de  $CA1 \rightleftharpoons AU1$ ),  $AU1 \rightleftharpoons PrL$  (en lugar de  $PrL \rightarrow AU1$ ) y  $CA1 \rightleftharpoons PrL$  (en lugar de  $PrL \rightarrow CA1$ ).

## ♦ El Ibuprofeno:

- En controles tiende a aumentar la FD de la causalidad en todas las áreas excepto entre CIC-PrL. Mantiene la misma influencia causal que las ratas control sin tratar entre todas las áreas excepto entre CIC-PrL que pasa a ser bidireccional en lugar de fluir de CIC a PrL.
- En HA restaura la FD de la causalidad entre CIC-CA1 y CIC-PrL y la causalidad se restaura entre CIC-CA1 y AU1-CA1. El resto de influencias causales permanecen alteradas respecto al las ratas control.

**■ Alteración en la neurotransmisión en la hiperamonemia crónica. Efecto del Ibuprofeno**

La HA también altera la neurotransmisión en el hipocampo al alterar la expresión en membrana de receptores de glutamato y GABA.

- ♦ La HA disminuye la expresión en membrana de las subunidades NR1 del receptor NMDA y GluA2 del receptor AMPA. Por el contrario aumenta la expresión en membrana de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA y GluA1 del receptor AMPA.

## ♦ El tratamiento con Ibuprofeno:

- En HA revierte la alteración en la expresión en membrana de GluA2 y de NR2B, normalizando los niveles de expresión respecto a las controles. Por otro lado, el Ibuprofeno no afecta la expresión de GluA1, NR1 y NR2A.
- No parece afectar la expresión en membrana de los receptores NMDA y AMPA en ratas control.

- ♦ La HA aumenta la expresión en membrana de la subunidad  $\alpha 1$  del receptor GABA<sub>A</sub> y disminuye la de la subunidad  $\alpha 5$ .

## ♦ El tratamiento con Ibuprofeno:

- Aumenta la expresión en membrana de  $\alpha 1$  en controles y los mantiene elevados en HA. Por otro lado disminuye en ratas control la expresión de la subunidad  $\alpha 5$  y la aumenta en ratas con HA, alcanzando niveles mayores que los controles sin tratamiento y las ratas con HA sin tratamiento.

- ♦ La estimulación auditiva induce un aumento de GABA extracelular en hipocampo de ratas control, que no se produce en ratas con HA. El tratamiento con Ibuprofeno restaura el aumento de GABA en ratas HA pero lo previene en ratas control.
- ♦ La estimulación auditiva en controles induce una disminución del glutamato extracelular que no se produce en ratas con HA. La disminución de los niveles de glutamato continúa en controles después de la estimulación auditiva. El tratamiento con Ibuprofeno aumenta la concentración extracelular de glutamato en el hipocampo de ratas con HA y restaura la disminución de glutamato inducida por la estimulación auditiva en estas ratas sin afectar a las ratas control.

## PACIENTES CON ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA

### 4.9 Etiología y datos demográficos

La Tabla 20 resume los datos sociodemográficos y clínicos de cada grupo experimental: controles, cirróticos sin EHM y cirróticos con EHM. No existen diferencias significativas entre controles, cirróticos sin EHM y cirróticos con EHM en cuanto a sexo y edad. Las etiologías principales de los cirróticos que participan en el estudio son por consumo de alcohol y por virus de la hepatitis C o B. También mostramos datos del Child Pugh y MELD, donde tampoco vemos diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes (Tabla 20).

**TABLA 20:** Composición de los diferentes grupos y etiología de la enfermedad hepática

|                                   | Controles    | sin EHM      | con EHM         |
|-----------------------------------|--------------|--------------|-----------------|
| <b>Número total de individuos</b> | 24           | 26           | 13              |
| <b>Sexo (M/F)</b>                 | 16/8         | 20/6         | 12/1            |
| <b>Edad*</b>                      | 61±6 (50-73) | 63±9 (46-81) | 64 ± 11 (49-85) |
| <b>Alcohol</b>                    |              | 11           | 6               |
| <b>VHB/VHC/Alcohol + VHB</b>      |              | 0/11/1       | 0/3/1           |
| <b>Otros</b>                      |              | 3            | 3               |
| <b>Child Pugh A/B/C</b>           |              | 23/3/0       | 8/5/0           |
| <b>MELD*</b>                      |              | 9±2          | 12 ± 5          |

\*Los valores se expresan como la media ± DE. En paréntesis: rango de edad. EHM, encefalopatía hepática mínima; M/F, sexo masculino y femenino respectivamente; VHB, virus de la hepatitis B; VHC, virus de la hepatitis C. MELD, *model end stage liver disease*. *Child Pugh Score* se calcula como se indica en el apartado 1.1.2. Cuanto mayor es la puntuación, mayor es la severidad de la enfermedad hepática.

### 4.10 Parámetros bioquímicos

Los pacientes con EHM muestran niveles aumentados de IL-6, IL-18 en suero y de GMPc en plasma en comparación con los pacientes sin EHM y los controles. Los pacientes sin EHM también muestran niveles más elevados de estos parámetros que el grupo control. Los niveles de amonio en sangre están aumentados en pacientes en comparación con los controles pero no hay diferencias significativas entre los pacientes con y sin EHM (Tabla 21).

**TABLA 21:** Resultados de las determinaciones bioquímicas

|  | Controles     | sin EHM         | con EHM          | con EHM vs sin EHM ( $p$ ) | Valores $p$ de la ANOVA global |
|--|---------------|-----------------|------------------|----------------------------|--------------------------------|
| <b>Amonio venoso (<math>\mu\text{M}</math>)</b>      | 9 $\pm$ 1     | 27 $\pm$ 5**    | 25 $\pm$ 7**     | ns                         | <0,001                         |
| <b>GMPc plasmático (<math>\text{pmol/ml}</math>)</b> | 4 $\pm$ 0,2   | 8 $\pm$ 1**     | 12 $\pm$ 1***    | <0,01                      | <0,001                         |
| <b>IL-6 (<math>\text{pg/ml}</math>)</b>              | 1,5 $\pm$ 0,1 | 2,4 $\pm$ 0,2** | 4,2 $\pm$ 0,6*** | <0,001                     | <0,001                         |
| <b>IL-18 (<math>\text{pg/ml}</math>)</b>             | 140 $\pm$ 17  | 227 $\pm$ 17**  | 305 $\pm$ 27***  | <0,05                      | <0,001                         |

Los valores se expresan como la media  $\pm$  DE. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante una ANOVA de una vía seguida de un pos-hoc Bonferroni. Las diferencias significativas en comparación con el grupo control se indican con asteriscos \* $p$  <0,05; \*\* $p$  <0,01; \*\*\* $p$  <0,001).

## 4.11 ESTUDIO 1:

### ANÁLISIS DEL VOLUMEN DE SUSTANCIA GRIS Y CONECTIVIDAD FUNCIONAL EN REDES ICA Y SU RELACIÓN CON LAS ALTERACIONES COGNITIVAS EN LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

#### 4.11.1 Evaluación de la capacidad cognitiva y coordinación motora

Para evaluar las capacidades cognitivas y motoras de los pacientes cirróticos y de los controles realizamos una serie de test psicométricos explicados en el apartado 3.2.2 de métodos. Los resultados obtenidos se muestran en las Tabla 22.

#### ■ Alteraciones cognitivas

En primer lugar utilizamos la batería de test **PHES** para la clasificación de los pacientes con y sin EHM, como se ha explicado anteriormente. Los pacientes con EHM (puntuación del PHES menor o igual a -4) presentaron una disminución en el rendimiento de todos los subtest del PHES, en comparación con los controles y con los pacientes sin EHM. Los pacientes sin EHM obtuvieron puntuaciones más bajas que los controles en los subtest de dígitos y números (DST), de puntos seriados (SDT) y de línea quebrada (LTT) del PHES (Tabla 22).

### ■ Atención selectiva

Para la evaluación de la atención selectiva y la flexibilidad cognitiva, se utilizó el test **Stroop** de colores y palabras (Stroop, 1935). Los resultados indican que los pacientes con EHM muestran un déficit en la atención selectiva, obteniendo peores resultados en el test que los sujetos control y que los pacientes sin EHM, los cuales muestran también una deficiencia de atención selectiva respecto a los controles, pero no tan acusada como en los pacientes con EHM (Tabla 22).

Otra prueba de atención selectiva y de velocidad de procesamiento mental es el test de **Claves oral** (Oral SDMT). Los pacientes con EHM tienen un importante déficit de atención y en la velocidad de procesamiento en comparación con los controles y con los pacientes sin EHM. Los pacientes sin EHM también presentan menor velocidad de procesamiento, ya que no son capaces de realizar tantos aciertos como los controles. Observamos una media de 24 en los pacientes con EHM y unos 40 aciertos en los pacientes sin EHM. Los controles en cambio, tienen una media de 51 aciertos en el tiempo establecido (Tabla 22).

### ■ Atención selectiva-sostenida y concentración mental

Para evaluar la atención selectiva-sostenida y la concentración mental utilizamos el **test d2**. Los resultados de este test indican un déficit en la atención selectiva/sostenida y la concentración mental en los pacientes con EHM en comparación con los controles, como vemos en un menor número de respuestas y de aciertos y mayor número de fallos de comisión. Los pacientes sin EHM también muestran un leve déficit en comparación con los controles, ya que se encuentran en percentiles inferiores en parámetros que miden la efectividad total de la prueba (TOT) y el índice de concentración (CON), sin embargo, el deterioro es mucho mayor en los pacientes con EHM (Tabla 22).

### ■ Memoria de trabajo

Evaluamos la memoria de trabajo mediante el subtest de **dígitos directos** y **dígitos inversos** de la batería y el subtest de **letras y números**, ambos de la batería WAIS. En pacientes sin EHM ya existe una reducción en el número de aciertos, tanto directos como inversos, en ambos tipos de test en comparación con el grupo control. En pacientes con EHM el número de aciertos es significativamente menor que en controles, pero no muestra diferencias significativas respecto al grupo de sin EHM (Tabla 22).

### ■ Coordinación motora

Evaluamos la coordinación motora mediante los test bimanual y visuomotor. En ambos test los pacientes con EHM necesitan un tiempo bastante mayor para realizar las tareas que los pacientes sin EHM y los controles. Tardaron unos 3 minutos en realizar el test bimanual y más 4 minutos en el visuomotor, mientras que los pacientes sin EHM tardaron 2 y 3 minutos, respectivamente y los controles alrededor de 2 minutos en ambos test (Tabla 22).

**TABLA 22:** Evaluación de la función cognitiva y la coordinación motora mediante test neuropsicológicos.

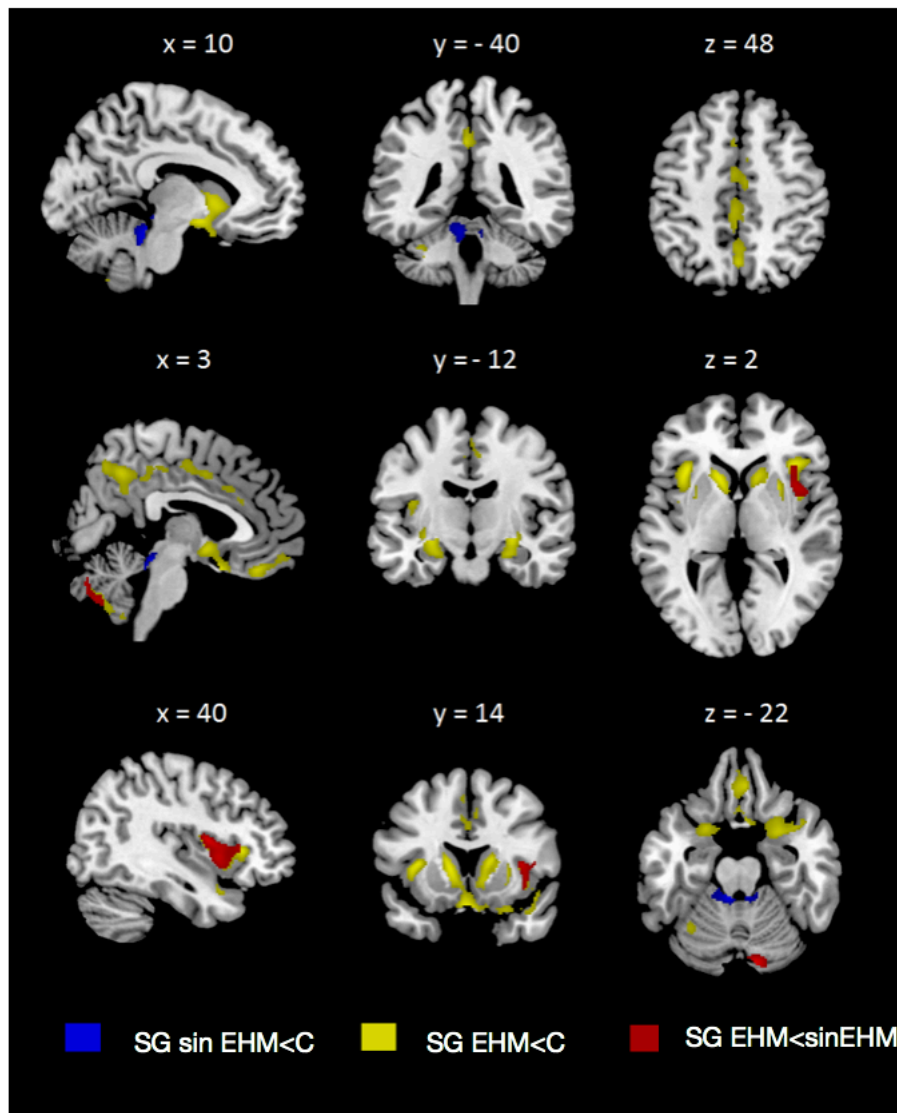
|   | Controles  | Sin EHM<br>( $p$ vs C) | EHM<br>( $p$ vs C) | $p$<br>EHM<br>vs sin<br>EHM | $p$<br>ANOVA<br>global |
|---|------------|------------------------|--------------------|-----------------------------|------------------------|
| <b>PHES</b> (puntuación total)                  | 0,9 ± 0,2  | -0,9 ± 0,3***          | -7,3 ± 1***        | <b>p&lt;0,001</b>           | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>DST</b> (respuestas correctas)               | 44 ± 2     | 28 ± 2***              | 19 ± 2***          | <b>p&lt;0,01</b>            | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>NCT-A</b> (segundos)                         | 29 ± 2     | 39 ± 3                 | 67 ± 11***         | <b>p&lt;0,001</b>           | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>NCT-B</b> (segundos)                         | 72 ± 5     | 109 ± 9                | 243 ± 46***        | <b>p&lt;0,001</b>           | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>SDT</b> (segundos)                           | 59 ± 3     | 80 ± 3***              | 125 ± 10***        | <b>p&lt;0,001</b>           | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>LTT</b> (segundos+errores)                   | 98 ± 3     | 124 ± 6**              | 220 ± 16***        | <b>p&lt;0,001</b>           | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>Stroop</b> (Tarea congruente) <sup>a</sup>   | 117 ± 3    | 98 ± 3***              | 75 ± 4***          | <b>p&lt;0,001</b>           | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>Stroop</b> (Tarea neutra) <sup>a</sup>       | 82 ± 3     | 74 ± 3*                | 55 ± 3***          | <b>p&lt;0,001</b>           | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>Stroop</b> (Tarea incongruente) <sup>a</sup> | 46 ± 2     | 39 ± 2**               | 28 ± 2***          | <b>p&lt;0,01</b>            | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>SDMT Oral</b> <sup>b</sup>                   | 51 ± 1     | 38 ± 2***              | 24 ± 3***          | <b>p&lt;0,001</b>           | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>d2 Test</b> Valores TR                       | 426 ± 16   | 300 ± 16***            | 238 ± 37***        | <b>&lt;0,05</b>             | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>d2 Test</b> Valores TOT                      | 393 ± 92   | 276 ± 15***            | 194 ± 28***        | <b>&lt;0,05</b>             | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>d2 Test</b> Valores CON                      | 156 ± 7    | 101 ± 7***             | 57 ± 15***         | <b>p&lt;0,01</b>            | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>d2 Test</b> Valores TA                       | 157 ± 7    | 108 ± 7***             | 71 ± 11***         | <b>p&lt;0,05</b>            | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>Dígitos Oral</b> Directo <sup>b</sup>        | 9,3 ± 0,5  | 7,6 ± 0,3***           | 7,0 ± 0,4***       | <b>ns</b>                   | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>Dígitos Oral</b> Inverso <sup>b</sup>        | 6,5 ± 0,6  | 4,8 ± 0,3**            | 3,8 ± 0,5**        | <b>ns</b>                   | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>Letras y números oral</b>                    | 9,9 ± 0,5  | 7,2 ± 0,5***           | 5,9 ± 0,7***       | <b>ns</b>                   | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>Coordinación Bimanual</b> (minutos)          | 1,9 ± 0,04 | 2,2 ± 0,05*            | 3,3 ± 0,3***       | <b>p&lt;0,001</b>           | <b>&lt;0,001</b>       |
| <b>Coordinación visuomotora</b> (minutos)       | 2,3 ± 0,07 | 2,8 ± 0,1*             | 4,4 ± 0,5***       | <b>p&lt;0,001</b>           | <b>&lt;0,001</b>       |

Los valores se expresan como la media ± MEE. Sin EHM y EHM, pacientes sin y con encefalopatía hepática mínima respectivamente. **PHES**, *Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*; **DST** (*Digit symbol test*), test de dígitos y números x; **NTC-A**, **NTC-B** (*Number Connection Test*): test de conexión numérica A y B; **SD** (*serial Dotting*), test de puntos seriados; **LTT** (*Line Tracing test*), test de línea quebrada. **d2 test**: TR, caracteres totales procesados; TOT, efectividad total; CON, índice de concentración; TA, total de respuestas correctas. <sup>a</sup> **Stroop**: Tarea congruente, número de palabras leídas en 45 segundos; Tarea neutra, número de colores leídos en 45 segundos; Tarea incongruente, número de ítems completados en 45 segundos. <sup>b</sup> **SDMT** oral, test de dígitos y números versión oral. <sup>b</sup> Respuestas correctas. Las diferencias entre grupos se analizaron utilizando una ANOVA de una vía seguido de un post-hoc Bonferroni. Las diferencias significativas en comparación con el grupo control se indican con asteriscos (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).



#### 4.11.2 Análisis de las alteraciones cerebrales por Resonancia Magnética

- Disminución del volumen de sustancia gris en la encefalopatía hepática mínima



**Figura 85:** Localización de la atrofia de sustancia gris en cirróticos sin y con EHM. Se incluye el sexo como covariable. Todos los resultados están analizados con un  $p < 0,05$  FMW corregida por cluster por las múltiples comparaciones en combinación con un umbral de  $p < 0,001$  a nivel de vóxel no corregido. C, grupo control sano; sin EHM, cirróticos sin encefalopatía hepática mínima; EHM, cirróticos con encefalopatía hepática mínima. SG, sustancia gris. Las zonas sombreadas de azul indican las áreas donde el volumen de sustancia gris es menor en pacientes sin EHM que en controles, en amarillo donde el volumen de sustancia gris es menor en pacientes con EHM que en controles y en rojo donde el volumen de sustancia gris es menor en pacientes EHM que en pacientes sin EHM. Las imágenes están en la convención neurológica (hemisferio derecho a la derecha de la imagen y hemisferio izquierdo a la izquierda).

Ambos grupos de pacientes muestran una disminución del volumen de sustancia gris en comparación con los controles sanos. Los pacientes sin EHM en comparación con los controles muestran una atrofia de la sustancia gris localizada en el cerebelo bilateral. Tal y como se esperaba, los pacientes con EHM muestran una atrofia de la sustancia gris más extendida en comparación con los controles que afecta áreas corticales y subcorticales. Específicamente, los pacientes con EHM muestran una disminución bilateral de la sustancia gris en áreas frontales (incluyendo la ínsula y área motora suplementaria), *precuneus* bilateral, polo temporal bilateral, y cerebelo. Además, la atrofia de sustancia gris en áreas subcorticales se localiza bilateralmente en los ganglios basales, hipocampo y giro parahippocampal, amígdala y corteza cingulada. Los pacientes con EHM en comparación con los pacientes sin EHM muestran una disminución de la sustancia gris en la lóbulo frontal derecho, ínsula derecha y cerebelo derecho. Para información más específica en relación a la atrofia de la Sustancia gris en pacientes con EHM (Tabla 23 y Figura 85).

**TABLA 23:** Áreas con diferencias significativas de volumen de sustancia gris en cirróticos sin y con EHM.

| Contraste                                | Localización anatómica                   | k    | MNI |      |     | valor t |
|--|--|------|-----|------|-----|---------|
|  |  |      | x   | y    | z   |         |
| <b>C &gt; sin EHM</b>                    | I Cerebelo (lóbulo III)                  | 574  | -8  | -34  | -16 | 6,36    |
|  | D Cerebelo (lóbulo III)                  |      | 8   | -37  | -19 | 4,62    |
|  | I Cerebelo (lóbulo V-IV)                 |      | -13 | -37  | -19 | 4,37    |
| <b>C &gt; EHM</b>                        | I Putamen                                | 6444 | -18 | 3    | -12 | 5,73    |
|  | D Putamen                                |      | 24  | 9    | -5  | 5,05    |
|  | I Caudado                                |      | -14 | 15   | 5   | 5,24    |
|  | D Caudado                                |      | 15  | 14   | 9   | 4,93    |
|  | I Ínsula                                 |      | -34 | 21   | 3   | 5,27    |
|  | I Giro Parahippocampal                   |      | -20 | -16  | -21 | 3,42    |
|  | D Giro Parahippocampal                   |      | 20  | 7    | -22 | 3,61    |
|  | I Hipocampo                              |      | -25 | -9   | -15 | 4,30    |
|  | D Hipocampo                              |      | 25  | -9   | -15 | 5,52    |
|  | I Amígdala                               |      | -21 | -6   | -15 | 3,69    |
|  | D Amígdala                               |      | 25  | 5    | -16 | 3,76    |
|  | I Recto                                  |      | -2  | 14   | -20 | 5,02    |
|  | D Recto                                  |      | 3   | 14   | -21 | 4,90    |
|  | I Polo Temporal Superior                 |      | -26 | 8    | -21 | 4,23    |
|  | D Polo Temporal Superior                 |      | 26  | 8    | -21 | 4,54    |
|  | I Lóbulo Olfatorio                       |      | -8  | 7    | -14 | 4,14    |
|  | D Lóbulo Olfatorio                       |      | 3   | 10   | -14 | 3,51    |
|  | D Giro Frontal Inferior (par orbital)    |      | 2   | 54   | -14 | 3,52    |
|  | I Giro Frontal Inferior (par triangular) |      | -38 | 22   | -2  | 4,36    |
|  | D Ínsula                                 |      | 39  | 3    | 11  | 5,32    |
| D Giro Frontal Inferior (par triangular) | 44                                       | 25   | 3   | 4,44 |     |         |
| D Opérculo Rolándico                     | 45                                       | -4   | 12  | 3,38 |     |         |
| I Opérculo Rolándico                     | -38                                      | -18  | 18  | 5,15 |     |         |
| I Giro de Heschl                         | -36                                      | -22  | 11  | 3,90 |     |         |
| I Corteza Cingulada Medial               | -3                                       | -39  | 39  | 4,70 |     |         |
| D Corteza Cingulada Medial               | 2  | -37  | 39  | 3,86 |     |         |
| I Corteza Cingulada Posterior            | -2                                       | -50  | 30  | 3,42 |     |         |
| D Corteza Cingulada Posterior            | 2  | -50  | 30  | 3,63 |     |         |
| I Precuneus                              | -2                                       | -63  | 47  | 4,39 |     |         |

|                                   |     |     |     |     |      |
|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|------|
| D Precuneus                       |     | 3   | -54 | 44  | 4,52 |
| I Lóbulo Paracentral              |     | -5  | -33 | 51  | 3,53 |
| <b>C &gt; EHM</b>                 |     |     |     |     |      |
| I Corteza Orbital Medial          | 461 | -2  | 60  | -14 | 3,60 |
| D Corteza Orbital Medial          |     | 2   | 56  | -14 | 3,54 |
| I Cerebelo (lóbulo VI)            | 433 | -35 | -44 | -33 | 4,38 |
| I Cerebelo (Crus 1)               |     | -35 | -55 | -29 | 4,14 |
| I Área Motora Suplementaria       | 460 | -2  | -5  | 50  | 3,54 |
| D Área Motora Suplementaria       |     | 2   | -5  | 50  | 3,33 |
| I Cerebelo (lóbulo VII B)         |     | -26 | -73 | -51 | 3,55 |
| I Cerebelo (lóbulo VIII)          | 491 | -18 | -69 | -54 | 4,14 |
| I Cerebelo (lóbulo IX)            |     | -6  | -60 | -50 | 3,08 |
| D Cerebelo (lobule IX)            |     | 5   | -53 | -54 | 3,83 |
| D Cerebelo (lóbulo VIII)          | 323 | 8   | -67 | -47 | 3,29 |
| Cerebelo (lóbulo VIII del Vermis) |     | -5  | -69 | -41 | 4,10 |
| I Corteza Cingulada Anterior      |     | -3  | 33  | 20  | 4,01 |
| D Corteza Cingulada Anterior      | 561 | 2   | 32  | 20  | 3,55 |
| I Giro Frontal Medial             |     | -2  | 22  | 41  | 3,42 |

| Contraste                                  | Localización anatómica           | k   | MNI |     |      | valor t |
|--|----------------------------------|-----|-----|-----|------|---------|
| <b>sin EHM &gt; EHM</b>                    | D Cerebelo (Crus I)              | 668 | 11  | -81 | -27  | 5,72    |
|  | D Cerebelo (Crus II)             |     | 24  | -78 | -39  | 3,81    |
|  | D Cerebelo (lobule VI)           |     | 14  | -78 | -22  | 3,92    |
|  | Cerebelo (lobule VII of Vermis)  |     | 6   | -76 | -27  | 3,94    |
|  | Cerebelo (lobule VIII of Vermis) |     | 5   | -69 | -41  | 4,06    |
| D Ínsula                                   | 653                              | 39  | 3   | 11  | 4,79 |         |
| D Opérculo Rolándico                       |                                  | 44  | -2  | 14  | 3,54 |         |
| D Giro Frontal Inferior (pars opercularis) |                                  | 45  | 14  | 8   | 3,38 |         |

Todos los resultados se analizaron con una  $p > 0,05$  FWE corregida por cluster por las múltiples comparaciones en combinación con un umbral  $p < 0,001$  a nivel de vóxel sin corregir. C, grupo control sano; sin EHM, cirróticos sin encefalopatía hepática mínima; EHM, cirróticos con encefalopatía hepática mínima. Coordenadas en el espacio MNI: *Montreal Neurological Institute*, la plantilla que se utiliza para normalizar todas las imágenes a un espacio estándar. I, izquierdo; D, derecho; k, tamaño del cluster mínimo para significación; El parámetro  $t$  se obtiene al analizar las diferencias entre los 2 grupos que comparamos, el valor  $t$  indica el valor umbral más alto del parámetro  $t$  de contraste a partir del cual hay significación.

## ■ Relación entre la atrofia de sustancia gris y la cognición

La pérdida de volumen en el cerebelo derecho correlaciona con los déficits en la realización del PHES, concretamente con los subtest de coordinación motora: SDT (*Serial dotting test*, test de puntos seriados) y LLT (*Line tracing test*, test de línea quebrada). Además, el volumen de sustancia gris en el cerebelo derecho también correlaciona con el Stroop (tarea incongruente), la coordinación visuomotora y el test d2 (Tabla 24).

Por otro lado, el volumen de sustancia gris en el lóbulo frontal y la ínsula derecha correlacionan con la puntuación del PHES, la tarea incongruente del test Stroop y el test de dígitos y símbolos oral (SDMT). Los cinco subtest del PHES tienen correlaciones significativas con el volumen de sustancia gris de este cluster. Correlaciones más débiles se encuentran con el test d2 y el test oral de dígitos inverso (Tabla 24).

**TABLA 24:** Correlaciones entre el volumen de sustancia gris y las variables cognitivas.

| Region Cerebral                                  | Predictor                   | r    | p     |
|--|-----------------------------|------|-------|
| <b>Cerebelo derecho</b>                          | PHES                        | 657  | <0,01 |
|  | Test de puntos seriados     | -457 | <0,01 |
|  | Test de línea quebrada      | -608 | <0,01 |
|  | Stroop (tarea incongruente) | 426  | <0,05 |
|  | Coordinación visuomotora    | -341 | <0,05 |
|  | d2-TR                       | 393  | <0,05 |
|  | d2-TOT                      | 424  | <0,05 |
| <b>Ínsula derecha /Opérculo frontal inferior</b> | PHES                        | 755  | <0,01 |
|  | Test de dígitos y símbolos  | 481  | <0,01 |
|  | NCT-A                       | -347 | <0,05 |
|  | NCT-B                       | -512 | <0,01 |
|  | Test de puntos seriados     | -682 | <0,01 |
|  | Test de línea quebrada      | -679 | <0,01 |
|  | Stroop (tarea incongruente) | 499  | <0,01 |
|  | d2-TR                       | 385  | <0,05 |
|  | d2-TOT                      | 363  | <0,05 |
|  | SDMT (oral)                 | 517  | <0,01 |
|  | Test de dígitos inverso     | 368  | <0,05 |

Se muestran los valores p y r del análisis de correlación en todo el grupo de pacientes. Abreviaciones: **PHES**, *Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*; **NCT-A**, **NCT-B** (*Number Connection Test*) : test de conexión numérica A y B; **d2 test**: TR, caracteres totales procesados; TOT, efectividad total; CON, índice de concentración; TA, total de respuestas correctas. **Stroop**: Tarea incongruente, número de ítems completados en 45 segundos. **SDMT** oral, test de dígitos y números versión oral.

### ■ Correlación de la reducción de sustancia gris con parámetros bioquímicos alterados en la encefalopatía hepática mínima

Los niveles en suero de IL6 y en plasma de GMPc correlacionan negativamente con la disminución de sustancia gris en el cerebelo derecho y en la ínsula derecha (Tabla 25).

**TABLA 25:** Correlaciones entre el volumen de sustancia gris y variables bioquímicas.

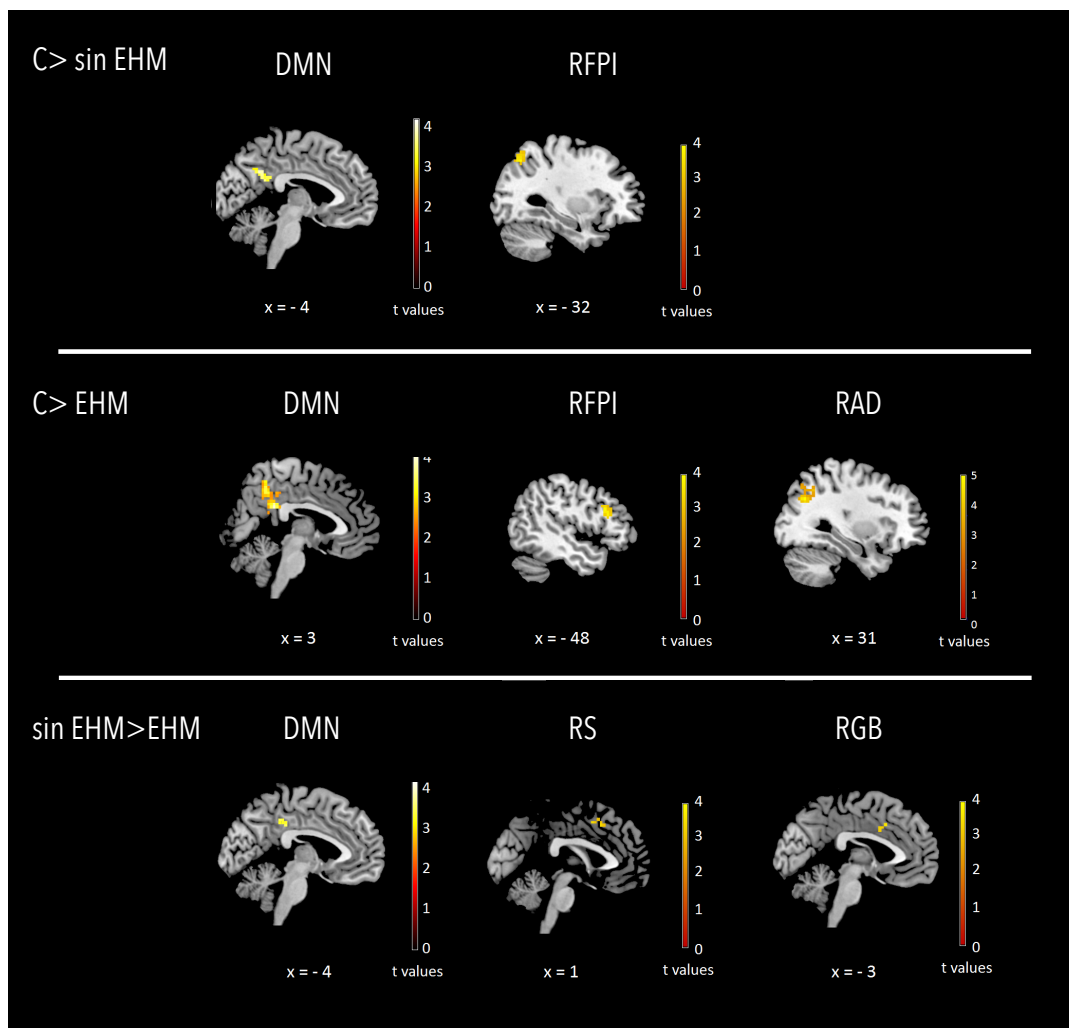
| Region Cerebral                                  | Predictor  | r    | p     |
|--|------------|------|-------|
| <b>Cerebelo derecho</b>                          | cGMP       | -396 | <0,05 |
|  | IL-6       | -650 | <0,01 |
|  | MELD       | -441 | <0,01 |
|  | Child-Pugh | -472 | <0,01 |
| <b>Ínsula derecha /Opérculo frontal inferior</b> | cGMP       | -381 | <0,05 |
|  | IL-6       | -408 | <0,05 |
|  | MELD       | -444 | <0,01 |
|  | Child-Pugh | -387 | <0,05 |

Se muestran los valores p y r del análisis de correlación en todo el grupo de pacientes. MELD, *model end stage liver disease*. Child Pugh Score proviene de una puntuación de 1-3 de severidad de ascitis, encefalopatía hepática, tiempo de protombina, albúmina y bilirrubina. Cuanto mayor es la puntuación, mayor es la severidad de la enfermedad hepática.

La pérdida de volumen en el cerebelo derecho correlaciona con la severidad de la enfermedad hepática, evaluada con los índices MELD y Child-Pugh. La puntuación MELD también correlaciona con la pérdida de sustancia gris en la ínsula derecha (Tabla 25).

■ **Los pacientes con encefalopatía hepática mínima muestran una disminución de la conectividad funcional en estado de reposo**

Los resultados de las diferencias de CF-er se muestran en la Tabla 26 y la Figura 86.



**Figura 86:** Diferencias entre grupos de la CF-er incluyendo el sexo como covariable. Todos los datos se analizaron con un valor de  $p < 0,05$  corregida por cluster por múltiples comparaciones (FWE, *Family-Wise Error*) en combinación de un umbral a nivel de voxel no corregido de  $p < 0,001$ . DMN, circuito de activación por defecto; RFPI, red frontoparietal izquierda; RAD, red de atención dorsal; RS, red de saliencia; RGB, red de los ganglios basales. C, controles; sin EHM y EHM, cirróticos con y sin encefalopatía hepática mínima, respectivamente. Las diferencias entre grupos se somborean con colores, el valor de la diferencia (el valor  $t$ ) se gradúa de menor a mayor con una escala de color (barras de la derecha).

En el circuito de activación por defecto (DMN, *Default Mode Network*), los pacientes con y sin EHM muestran una disminución significativa de CF-er en comparación con los sujetos control en el *precuneus* bilateral y en la corteza cingulada posterior bilateral. Además los pacientes con EHM muestran una menor CF-er en las mismas áreas en comparación con los pacientes sin EHM.

En la red frontoparietal izquierda (RFPI), los pacientes con EHM muestran una disminución de la conectividad en el giro frontal inferior en comparación con el grupo control, mientras que los pacientes sin EHM presentan una menor conectividad en el lóbulo parietal izquierdo inferior y superior en comparación con los sujetos control. Por otro lado, los pacientes con EHM muestran una disminución de la CF-er en comparación con los pacientes sin EHM en la red de saliencia (RS), localizada en el área motora suplementaria bilateral y la corteza cingulada anterior bilateral de la red de los ganglios basales (RGB).

Los pacientes con EHM muestran una disminución de la conectividad en comparación con los controles en algunas áreas pertenecientes a la red de atención dorsal (RAD), como el giro occipital medial y superior derecho y el giro angular.

Finalmente, no se encuentran diferencias entre los grupos en la red sensitivo-motora (RSM).

**TABLA 26:** Diferencias de conectividad funcional de las redes en estado de reposo entre los diferentes grupos incluyendo el sexo como covariable.

|  | Localización Anatómica     | k   | MNI |     |    | Valor t |
|--|----------------------------|-----|-----|-----|----|---------|
|  |                            |     | x   | y   | z  |         |
| <b>Default Mode Network (DMN)</b>          |                            |     |     |     |    |         |
| C> sin EHM                                 | I Precuneus                | 39  | -3  | -57 | 33 | 3,65    |
|  | D Precuneus                |     | 3   | -57 | 33 | 3,64    |
|  | I Giro Cingulado           |     | -3  | -48 | 24 | 3,95    |
|  | D Giro Cingulado           |     | 1   | -49 | 30 | 3,94    |
| C> EHM                                     | I Precuneus                | 114 | -1  | -47 | 42 | 3,72    |
|  | D Precuneus                |     | 6   | -51 | 45 | 4,89    |
|  | I Giro Cingulado           |     | -3  | -45 | 27 | 4,14    |
|  | D Giro Cingulado           |     | 3   | -45 | 27 | 4,67    |
| Sin EHM> EHM                               | I Precuneus                | 23  | -1  | -48 | 42 | 3,66    |
|  | D Precuneus                |     | 3   | -48 | 42 | 3,44    |
|  | I Giro Cingulado           |     | -3  | -39 | 42 | 3,51    |
|  | D Giro Cingulado           |     | 3   | -39 | 42 | 3,96    |
| <b>Red Frontoparietal Izquierda (RFPI)</b> |                            |     |     |     |    |         |
| C> sin EHM                                 | I Lóbulo Parietal Superior | 41  | -33 | -66 | 48 | 4,61    |
|  | I Lóbulo Parietal Inferior |     | -30 | -57 | 42 | 3,92    |
| C> EHM                                     | I Giro Frontal Inferior    | 36  | 45  | 24  | 18 | 4,55    |
| <b>Red de Atención Dorsal (RAD)</b>        |                            |     |     |     |    |         |
| C> EHM                                     | D Giro Occipital Medial    | 47  | 30  | -66 | 33 | 5,46    |
|  | D Giro Occipital Superior  |     | 27  | -69 | 35 | 3,66    |
|  | D Giro Angular             |     | 30  | -57 | 42 | 4,15    |

| Red de Saliencia (RS)             |                             |    |    |    |    |      |
|-----------------------------------|-----------------------------|----|----|----|----|------|
| sin EHM > EHM                     | D Área Motora Suplementaria | 21 | 9  | 12 | 48 | 4,29 |
|                                   | I Área Motora Suplementaria |    | -2 | 18 | 45 | 3,38 |
| Red de los Ganglios Basales (RGB) |                             |    |    |    |    |      |
| Sin EHM > EHM                     | I Giro Cingulado            | 21 | -6 | 12 | 36 | 4,09 |
|                                   | I Giro Cingulado            |    | 9  | 15 | 39 | 3,63 |

Todos los resultados se analizaron con una  $p > 0,05$  FWE corregida por cluster por las múltiples comparaciones en combinación con un umbral  $p < 0,001$  a nivel de vóxel sin corregir. C, grupo control sano; sin EHM, cirróticos sin encefalopatía hepática mínima; EHM, cirróticos con encefalopatía hepática mínima. Coordenadas MNI: *Montreal Neurological Institute*; I, izquierdo; D, derecho; k, tamaño del cluster mínimo para significación; t, valor umbral más alto del estadístico  $t$  de contraste a partir del cual hay significación.

### ■ Correlaciones entre la conectividad funcional y los parámetros bioquímicos y cognitivos

Los resultados de los análisis de regresión múltiple muestran una correlación positiva significativa ( $p < 0,01$ ) en todo el grupo de pacientes cirróticos entre la puntuación del PHES y la CF-er en el *precuneus* y el giro cingulado de la DMN (*Default Mode Network*), el área motora suplementaria bilateral relacionada con la RS (Red de Saliencia) y el giro cingulado anterior de la RGB (Red de los Ganglios Basales). Una buena ejecución del test Stroop (tarea incongruente) correlaciona con una mayor CF-er en el giro cingulado anterior bilateral relacionado con la RGB (Tabla 27).

**TABLA 27:** Correlaciones entre la conectividad funcionales de las redes en estado de reposo (CF-er) y la capacidad para realizar los test psicométricos y variables bioquímicas.

| Grupo      | Variable Dependiente | Predictor                | $r$   | $p$   | Localización Anatómica               |
|------------|----------------------|--------------------------|-------|-------|--------------------------------------|
| Cirróticos | DMN                  | PHES                     | 0,62  | <0,01 | Precuneus Bilateral y Giro Cingulado |
| Cirróticos | DMN                  | Dígitos y símbolos       | 0,38  | <0,05 | Precuneus Bilateral y Giro Cingulado |
| Cirróticos | DMN                  | Puntuación seriada       | -0,57 | <0,01 | Precuneus Bilateral y Giro Cingulado |
| Cirróticos | DMN                  | Línea quebrada           | -0,54 | <0,01 | Precuneus Bilateral y Giro Cingulado |
| Cirróticos | DMN                  | NCT-A                    | -0,35 | <0,05 | Precuneus Bilateral y Giro Cingulado |
| Cirróticos | DMN                  | NCT-B                    | -0,43 | <0,05 | Precuneus Bilateral y Giro Cingulado |
| Cirróticos | DMN                  | Coordinación Bimanual    | -0,60 | <0,01 | Precuneus Bilateral y Giro Cingulado |
| Cirróticos | DMN                  | Coordinación Visuomotora | -0,47 | <0,01 | Precuneus Bilateral y Giro Cingulado |
| Sin EHM    | DMN                  | SDMT Oral                | 0,45  | <0,05 | Precuneus Bilateral y Giro Cingulado |
| Cirróticos | RS                   | PHES                     | 0,57  | <0,01 | Área motora suplementaria            |
| Cirróticos | RS                   | Puntuación seriada       | -0,46 | <0,01 | Área motora suplementaria            |
| Cirróticos | RS                   | Línea quebrada           | -0,39 | <0,05 | Área motora suplementaria            |
| Cirróticos | RS                   | IL-6                     | -0,38 | <0,05 | Área motora suplementaria            |

|            |     |                       |       |       |  |
|------------|-----|-----------------------|-------|-------|--|
| EHM        | RAD | IL-18                 | -0,78 | <0,05 | Precuneus D, Lóbulo parietal D, Giro Superior y Medial Occipital D |
| Cirróticos | RGB | PHES                  | 0,48  | <0,01 | Giro Cingulado Bilateral   |
| Cirróticos | RGB | Puntuación seriada    | -0,46 | <0,01 | Giro Cingulado Bilateral   |
| Cirróticos | RGB | Stroop (incongruente) | 0,51  | <0,01 | Giro Cingulado Bilateral   |
| Cirróticos | RGB | Child-Pugh            | -0,44 | <0,05 | Corteza Cingulada Anterior Bilateral                               |

Se muestran los valores  $p$  y  $r$  del análisis de correlación. DMN, circuito de activación por defecto; RS, red de saliencia; RGB, red de los ganglios basales. D, derecho; MELD, *model end stage liver disease*. Child Pugh Score proviene de una puntuación de 1-3 de severidad de ascitis, encefalopatía hepática, tiempo de protombina, albúmina y bilirrubina. Cuanto mayor es la puntuación, mayor es la severidad de la enfermedad hepática.

### ■ Precisión diagnóstica de las alteraciones en el volumen de sustancia gris y en la conectividad funcional para la detección de la encefalopatía hepática mínima

Realizamos un análisis de curvas ROC para evaluar la utilidad de las alteraciones en el volumen de sustancia gris y la CF-er para el diagnóstico de la EHM. Dadas las buenas correlaciones entre el volumen de sustancia gris del cerebelo derecho y los cluster Ínsula derecha/Opérculo Frontal Inferior y el PHES (Tabla 24), realizamos un análisis de curva ROC para el diagnóstico de la EHM. Para este análisis incluimos los volúmenes de sustancia gris de estos cluster resultantes del contraste ANOVA sin EHM>EHM (*eigenvalues*) (Tabla 28).

**TABLA 28:** Precisión diagnóstica en la reducción de la integridad de sustancia gris para la detección de la EHM.

| Región Cerebral           | Área bajo la curva ROC (95% IC) | $p$ valor | Punto de corte (mm <sup>3</sup> ) | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) |
|---------------------------|---------------------------------|-----------|-----------------------------------|------------------|-------------------|
| Cerebelo D                | 0,99 (0,96-1)                   | 0,001     | 0,7                               | <b>100</b>       | <b>91</b>         |
| Ínsula D/Opérculo Frontal | 0,98 (0,95-1)                   | 0,001     | 0,6                               | <b>92</b>        | <b>95</b>         |
| Ínsula D                  | 0,75 (0,58-0,93)                | 0,01      | 8,2                               | 77               | 73                |
| Ínsula I                  | 0,81(0,66-0,95)                 | 3         | 8,8                               | 77               | 73                |
| Caudado D                 | 0,73 (0,55-0,91)                | 0,02      | 4,5                               | 77               | 59                |
| Caudado I                 | 0,76 (0,57-0,95)                | 0,01      | 4,1                               | 77               | 73                |
| Putamen D                 | 0,77 (0,58-0,95)                | 9         | 3,7                               | 77               | 86                |
| Putamen I                 | 0,75 (0,58-0,93)                | 0,01      | 3,4                               | 77               | 82                |

IC, intervalo de confianza. I, izquierda; D, Derecha. Las curvas ROC presentan la sensibilidad de una prueba diagnóstica que produce resultados continuos, en función de los falsos positivos (complementario de la especificidad), para distintos puntos de corte. Un parámetro para evaluar la bondad de una prueba diagnóstica que produce resultados continuos es el área bajo la curva. Este área puede interpretarse como la probabilidad de que ante un par de individuos, uno sin EHM y el otro con EHM, la prueba los clasifique correctamente.



El volumen de sustancia gris en el cerebelo derecho mostró un área bajo la curva ROC de 0,986 (intervalo de confianza: 0,96-1);  $p < 0,001$ ) con un 100% de sensibilidad y un 91% de especificidad en el punto de corte de 0,698 mm<sup>3</sup>. El cluster Ínsula derecha/Opérculo Frontal Inferior tiene una área bajo la curva ROC de 0,983 (intervalo de confianza: 0,95-1;  $p < 0,001$ ) con un 92% de sensibilidad y un 95% de especificidad en un punto de corte de 0,566 mm<sup>3</sup>. Además, encontramos que las alteraciones de sustancia gris en la ínsula bilateral y los núcleos de los ganglios basales podrían ser predictivos de la EHM (Tabla 28).

Los análisis de curvas ROC para la CF-er en la DMN, RS y RGB para el diagnóstico de la EHM muestran áreas bajo las curvas de 0,96, 0,92 y 0,88 respectivamente ( $p < 0,001$ ) con excelentes valores de especificidad y sensibilidad (Tabla 29).

**TABLA 29:** Precisión diagnóstica en la reducción de la conectividad funcional de las redes en estado de reposo (CF-er) para la detección de la EHM.

| Red Cerebral                             | Área bajo la curva ROC (95% IC) | p valor | Punto de corte <sup>a</sup> | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) |
|--|---------------------------------|---------|-----------------------------|------------------|-------------------|
| <b>DMN</b> (Default Mode Network)        | 0,96 (0,89-1)                   | <0,001  | 2,03                        | <b>91</b>        | <b>86</b>         |
| <b>RS</b> (Red de Saliencia)             | 0,92 (0,81-1)                   | <0,001  | 0,55                        | <b>82</b>        | <b>100</b>        |
| <b>RGB</b> (Red de los Ganglios Basales) | 0,88 (0,76-1)                   | <0,001  | 1,06                        | <b>82</b>        | <b>81</b>         |

<sup>a</sup> Los valores de los puntos de corte son las diferencias de CF-er entre sin EHM y EHM (expresados como los *eigenvalues* de los cluster significativos derivados de contrastes ANCOVAS previos) en los que se alcanza la sensibilidad y especificidad más alta para discriminar entre grupos de pacientes. IC, intervalo de confianza.

## 4.12 ESTUDIO 2:

**ANÁLISIS DEL VOLUMEN DE SUSTANCIA GRIS Y CONECTIVIDAD  
FUNCIONAL DEL HIPOCAMPO Y SU RELACIÓN CON LAS  
ALTERACIONES EN EL APRENDIZAJE Y MEMORIA CON  
ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA**

■ **Aprendizaje, memoria y reconocimiento verbal a largo plazo**

El aprendizaje, memoria y reconocimiento a largo plazo verbal se evaluaron con el test TAVEC (Test de Aprendizaje Verbal España Complutense) (Tabla 30).

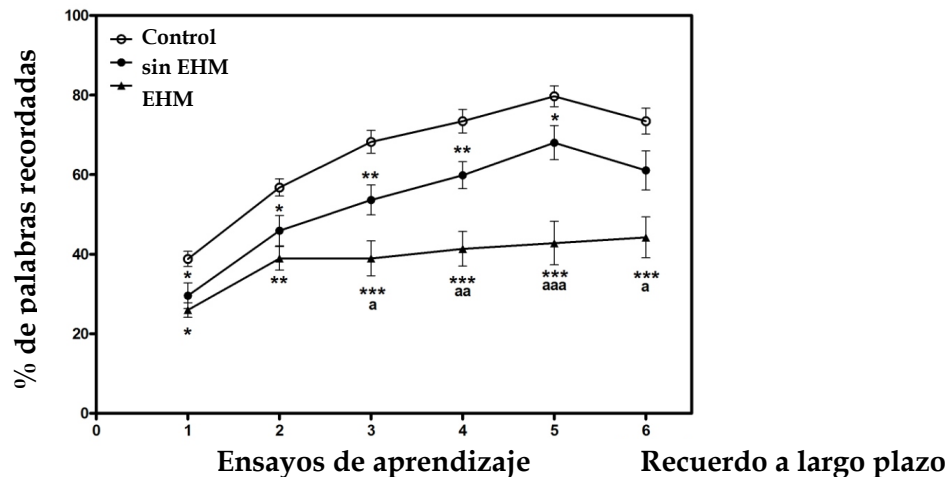
**TABLA 30:** Evaluación de aprendizaje, memoria y reconocimiento verbal a largo plazo con el TAVEC

|                                   | Controles | sin EHM  | EHM      | sin EHM<br>vs Control<br>(p) | EHM<br>vs<br>Control<br>(p) | EHM<br>vs<br>sin EHM<br>(p) |
|-----------------------------------|-----------|----------|----------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>Aprendizaje</b>                |           |          |          |                              |                             |                             |
| <b>Ensayo 1</b>                   | 6,2±0,3   | 3,9±0,5  | 3,9±0,3  | <b>&lt;0,001</b>             | <b>0,004</b>                | ns                          |
| <b>Ensayo 2</b>                   | 8,9±0,4   | 6,7±0,7  | 5,8±0,3  | <b>0,02</b>                  | <b>0,005</b>                | ns                          |
| <b>Ensayo 3</b>                   | 10,8±0,5  | 7,8±0,6  | 5,6±0,6  | <b>0,002</b>                 | <b>&lt;0,001</b>            | 0,07                        |
| <b>Ensayo 4</b>                   | 11,7±0,5  | 9,1±0,6  | 6,1±0,6  | <b>0,007</b>                 | <b>&lt;0,001</b>            | <b>0,008</b>                |
| <b>Ensayo 5</b>                   | 12,3±0,5  | 10,3±0,8 | 5,8±0,8  | 0,12                         | <b>&lt;0,001</b>            | <b>0,001</b>                |
| <b>Total</b>                      | 50±1      | 38±3     | 27±2     | <b>0,001</b>                 | <b>&lt;0,001</b>            | <b>0,02</b>                 |
| <b>Recuerdo<br/>(largo plazo)</b> | 11,4±0,6  | 9,2±0,9  | 6,1±0,4  | 0,15                         | <b>1</b>                    | <b>0,06</b>                 |
| <b>Reconocimiento</b>             | 14,7±0,4  | 14,9±0,3 | 12,9±0,6 | ns                           | <b>26</b>                   | <b>0,009</b>                |

Los valores se expresan como la media a media ± MEE del número de ítems recordados o reconocidos. Las diferencias entre grupos se analizaron utilizando una ANOVA de una vía usando un post-hoc Bonferroni por múltiples comparaciones. Los valores  $p < 0,02$  se consideran significativos y se resaltan en letra negra.

Los pacientes cirróticos con y sin EHM muestran diferencias significativas en comparación con el grupo control en los ensayos de aprendizaje y en la puntuación de aprendizaje total. Los pacientes con EHM aprenden un número menor de palabras que los pacientes sin EHM desde el ensayo 3 al 5. El aprendizaje total, el recuerdo y reconocimiento a largo plazo también son diferentes en los pacientes con EHM en comparación con los pacientes sin EHM ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ; y  $p < 0,01$  respectivamente) y los controles ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$  y  $p < 0,01$  respectivamente) (Tabla 30). La figura 87 muestra los porcentajes de palabras aprendidas a lo largo de los cinco ensayos y en la tarea de recuerdo a largo plazo (ensayo 6). Controles y pacientes sin EHM muestran un aumento del porcentaje de palabras aprendidas a lo largo de los cinco ensayos, mientras que los pacientes con EHM no mejoran desde el ensayo 2 hasta el 5. Los pacientes con EHM recuerdan un porcentaje menor de palabras (44%) que los

controles (73%,  $p<0,001$ ) y los pacientes sin EHM (63%,  $p<0,05$ ) cuando se les pide que repitan las palabras aprendidas 20 minutos después del ensayo 5 (recuerdo a largo plazo, ensayo 6).



**Figura 87:** Comparación de los porcentajes de palabras aprendidas en el TAVEC a lo largo de cinco ensayos en los tres grupos experimentales. El ensayo 6 corresponde con el porcentaje de palabras aprendidas en la tarea de recuerdo a largo plazo. Sin EHM y EHM, pacientes sin y con encefalopatía hepática, respectivamente. Los valores significativamente diferentes al grupo control se indican con asteriscos (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ). Los valores significativamente diferentes en EHM en comparación con el grupo sin EHM se indican con <sup>a</sup> $p<0,05$ ; <sup>aa</sup> $p<0,01$ ; <sup>aaa</sup> $p<0,001$ .

La figura 87 muestra que el porcentaje de palabras recordadas es similar al de palabras aprendidas durante los 5 ensayos en cada grupo: los controles aprenden un 80%, recuerdan un 73%; los pacientes sin EHM aprenden un 68%, recuerdan un 63% y los pacientes con EHM aprenden un 43%, recuerdan un 44%). No hay diferencias significativas entre el porcentaje de aprendizaje y de recuerdo. Esto indica que los pacientes con EHM presentan problemas en el aprendizaje de material verbal.

#### ■ Análisis de correlación entre el rendimiento en la memoria, el deterioro cognitivo y los parámetros bioquímicos

Correlaciones parciales con el sexo como covariable en todo el grupo de participantes indican como cabría esperar una relación entre el aprendizaje y la memoria (evaluados con el test TAVEC) con el deterioro cognitivo (evaluado con el PHES), ya que se encuentra una buena correlación entre la puntuación del PHES y el aprendizaje total ( $r=0,559$ ;  $p<0,001$ ), el

recuerdo a largo plazo ( $r=0,442$ ;  $p<0,001$ ) y la puntuación de reconocimiento ( $r=0,519$ ;  $p<0,001$ ).

Los niveles sanguíneos de diversos parámetros bioquímicos correlacionan negativamente con las puntuaciones del TAVEC en todo el grupo de participantes: el aprendizaje total correlaciona con el GMPc plasmático ( $r=-0,36$ ;  $p<0,004$ ) y los niveles en suero de IL6 ( $r=-0,43$ ;  $p<0,001$ ) e IL-18 ( $r=-0,488$ ;  $p<0,001$ ). El recuerdo a largo plazo correlaciona con los niveles en suero de IL6 ( $r=-0,36$ ;  $p<0,004$ ) e IL-18 ( $r=-0,445$ ;  $p<0,001$ ). Existe una correlación débil entre la tarea de reconocimiento y los niveles de suero de IL-6 ( $r=-0,25$ ;  $p<0,046$ ).

Las correlaciones analizadas para cada grupo por separado muestran en los pacientes sin EHM correlaciones significativas entre el recuerdo a largo plazo del TAVEC y los niveles de amonio ( $r=0,46$ ;  $p<0,02$ ) y los niveles en suero de IL-18 ( $r=-0,42$ ;  $p=0,04$ ). No se encuentran correlaciones significativas intra-grupo para los controles y los pacientes con EHM.

### ■ Volumen de las subregiones del hipocampo

En relación con los análisis de las subregiones del hipocampo, sólo el volumen de la fimbria derecha muestra diferencias significativas en el grupo de pacientes controlando por sexo. Específicamente, tanto los pacientes sin EHM como los pacientes con EHM muestran un volumen menor en comparación con los controles en dicha región ( $p<0,05$ ). Sin embargo, los dos grupos de pacientes no muestra diferencias entre ellos. No se encuentran otras diferencias significativas en otras regiones del hipocampo (Tabla 31).

**TABLA 31:** Comparación de los volúmenes de las subregiones del hipocampo entre controles y pacientes sin y con EHM.

| Volumen           | Controles | Sin EHM   | EHM       | (p)<br>sin EHM<br>vs.<br>controls | (p)<br>EHM<br>vs.<br>controls | (p)<br>sin EHM<br>vs.<br>EHM |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| <b>Izquierda</b>  |           |           |           |                                   |                               |                              |
| Presubiculum      | 2,72±0,09 | 2,59±0,10 | 2,55±0,21 | 0,513                             | 0,597                         | 0,998                        |
| CA1               | 1,89±0,05 | 1,86±0,07 | 1,98±0,09 | 0,774                             | 0,361                         | 0,242                        |
| CA2-3             | 5,76±0,23 | 5,60±0,26 | 5,39±0,34 | 0,704                             | 0,515                         | 0,726                        |
| Fimbria           | 0,38±0,02 | 0,34±0,03 | 0,33±0,05 | 0,325                             | 0,463                         | 0,944                        |
| Subiculum         | 3,69±0,14 | 3,54±0,14 | 3,56±0,24 | 0,662                             | 0,988                         | 0,715                        |
| CA4-GD            | 3,28±0,13 | 3,18±0,15 | 3,07±0,19 | 0,730                             | 0,541                         | 0,734                        |
| Fisura Hipocampal | 0,26±0,02 | 0,29±0,03 | 0,34±0,04 | 0,897                             | 0,145                         | 0,716                        |
| <b>Derecha</b>    |           |           |           |                                   |                               |                              |

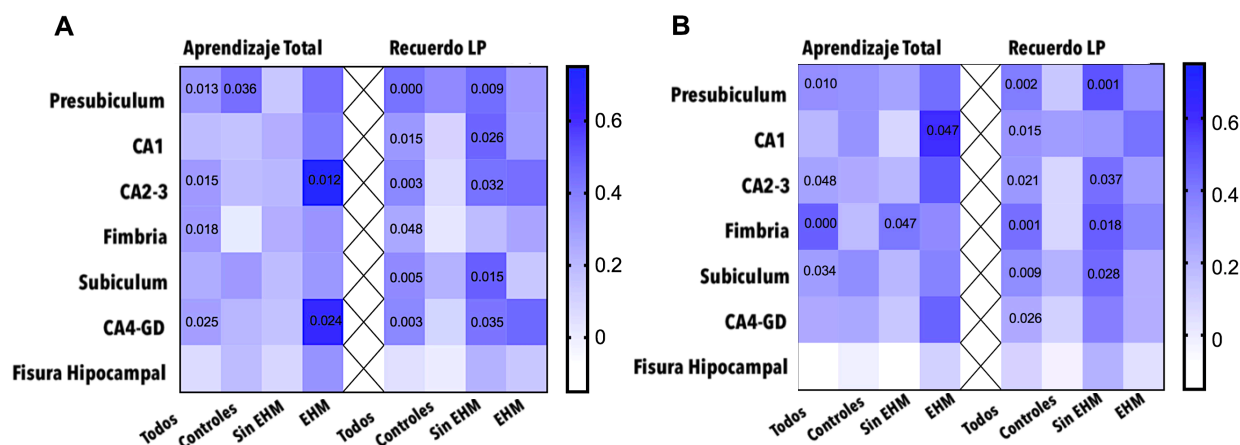
|                   |           |           |           |              |              |       |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|--------------|--------------|-------|
| Presubiculum      | 2,62±0,11 | 2,55±0,09 | 2,45±0,18 | 0,829        | 0,739        | 0,871 |
| CA1               | 1,98±0,07 | 2,00±0,06 | 2,01±0,11 | 0,764        | 0,562        | 0,732 |
| CA2-3             | 6,13±0,25 | 5,96±0,23 | 5,91±0,36 | 0,750        | 0,892        | 0,900 |
| Fimbria           | 0,40±0,02 | 0,31±0,03 | 0,28±0,04 | <b>0,018</b> | <b>0,033</b> | 0,836 |
| Subiculum         | 3,69±0,15 | 3,53±0,12 | 3,54±0,26 | 0,578        | 0,975        | 0,667 |
| CA4-GD            | 3,44±0,15 | 3,34±0,13 | 3,28±0,2  | 0,740        | 0,815        | 0,971 |
| Fisura Hipocampal | 0,31±0,02 | 0,34±0,03 | 0,37±0,05 | 0,35         | 0,129        | 0,430 |

Los volúmenes medidos (en mm<sup>3</sup>) de las subregiones del hipocampo se expresan como la media ± MEE, y fueron normalizados por el volumen intracraneal de cada sujeto (ver en material y métodos sección 3.2.4.1). Sin EHM y EHM, pacientes con y sin encefalopatía hepática mínima respectivamente. CA: Cornu Ammonis; GD: giro dentado. Las diferencias entre los grupos se analizaron utilizando el Modelo Lineal General, con un post-hoc Bonferroni para las múltiples comparaciones, incluyendo en género como variable confusora. Los valores de *p* significativos (*p*<0,05) se indican en letra negra.

### ■ Análisis de correlación entre el volumen de las regiones del hipocampo, la memoria y los parámetros bioquímicos

Antes de proceder al análisis de correlación, buscamos posibles *outliers* multivariantes utilizando una estimación robusta de los parámetros con la distancia de Mahalanobis y la comparación con el correspondiente valor crítico de la distribución chi-cuadrado. La distancia de Mahalanobis es un criterio que depende de los parámetros estimados de la distribución multivariada. Describe la distancia entre cada punto de datos y el centro de masa. Cuando un punto se encuentra en el centro de masa, la distancia de Mahalanobis es cero y cuando un punto de datos se encuentra distante del centro de masa, la distancia es mayor a cero. Por lo tanto, los puntos de datos que se encuentran lejos del centro de masa se consideran valores atípicos. Para datos multivariantes distribuidos normalmente, los valores de la distancia de Mahalanobis tienen aproximadamente una distribución chi-cuadrado con *p* grados de libertad. En consecuencia, aquellas observaciones con una distancia de Mahalanobis grande, fuera de la distribución chi-cuadrado, se indican como valores atípicos (Rousseeuw y Van Zomeren, 1990; Aguinis et al., 2013). Solo se encontró un caso de *outlier* (perteneciente al grupo de EHM) y por tanto, se excluyó en el subsiguiente análisis de correlación. En todo el grupo de participantes, las correlaciones parciales con el sexo como covariable, revelan que el volumen de varias regiones hipocampales de interés se relacionan claramente con el aprendizaje y la memoria a largo plazo evaluados con el TAVEC (Figura 88).

Las correlaciones analizadas para cada grupo de pacientes por separado entre los volúmenes de las subregiones del hipocampo muestran que el mayor volumen en diferentes regiones del hipocampo en los cirróticos sin EHM correlaciona positivamente con la mejor realización de la tarea de recuerdo a largo plazo del TAVEC. En cuanto a los pacientes con EHM, se obtienen correlaciones significativas entre la puntuación de aprendizaje del TAVEC con el volumen del CA1 derecho y el CA2-3 y CA4-GD izquierdos.



**Figura 88:** Mapas de calor representando la relación entre los volúmenes de las diferentes subregiones del hipocampo del hemisferio izquierdo (A) y derecho (B) y el aprendizaje total y el recuerdo a largo plazo (LP) evaluados con el TAVEC. Se calcularon las correlaciones por separado (columnas) para todo el conjunto de sujetos (todos), y para cada subgrupo de participantes: controles, pacientes sin (sin EHM) y con (EHM) encefalopatía hepática mínima. El color de las celdas indica los coeficientes de Pearson en función de una escala gráfica localizada en el lado derecho de la figura. Los valores *p* para las asociaciones estadísticamente significativas (*p*<0,05) se indican dentro de las celdas. Notar que, debido al diferente tamaño de muestra, la potencia estadística difiere en cada uno de estos análisis de asociación por separado y no hay una correspondencia estricta entre el color de la escala y los valores significativos (ej: el mismo coeficiente *r* de Pearson puede alcanzar significación estadística en los grupos más grandes per no en los más pequeños).

Además, se obtienen correlaciones significativas entre los parámetros volumétricos y las variables bioquímicas (Tabla 32). En todo el grupo de participantes, los niveles de IL-18 en el suero correlacionan negativamente con volúmenes de algunas de las subregiones del hipocampo. Las correlaciones intra-grupo muestran que en el grupo de cirróticos sin EHM, los niveles de amonio correlacionan positivamente y los niveles de IL-18 negativamente con el volumen de varias regiones del hipocampo (Tabla 32).

**TABLA 32:** Correlaciones de los volúmenes de las regiones del hipocampo (hemisferio izquierdo y hemisferio derecho) con los parámetros bioquímicos.

| Regiones                   | Todos los sujetos               |                                  | Controles |       | Sin EHM                          |                                   | EHM    |       |
|----------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------|-------|----------------------------------|-----------------------------------|--------|-------|
|                            | Amonio                          | IL-18                            | Amonio    | IL-18 | Amonio                           | IL-18                             | Amonio | IL-18 |
| <b>Hipocampo Izquierdo</b> |                                 |                                  |           |       |                                  |                                   |        |       |
| Presubiculum               | ns                              | <b>r=-0,27</b><br><b>p=0,04</b>  | ns        | ns    | ns                               | <b>r=-0,545</b><br><b>p=0,006</b> | ns     | ns    |
| CA1                        | <b>r=0,36</b><br><b>p=0,004</b> | ns                               | ns        | ns    | <b>r=0,501</b><br><b>p=0,013</b> | r=-0,40<br>p=0,05                 | ns     | ns    |
| CA2-3                      | ns                              | <b>r=-0,298</b><br><b>p=0,02</b> | ns        | ns    | ns                               | <b>r=-0,42</b><br><b>p=0,04</b>   | ns     | ns    |
| Fimbria                    | ns                              | <b>r=-0,3</b><br><b>p=0,02</b>   | ns        | ns    | <b>r=0,53</b><br><b>p=0,008</b>  | <b>r=-0,41</b><br><b>p=0,04</b>   | ns     | ns    |
| Subiculum                  | ns                              |                                  | ns        | ns    | ns                               | <b>r=-0,45</b><br><b>p=0,03</b>   | ns     | ns    |
| CA4-GD                     | ns                              | <b>r=-0,288</b><br><b>p=0,02</b> | ns        | ns    | <b>r=0,415</b><br><b>p=0,04</b>  | <b>r=-0,44</b><br><b>p=0,03</b>   | ns     | ns    |
| Fisura Hipocampal          | ns                              | ns                               | ns        | ns    | ns                               | ns                                | ns     | ns    |

| Regiones                 | Todos los sujetos |                                  | Controles |       | Sin EHM                        |                                 | EHM    |       |
|--------------------------|-------------------|----------------------------------|-----------|-------|--------------------------------|---------------------------------|--------|-------|
|                          | Amonio            | IL-18                            | Amonio    | IL-18 | Amonio                         | IL-18                           | Amonio | IL-18 |
| <b>Hipocampo derecho</b> |                   |                                  |           |       |                                |                                 |        |       |
| Presubiculum             | ns                | ns                               | ns        | ns    | ns                             | <b>r=-0,46</b><br><b>p=0,02</b> | ns     | ns    |
| CA1                      | ns                | ns                               | ns        | ns    | <b>r=0,44</b><br><b>p=0,03</b> | r=-0,399<br>p=0,054             | ns     | ns    |
| CA2-3                    | ns                | ns                               | ns        | ns    | ns                             | <b>r=-0,42</b><br><b>p=0,04</b> | ns     | ns    |
| Fimbria                  | ns                | <b>r=-0,32</b><br><b>p=0,012</b> | ns        | ns    | <b>r=0,47</b><br><b>p=0,02</b> | r=-0,37<br>p=0,07               | ns     | ns    |
| Subiculum                | ns                | ns                               | ns        | ns    | ns                             | <b>r=-0,5</b><br><b>p=0,013</b> | ns     | ns    |
| CA4-GD                   | ns                | ns                               | ns        | ns    | ns                             | <b>r=-0,48</b><br><b>p=0,02</b> | ns     | ns    |
| Fisura Hipocampal        | ns                | ns                               | ns        | ns    | ns                             | ns                              | ns     | ns    |

Los datos muestran los valores de las correlaciones parciales ajustando por el sexo. CA, Cornu Ammonis; GD: Giro Dentado; sin EHM y EHM, pacientes sin y con encefalopatía hepática mínima, respectivamente. Las correlaciones significativas se muestran en negrita.

### ■ Análisis de conectividad funcional en las subregiones del hipocampo

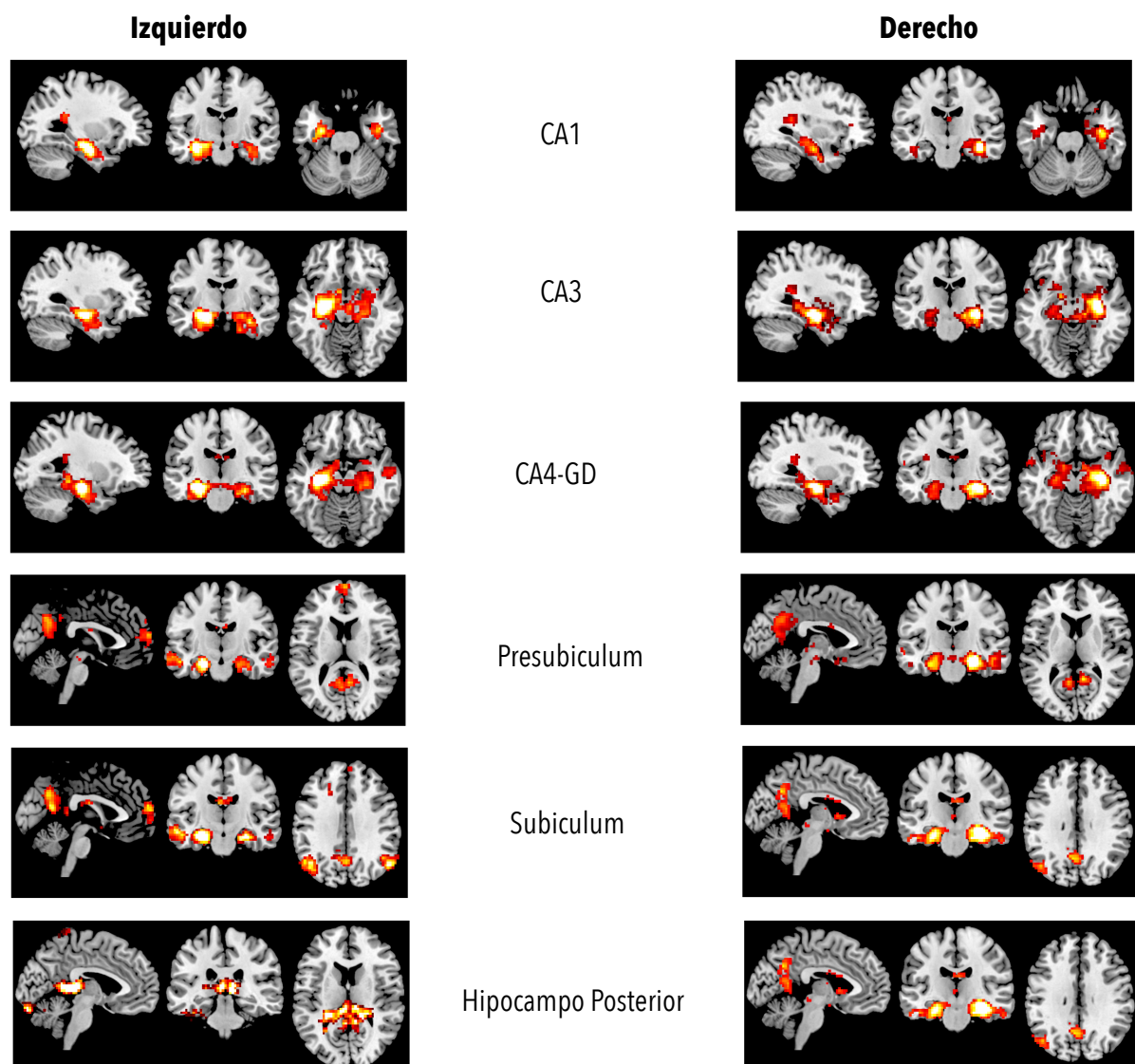
Con el fin de evaluar las regiones cerebrales funcionalmente conectadas se realizó un análisis de CF-er para cada grupo en cada región de interés del hipocampo. Todas las semillas del hipocampo evocaron mapas de CF-er ampliamente superpuestos (ver Figura 89 para un ejemplo ilustrativo del grupo control).

Debido al aumento de movimiento de la cabeza durante la adquisición de las imágenes de RM funcional, el análisis de la CF-er se realizó en un número menor de sujetos (18 controles, 19 sin EHM y 10 EHM). Se comprobó que los datos demográficos, clínicos y neuropsicológicos de este número menor de participantes era similar a los obtenidos en los apartados 4.3.1, 4.3.2 y en el Test TAVEC. Las diferencias entre los cirróticos con EHM y sin EHM permanecen significativas en el aprendizaje total del TAVEC; existe una tendencia a la significación ( $p < 0,06$ ) para el recuerdo a largo plazo cuando se comparan los pacientes con y sin EHM, probablemente debido al número bajo de pacientes en esta muestra, ya que la significación se alcanza cuando se incluye un mayor número de pacientes, como muestra la Tabla 31. En relación con la integridad del hipocampo, existe una tendencia a ser significativamente diferente ( $p < 0,06$ ) el volumen de la fimbria derecha en el grupo de sin EHM en comparación con el grupo control en los participantes en los que se analizó la CF-er. En este grupo de sujetos los volúmenes de las subregiones hipocampales correlacionan con el recuerdo a largo plazo del TAVEC pero no se encuentran correlaciones significativas con el aprendizaje del TAVEC.

Diferencias significativas de CF-er entre los grupos se observan en las semillas *subiculum* izquierdo y *presubiculum*. Concretamente, en ambas semillas, los pacientes con EHM presentan una disminución de la CF-er con el *precuneus* bilateral en comparación con el grupo control (tamaño del cluster= 36, coordenadas MNI: -6 -60 15; tamaño del cluster= 76,



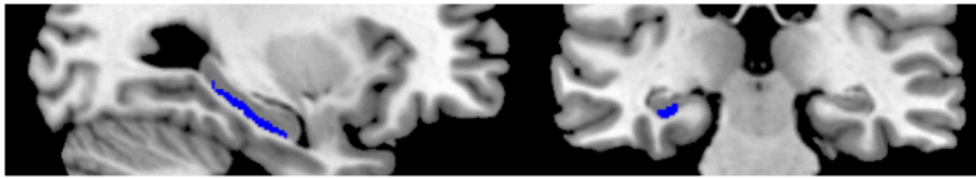
coordenadas MNI: 0 -63 33; Figura 90 y Tabla 33). Además, los pacientes con EHM también muestran una disminución de la CF-er entre el *presubiculum* izquierdo y el *precuneus* izquierdo en comparación con los pacientes sin EHM (tamaño del cluster= 28, coordenadas MNI: -6 -51 45; Figura 90 y Tabla 33). En el resto de semillas, la CF-er no muestra diferencias significativas entre los grupos.



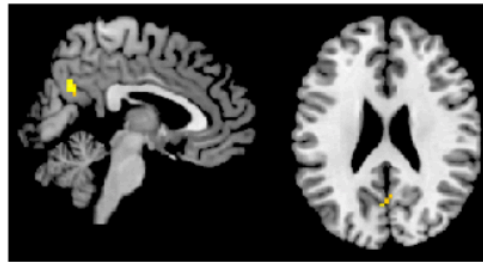
**Figura 89:** Imagen de una muestra en un control sano representando los mapas de conectividad funcional a nivel de voxel (sombreados con color) evocados por cada región del hipocampo de interés (ROI). CA, Cornu Ammonis; GD: Giro Dentado



## ROI SUBICULUM IZQUIERDO



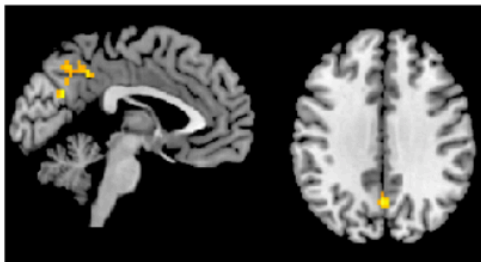
## EHM &lt; CONTROLES



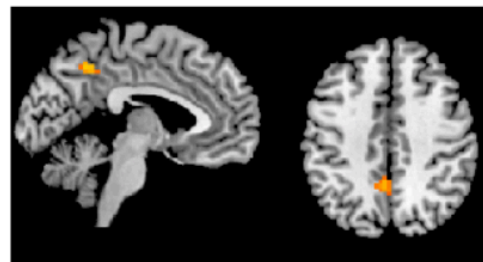
## ROI PRESUBICULUM IZQUIERDO



## EHM &lt; CONTROLES



## EHM &lt; Sin EHM



**Figura 90:** Diferencias significativas en la conectividad funcional en estado de reposo (CF-er) en el *subiculum* y el *presubiculum* entre los grupos utilizando un diseño ANCOVA (incluyendo el sexo como variable). Los resultados se obtienen con una  $p < 0,05$  corregida por cluster FWE por las múltiples comparaciones en combinación con un umbral de  $p < 0,001$  a nivel de vóxel no corregido. ROI: Región de Interés (sombreadas en azul y rojo). Sin EHM y EHM, pacientes sin y con encefalopatía hepática mínima, respectivamente. EHM < Controles: los pacientes con EHM presentan una disminución de la CF-er en el *subiculum* izquierdo y en el *presubiculum* izquierdo con el *precuneus* bilateral en comparación con los controles (sombreado en amarillo). EHM < sin EHM: los pacientes con EHM muestran una disminución de la CF-er entre el *presubiculum* y el *precuneus* izquierdo en comparación con los pacientes sin EHM (sombreado en amarillo).

**TABLA 33:** Diferencias entre los grupos en la conectividad funcional en el estado de reposo de diferentes regiones del hipocampo con el *precuneus*.

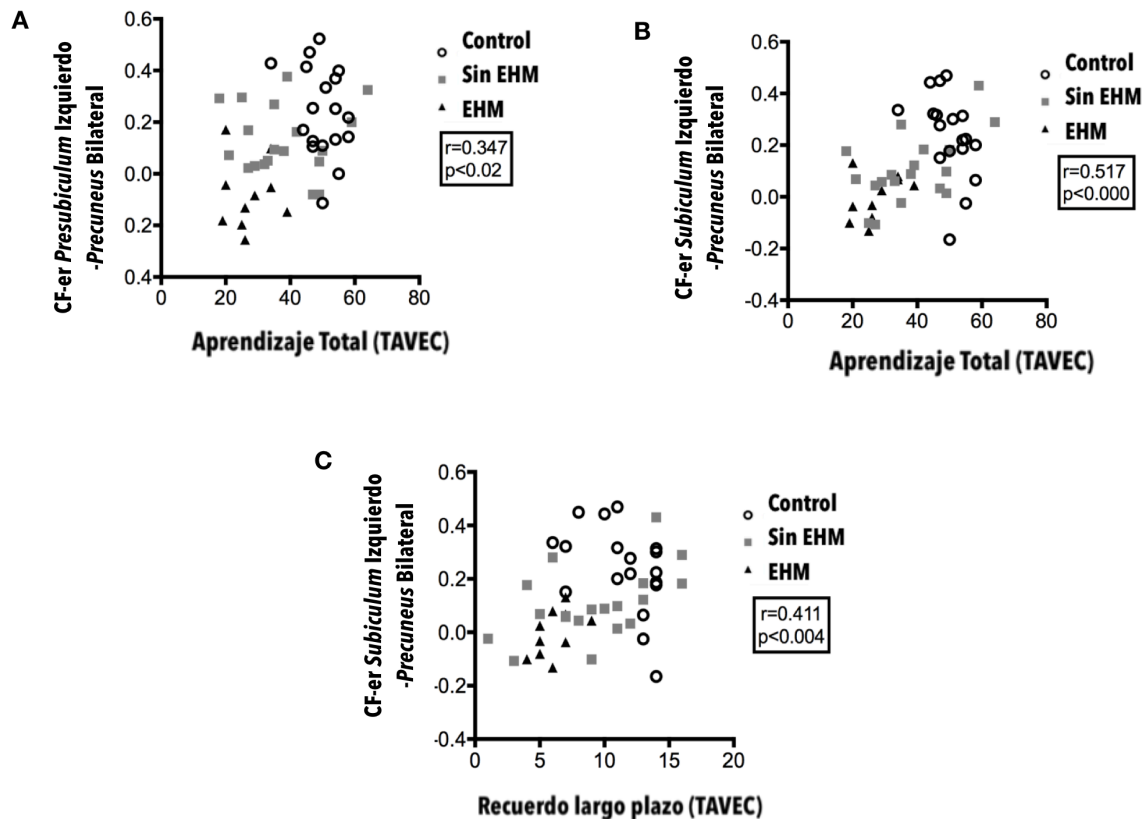
| Conectividad Funcional (CF)                   | Control (n=18) | Sin EHM (n=19) | EHM (n=10)  | Sin EHM vs. control (p) | EHM vs. control (p) | EHM vs. Sin EHM (p) |
|---|----------------|----------------|-------------|-------------------------|---------------------|---------------------|
| <i>EHM &lt; sin EHM</i>                       |                |                |             |                         |                     |                     |
| <b>Presubiculum I<br/>Precuneus I</b>         | 0,10±0,04      | 0,13±0,04      | -0,16±0,05  | 1,00                    | <b>0,001</b>        | <b>&lt;0,001</b>    |
| <i>EHM &lt; controles</i>                     |                |                |             |                         |                     |                     |
| <b>Subiculum-bilateral<br/>Precuneus I</b>    | 0,24±0,04      | 0,10±0,03      | -0,004±0,03 | <b>0,005</b>            | <b>&lt;0,001</b>    | 0,068               |
| <b>Presubiculum-bilateral<br/>Precuneus I</b> | 0,24±0,04      | 0,13±0,03      | -0,083±0,04 | 0,116                   | <b>&lt;0,001</b>    | <b>0,003</b>        |

Los valores de conectividad funcional se expresan como la media  $\pm$  MEE de los *eigenvalues* obtenidos en cada contraste. Sin EHM y EHM, pacientes sin y con encefalopatía hepática mínima, respectivamente. I, izquierdo.

### ■ Análisis de correlación de la conectividad funcional con la memoria, el deterioro cognitivo y los parámetros bioquímicos

Antes de proceder a los análisis de correlación, se buscaron posibles *outliers* multivariantes utilizando el mismo procedimiento referido en la sección de volúmenes de las subregiones del hipocampo. En este caso, no se encontraron *outliers*.

En toda la muestra de participantes, las correlaciones parciales con el sexo como covariable revelaron que la CF-er en las semillas *subiculum* y *presubiculum* se correlacionan con el aprendizaje y la memoria a largo plazo evaluados con el TAVEC. Además, el aprendizaje total en el TAVEC se correlaciona significativamente con la CF-er entre el *presubiculum* izquierdo y el *precuneus* bilateral ( $r=0,347$ ,  $p<0,02$ ; Figura 91A) y la CF-er entre el *subiculum* izquierdo y *precuneus* bilateral ( $r=0,536$ ,  $p<0,001$ ; Figura 91B). Por otro lado, el recuerdo a largo plazo en el TAVEC también correlaciona significativamente con la CF-er entre el *subiculum* izquierdo y el *precuneus* bilateral ( $r=0,411$ ,  $p<0,004$ ; Figura 91C) y una clara tendencia hacia la significación estadística se encuentra cuando consideramos la CF-er entre el *presubiculum* izquierdo y el *precuneus* bilateral ( $r=0,254$ ,  $p=0,09$ ) y entre el *presubiculum* izquierdo y el *precuneus* izquierdo ( $r=0,254$ ,  $p<0,08$ ). El signo y la dirección de estas correlaciones indican que cuanto mayor es la conectividad funcional en las regiones *subiculum/presubiculum* mejor es la realización de los subtest del TAVEC. Además, como se puede apreciar en la Figura 66, las diferencias entre los subgrupos de participantes se ordenan (control>sin EHM>EHM) en estos espacios bivariados (Figura 91 y Tabla 34).



**Figura 91:** Correlaciones entre los parámetros Test de Aprendizaje España Complutense (TAVEC) y la conectividad funcional en estado de reposo (CF-er) en controles, pacientes sin encefalopatía hepática mínima sin (EHM) y con EHM. A) Correlaciones positivas entre el aprendizaje total en el TAVEC y la CF-er entre el *presubiculum* izquierdo izquierdo y el *precuneus* bilateral.; B) Correlaciones positivas entre el aprendizaje total en el TAVEC y la CF entre el *subiculum* izquierdo y el *precuneus* bilateral; C) Correlaciones positivas entre el recuerdo a largo plazo en el TAVEC y la CF entre el *subiculum* izquierdo y el *precuneus* bilateral. TAVEC, Test de Aprendizaje Verbal España Complutense.

En un segundo paso, buscamos si había diferencias significativas en las correlaciones intra-grupo entre la CF-er de estas tres semillas del hipocampo y el aprendizaje y memoria a largo plazo en el TAVEC. Solo se encuentra una correlación significativa intra-grupo entre el *subiculum* izquierdo y el *precuneus* bilateral. Más concretamente, observamos que la CF-er en esta semilla correlaciona directamente y significativamente con el aprendizaje total en el TAVEC en el grupo de sin EHM ( $r=0,523$ ,  $p<0,03$ ) (Tabla 34).

De forma similar, la CF-er entre el *subiculum* izquierdo y el *precuneus* bilateral correlaciona directamente con el recuerdo a largo plazo en el TAVEC en el grupo de sin EHM ( $r=0,476$ ,  $p<0,05$ ). Se encuentra una relación similar para el grupo de EHM ( $r= 0,564$ ,  $p<0,113$ ), lo que de acuerdo con nuestros cálculos de potencia podría alcanzar la significación estadística si el número de participantes en este grupo hubiera sido mayor (Tabla 34).

Además, en toda la muestra de participantes, la CF-er en estas tres semillas del hipocampo se correlacionan con la puntuación del PHES, indicando una asociación entre el deterioro cognitivo y la pérdida de CF-er en estas regiones (Tabla 34).

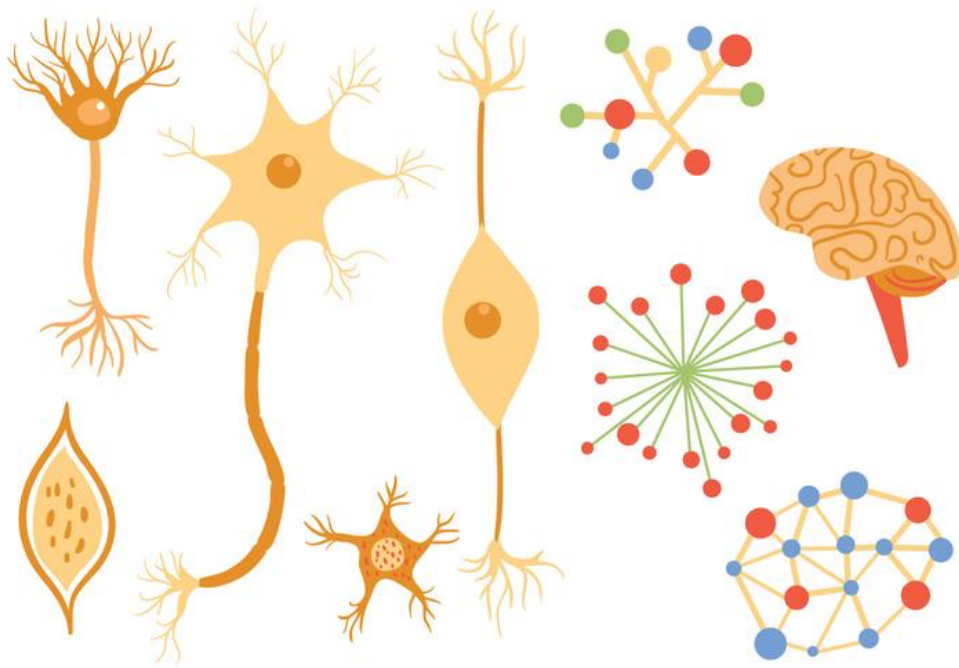
Las correlaciones de la CF-er con las variables bioquímicas en toda la muestra de participantes muestran correlaciones inversas entre la CF-er en el *subiculum* izquierdo y el *precuneus* bilateral con los niveles sanguíneos de GMPc ( $r=-0,318$ ,  $p<0,03$ ) e IL6 ( $r=-0,434$ ,  $p<0,003$ ) y entre la CF-er en el *presibiculum* izquierdo y el *precuneus* bilateral con la IL-6 ( $r=-0,342$ ,  $p<0,02$ ). No se encuentran correlaciones significativas intra-grupo entre la CF-er y las variables bioquímicas. También encontramos una correlación significativa entre la CF-er del *subiculum* izquierdo y el *precuneus* bilateral con el volumen de la fimbria derecha en todo el grupo de participantes ( $r=0,324$ ,  $p<0,028$ ).

**TABLA 34:** Correlaciones entre la conectividad funcional de las zonas del hipocampo elegidas como semillas y la capacidad para realizar los test psicométricos.

|  |              | Diferencias CF-er<br>EHM < sin EHM               | Diferencias CF-er<br>EHM < Controles                |  |
|--|--------------|--|---|--|
|  |              | I Presibiculum-I Precuneus                       | I Subiculum-bilateral PC                            | I Presibiculum-bilateral PC                      |
| <b>PHES</b>                              | <b>Todos</b> | <b><math>r=0.438</math> <math>p=0.002</math></b> | <b><math>r=0.415</math> <math>p=0.004</math></b>    | <b><math>r=0.458</math> <math>p=0.001</math></b> |
|  | Controles    | ns   | ns  | ns   |
|  | Sin EHM      | ns   | <b>ns</b>   | ns   |
|  | EHM          | ns   | <b>ns</b>   | ns   |
| <b>Aprendizaje<br/>Total (TAVEC)</b>     | <b>Todos</b> | $r=0.210$ $p=0.161$                              | <b><math>r=0.517</math> <math>p&lt;0.001</math></b> | <b><math>r=0.347</math> <math>p=0.018</math></b> |
|  | Controles    | ns   | <b>ns</b>   | ns   |
|  | Sin EHM      | ns   | <b><math>r=0.523</math> <math>p=0.026</math></b>    | ns   |
|  | EHM          | ns   | ns  | ns   |
| <b>Memoria a largo<br/>plazo (TAVEC)</b> | <b>Todos</b> | $r=0.254$ $p=0.088$                              | <b><math>r=0.411</math> <math>p=0.004</math></b>    | $r=0.248$ $p=0.096$                              |
|  | Controles    | ns   | <b>ns</b>   | ns   |
|  | Sin EHM      | ns   | <b><math>r=0.475</math> <math>p=0.046</math></b>    | ns   |
|  | EHM          | ns   | $r=0.564$ $p=0.113$                                 | ns   |
| <b>Reconocimiento<br/>(TAVEC)</b>        | <b>Todos</b> | ns   | ns  | ns   |
|  | Controles    | ns   | <b>ns</b>   | ns   |
|  | Sin EHM      | ns   | <b>ns</b>   | ns   |
|  | EHM          | ns   | $r=0.657$ $p=0.05$                                  | ns   |

Los datos muestran los valores de las correlaciones parciales ajustados por sexo. TAVEC, Test de Aprendizaje Verbal España Complutense. C CF-er, conectividad funcional; sin EHM y con EHM, pacientes sin y con encefalopatía hepática mínima, respectivamente; PC, precuneus; ns, no significativo. Las correlaciones significativas ( $p<0,05$ ) están remarcadas en negrita.

# 5. DISCUSIÓN



## 5.1 MMN EN HIPERAMONEMIA CRÓNICA. EFECTO TERAPÉUTICO DEL IBUPROFENO

La medición de potenciales relacionados con eventos (PRE) mediante registros electroencefalográficos permite cuantificar procesos neuronales asociados con eventos sensoriales o cognitivos. *Mismatch negativity* (MMN) es un potencial relacionado con eventos auditivos que se produce cuando una secuencia de sonidos estándar repetida en el tiempo se ve interrumpida por un estímulo nuevo o extraño que se presenta con una menor frecuencia. Tradicionalmente se ha representado y medido como la onda diferencia obtenida al restar el potencial evocado por el sonido estándar al producido por el sonido extraño (Näätänen et al., 1978).

Las percepciones son el producto de reconocer las causas de la entrada sensorial, es decir, el cerebro infiere cual es la causa más probable de una sensación a partir de predicciones o modelos que forma a partir de la experiencia. Los mecanismos subyacentes a este proceso se basan en el aprendizaje perceptivo bajo una codificación predictiva (Baldeweg et al., 2006; Friston et al., 2005). Así, los niveles corticales superiores de procesamiento sensorial envían predicciones a los niveles inferiores para suprimir cualquier actividad neuronal ascendente provocada por estímulos sensoriales que puedan anticiparse. Los niveles inferiores envían errores de predicción a estaciones más altas cuando las predicciones fallan. El objetivo principal de la inferencia perceptiva y el aprendizaje perceptivo es minimizar el gasto de energía que se produce durante el procesamiento sensorial. Cada vez está más aceptado por la comunidad científica que la respuesta MMN es en realidad una señal de error en la predicción. Por otra parte, si pensamos en el sentido evolutivo de la respuesta MMN, la capacidad de generar una respuesta cerebral diferente frente un sonido extraño es una herramienta de supervivencia, ya que vivir o morir en un ambiente hostil, depende esencialmente de la detección y de la entrada en la conciencia de determinados sonidos, como el ruido de una rama que se rompe al ser pisada por un depredador en medio de una jungla ruidosa. Es por ello que esta respuesta se ha reportado en muchas otras especies además de la humana.

La alteración de la respuesta MMN se ha descrito en numerosos trastornos neuropsiquiátricos: Alzheimer, autismo, esquizofrenia (Näätänen et al., 2012), dislexia (Kujala y Näätänen et al., 2001), esclerosis múltiple (Jung et al., 2006), etc. Nuestro laboratorio demostró alteraciones en la respuesta MMN en pacientes con EHM, en concreto una disminución del área bajo la curva del potencial que se correlacionaba con un déficit de atención evaluado con test psicométricos adecuados (Felipo et al., 2012).

La respuesta MMN es un proceso neurofisiológico más que comportamental, por lo que ofrece una oportunidad para su traducción simple en modelos animales, permitiendo un estudio más profundo de mecanismos neurobiológicos que no pueden analizarse en humanos. Distintos estudios han demostrado que el cerebro de distintos mamíferos,

incluido el de las ratas, es capaz de generar respuestas de detección al cambio auditivo que satisfacen los criterios de la respuesta MMN en humanos (Harms et al., 2014).

En esta tesis nos propusimos validar la medición del potencial MMN en el modelo de rata con HA crónica mediante registros electroencefalográficos para profundizar en los mecanismos patológicos subyacentes a la alteración del potencial en la EHM y evaluar posibles tratamientos terapéuticos. Para ello diseñamos e implementamos un sistema para registrar las respuestas MMN en ratas basado en el sistema que se utiliza en clínica en los pacientes con EHM en el Hospital Arnau de Villanova de Valencia. Este sistema permite estudiar los cambios que se producen en la onda en cuanto a su amplitud y área bajo la curva. Pero además, el registro de la respuesta MMN en modelos animales nos permitió el uso de electrodos intracraneales y por tanto estudiar en profundidad la electrofisiología de diferentes áreas específicas que no se pueden estudiar en humanos, en los que se utilizan electrodos a lo largo del cuero cabelludo y solo permiten registrar actividad neuronal en corteza. En base al aumento jerárquico en el procesamiento auditivo a lo largo de la corteza auditiva, decidimos estudiar además de la vía auditiva (colículo inferior y corteza auditiva primaria), el hipocampo y corteza prelímbica como áreas de procesamiento superior. Hipotetizamos que las ratas con HA presentarían una respuesta MMN alterada en alguna o algunas de estas cuatro áreas.

Debido a la importante sinergia existente entre la hiperamonemia y la inflamación en el desarrollo de las alteraciones neurológicas presentes en la EH (Shawcross et al., 2004 y Felipo et al., 2012) instauramos un tratamiento crónico en nuestras ratas con el anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) Ibuprofeno. En nuestro laboratorio ya se ha demostrado que el Ibuprofeno reduce la activación de la microglía y la neuroinflamación inducida por la hiperamonemia en modelos de EHM y que con ello se revierte la alteración motora y el déficit de aprendizaje de tareas de discriminación condicionada (Rodrigo et al., 2010). En esta tesis utilizamos el Ibuprofeno en el modelo de HA crónica para comprobar si se revertían las alteraciones en la onda y así estudiar la implicación de la hiperamonemia y la inflamación en dichas alteraciones. El Ibuprofeno inhibe la síntesis y liberación de prostaglandinas (PG) a nivel periférico y central por inhibición de la ciclooxigenasa 1 y 2 (COX1 y COX2), las cuales catalizan la producción de PG por la vía del ácido araquidónico. Las PGs realizan tanto funciones relacionadas con la homeostasis de diversos órganos como con el dolor y la inflamación. Se ha demostrado la expresión de PGs en muchas regiones del cerebro y se piensa que el origen celular cerebral de estas moléculas es la astrogliosis (Seregi et al., 1987) pero también las neuronas (Lerea et al., 1997). Tanto la COX1 como la COX2 son inhibidas por los AINEs comerciales (Mitchell et al., 1993; Laneuvill et al., 1994; Gierse et al., 1995). La isoforma COX1 se expresa de forma constitutiva pero la expresión de COX2 se induce por citoquinas inflamatorias ó la exposición a lipolisacárido (Masferrer et al., 1994; Seibert et al., 1994). Los efectos anti-inflamatorios de los AINE se han asociado con la inhibición de la COX2 (Masferrer et al., 1994; Seibert et al., 1994). En cerebro de rata se ha localizado la expresión de COX2 en



neuronas del prosencéfalo, concretamente en neocorteza, hipocampo, amígdala y corteza límbica (Yamagata et al., 1993; Kaufmann et al., 1996).

### ■ **Alteración de la respuesta MMN en ratas con hiperamonemia crónica. Aumento jerárquico del procesamiento auditivo y papel del hipocampo**

El modelo de HA crónica reproduce las alteraciones de la respuesta MMN encontradas en los pacientes con EHM produciendo en el hipocampo una disminución del área bajo la curva del potencial y además una disminución en la amplitud del pico máximo que no se observó en el estudio realizado en los pacientes. La amplitud del potencial evocado representa la suma de respuesta máxima de todas las neuronas que responden al mismo tiempo. El área representa la respuesta acumulada de todas las neuronas desde el principio de la onda hasta el retorno a niveles basales. Por lo tanto, la disminución de la amplitud y del área bajo la curva del potencial MMN en ratas con HA crónica podría estar reflejando una disminución en la coordinación de la respuesta de las neuronas y la activación de un menor número de neuronas y durante periodos más cortos, respectivamente.

De las cuatro áreas utilizadas en el estudio, sólo la región CA1 del hipocampo fue afectada y curiosamente esta fue el área que presentaba una mayor respuesta MMN. En controles además, se observó un aumento de la respuesta MMN desde CIC a CA1. Una respuesta mayor en CA1 respecto al resto de las áreas y el aumento de la respuesta desde niveles inferiores a superiores podría estar reflejando una jerarquía en el procesamiento auditivo, siendo la región CA1 una región de orden superior en comparación con las de los niveles inferiores. Garrido et al., (2009) utilizando modelos de dinámica causal demostraron una jerarquía en la codificación predictiva entre la corteza auditiva y las áreas temporales y frontales. La jerarquía en el procesamiento de la detección de cambios a lo largo de la vía auditiva también se ha demostrado en roedores. Parra y Diego-Nieto et al., (2017) mediante registros neuronales unitarios y de potencial de campo local demostraron un aumento en la detección del cambio auditivo medido como un aumento en la señal de error en la predicción desde el colículo inferior, al tálamo y a la corteza auditiva. Además, el aumento dentro de cada nivel se produjo desde las divisiones de orden inferior (vía lemniscal) a las superiores (vía no lemniscal), demostrando que los niveles jerárquicamente superiores son más sensibles a los cambios acústicos y las influencias contextuales. Esta jerarquía ascendente del procesamiento auditivo también se ha demostrado en la corteza frontal y temporal en humanos (Dürschmid et al., 2016). En este estudio se demostró que la actividad de la corteza prefrontal tiene un orden de procesamiento superior al distinguir el grado de predictibilidad del sonido extraño, ya que en los electrodos frontales la respuesta a los sonidos extraños no predecibles fue grande y apenas hubo respuesta para los cambios predecibles.



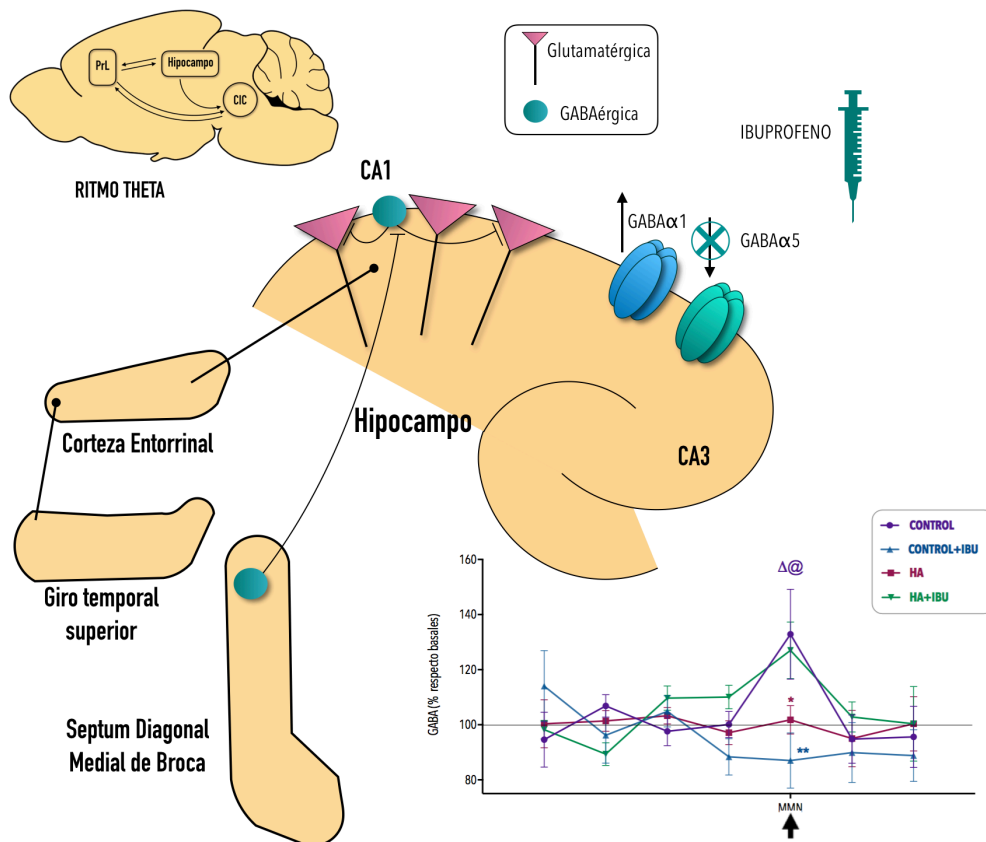
Estudios en ratón han demostrado que la respuesta MMN en el hipocampo es reflejo del procesamiento sensorial frente a la desviación de patrones regulares y que depende de la formación de memoria sensorial (Kurkela et al., 2018). La respuesta MMN en humanos registrada en electrodos temporales se asocia con la codificación de las características físicas de los estímulos y el mantenimiento de la memoria sensorial (Giard et al., 1990; Näätänen et al., 1992 y 1995; Jääskeläinen et al., 1990). Nuestros resultados demuestran la importante implicación del hipocampo y de su función de memoria en el procesamiento sensorial de cambios auditivos. En el estudio de MMN realizado por nuestro laboratorio en pacientes con EHM (Felipo et al., 2012) se utilizaron electrodos frontales, ya que se quiso estudiar la relación entre la alteración de la onda con la alteración en la atención en estos pacientes y las zonas frontales han sido tradicionalmente clasificadas como áreas responsables de la atención. Sería interesante comprobar mediante otras técnicas, como la RM funcional, si existe una alteración en la respuesta en los pacientes con EHM en el hipocampo y ver si se reproducen las mismas alteraciones encontradas en CA1 de ratas con HA crónica.

#### ■ **Disminución de la respuesta en CA1 del hipocampo en hiperamonemia. Implicaciones de la neurotransmisión GABAérgica**

El sistema GABAérgico es el principal sistema de neurotransmisión inhibitor del cerebro de mamíferos. Que el aumento de la neurotransmisión inhibitor mediada por GABA podría contribuir a las manifestaciones de la EH se sugirió por primera vez tras el hallazgo de patrones anormales de potenciales evocados visuales en un modelo de fallo hepático agudo en conejo cuyos potenciales evocados se asemejaban a los inducidos en los animales control mediante la administración de fármacos que actuaban potenciando el tono GABAérgico, como las benzodiazepinas (Schafer y Jones, 1982; Schafer et al., 1984). El estado funcional de este complejo inhibitor se siguió estudiado extensamente en modelos de EH, apoyando la idea de que el aumento de la neurotransmisión inhibitor tiene un papel importante en las manifestaciones clínicas de la EH. Así por ejemplo, se ha demostrado en ratas con EH el aumento neuronal de la síntesis de GABA y que este aumento es estimulado por el amonio a través de la inducción de diferentes vías, entre ellas la del ciclo del ácido tricarbóxico (Leke et al., 2011). También se ha demostrado que las ratas con HA crónica tienen el tono GABAérgico aumentado debido a la activación tónica del receptor GABA $\alpha$  en el cerebelo pero reducido en la corteza (Cauli et al., 2009). El aumento del tono GABAérgico en el cerebelo se ha asociado con el deterioro cognitivo y las alteraciones motoras que presentan las ratas y se ha demostrado que este aumento es debido al aumento de la expresión en membrana de GAT-3 producido por la neuroinflamación (Hernández-Rabaza et al., 2016; Cabrera-Pastor et al., 2018).

Los estudios del efecto de compuestos GABAérgicos exógenos o endógenos sobre la respuesta MMN no son muy consistentes (Rosburg et al., 2004; Smolnik et al., 1998; Kasai

et al., 2002). Un estudio realizado por Rowland et al., (2016) en pacientes con esquizofrenia demostró que mayores niveles de GABA en el cíngulo anterior se asociaban con mayores amplitudes de MMN. En esta tesis hemos demostrado el papel del sistema GABAérgico del hipocampo en la generación de una respuesta MMN adecuada y su alteración con la HA crónica. Durante la respuesta MMN en el hipocampo de ratas control se produce un aumento de los niveles de GABA extracelular que no se producen en las ratas con HA crónica. La reversión con Ibuprofeno de las alteraciones en la amplitud del pico máximo y el área bajo la curva del MMN encontradas en CA1 de ratas hiperamonémicas viene acompañada de una recuperación del aumento de GABA extracelular durante la respuesta MMN en la misma área.



**Figura 92:** Implicaciones de la alteración del sistema GABAérgico del hipocampo en la disminución de la respuesta MMN en ratas con HA crónica. En la actividad theta del hipocampo participan interneuronas GABAérgicas de CA1 y proyecciones GABAérgicas procedentes del septum diagonal medial de Broca. La corteza entorrinal recibe aferencias auditivas del giro temporal superior y también participa en el ritmo theta. La alteración de este conjunto de sistemas generadores de actividad theta puede estar alterando los niveles de GABA en el hipocampo durante la respuesta MMN. Además la respuesta MMN puede verse afectada también por la alteración en la expresión de la subunidad alpha-5. Estas alteraciones, junto con la reducción de la respuesta MMN en el hipocampo, revierten con el tratamiento con Ibuprofeno.

El aumento de GABA extracelular en el hipocampo durante el MMN puede proceder de proyecciones inhibitorias de largo alcance procedentes de otras áreas o de las propias interneuronas locales encargadas de la regulación de la actividad del hipocampo mediante retroalimentaciones inhibitorias. Tanto las neuronas de larga proyección como las interneuronas contribuyen a la generación de diferentes ritmos cerebrales (Kullman et al., 2011). La actividad theta es característica de la actividad del hipocampo (Buzsáki, 2002) y en controles la comunicación durante la estimulación auditiva del CA1 con CIC y PrL ocurre a través de actividades con frecuencias en la banda theta. La mayor parte de las oscilaciones theta del hipocampo provienen de la banda diagonal de Broca (MS-DBB, *medial septum-diagonal band of Broca*) (Buzsáki, 2002) que contiene entre otras, proyecciones neurales GABAérgicas. Las neuronas GABAérgicas del MS-DBB proyectan sobre interneuronas del hipocampo (Freund et al., 1988) y se piensa que marcan el ritmo theta a través de desinhibiciones periódicas de las células piramidales (Robinson et al., 2016). También se ha demostrado la contribución de la corteza entorrinal en la ritmicidad theta, ya que las lesiones en esta región disminuyen el ritmo theta en todo el hipocampo (Bragin et al., 1995). Por otro lado, la corteza entorrinal recibe información auditiva a través del giro temporal superior, donde se encuentra la corteza auditiva primaria (Muñoz-López et al., 2010). En la región CA1 del hipocampo hay interneuronas GABAérgicas que proyectan a las dendritas apicales de las neuronas piramidales y estas neuronas también se han relacionado con el ritmo theta (Gloveli et al., 2005), sin embargo debido a las fuertes influencias del MS-DBB y de la corteza entorrinal se piensa que tienen un papel de amplificación de la señal en función de las señales extrínsecas que reciben (resonador) más que de un papel como marcapasos (Kullman et al., 2011). No se ha descrito la implicación de las neuronas septales GABAérgicas en la ritmicidad theta del hipocampo durante el procesamiento auditivo, pero podríamos hipotetizar que las alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica sobre las interneuronas del hipocampo o la alteración de las propias interneuronas GABAérgicas, que conllevaría la alteración de la regulación inhibitoria de las neuronas piramidales, o alteraciones en la modulación de la corteza entorrinal podrían ser alguno de los mecanismos responsables de la alteración en los niveles de GABA en el hipocampo durante el procesamiento auditivo en ratas con HA crónica. En concordancia con esto, en modelos animales de EH se han demostrado alteraciones estructurales en la corteza entorrinal producidas por la HA (Insausti et al., 1997), por lo que las alteraciones estructurales del sistema del hipocampo también podrían estar implicadas, o al menos en parte, en la alteración de los niveles de GABA en el hipocampo y de las alteraciones en la respuesta MMN subyacentes (Figura 92).

Se ha propuesto que las alteraciones en la respuesta MMN son reflejo de déficits en la memoria de trabajo auditiva y las vías GABAérgicas son esenciales para la regulación de los mecanismos implicados en la memoria de trabajo (Barch y Ceaser, 2012; Lewis y Moghaddam, 2006). En concordancia con esto, resultados de nuestro laboratorio sin publicar han demostrado la alteración de la memoria de trabajo en ratas con HA crónica y la mejora de esta alteración con el uso del antagonista GABAérgico bicuculina, evidenciando la relación entre la alteración del sistema GABAérgico y la alteración de la

memoria de trabajo en estos animales. A la alteración de la memoria de trabajo puede contribuir la alteración en la expresión en membrana de receptores de GABA y glutamato (ver siguiente apartado) y en esta tesis hemos demostrado la disminución de la expresión en membrana de la subunidad alpha-5 del receptor GABA<sub>A</sub> en hipocampo de ratas con HA crónica y su reversión con el tratamiento con Ibuprofeno, asociada a la recuperación de la respuesta MMN en la misma área (Figura 73). Las ratas con HA crónica también muestran un aumento en la expresión en membrana de la subunidad alpha-1 del receptor GABA<sub>A</sub> en el hipocampo, sin embargo el tratamiento con Ibuprofeno no normaliza su expresión en membrana. Se ha demostrado el papel de las subunidades alpha-1 y alpha-5 en la memoria mediante el uso de agonistas selectivos (Savic et al., 2009), por lo que la alteración en su expresión podría estar alterando el sistema de memoria de trabajo necesario para la generación de respuestas MMN. Sin embargo la no reversión de la expresión en membrana de la subunidad alpha-1 junto con la recuperación en la respuesta MMN sugiere que la alteración de esta subunidad no está implicada en la alteración de la respuesta MMN en ratas con HA crónica (Figura 92).

El tratamiento con Ibuprofeno restaura tanto la liberación de GABA durante la respuesta MMN como la expresión en membrana del receptor GABA alpha 5 en hipocampo de ratas con HA crónica. En nuestro laboratorio ya se había evidenciado la asociación entre la hiperamonemia, la neuroinflamación, la alteración de la neurotransmisión GABAérgica y la alteración de la memoria espacial a través de la alteración de la expresión de receptores GABA (Hernández-Rabaza et al., 2016). Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran la alteración de la respuesta MMN (memoria de trabajo) asociada a la alteración de la neurotransmisión GABAérgica en el hipocampo, y una vez más el papel de la neuroinflamación en las alteraciones de la EHM, ya que dichas alteraciones revierten con un tratamiento anti-inflamatorio.

#### ■ Implicaciones de la alteración de la neurotransmisión glutamatérgica en la disminución de la respuesta MMN en el hipocampo en hiperamonemia

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en cerebro de mamíferos. Cuando se produce un fallo hepático el aumento de las concentraciones de amonio en el cerebro promueven la síntesis de glutamina a partir del glutamato en una reacción catalizada por la glutamina sintetasa (Butterworth, 1996; Norenberg, 1996). Por otro lado, el amonio disminuye la recaptación de glutamato por los astrocitos y las neuronas (Norenberg et al., 1997; Oppong et al., 1995). Esto hace que aumenten los niveles de glutamato extracelular en el cerebro (Bosman et al., 1990; Hilgier et al., 1999). Se piensa que el aumento en la hendidura sináptica de los niveles de glutamato activa mecanismos compensatorios que producen cambios en la expresión de los receptores de glutamato.

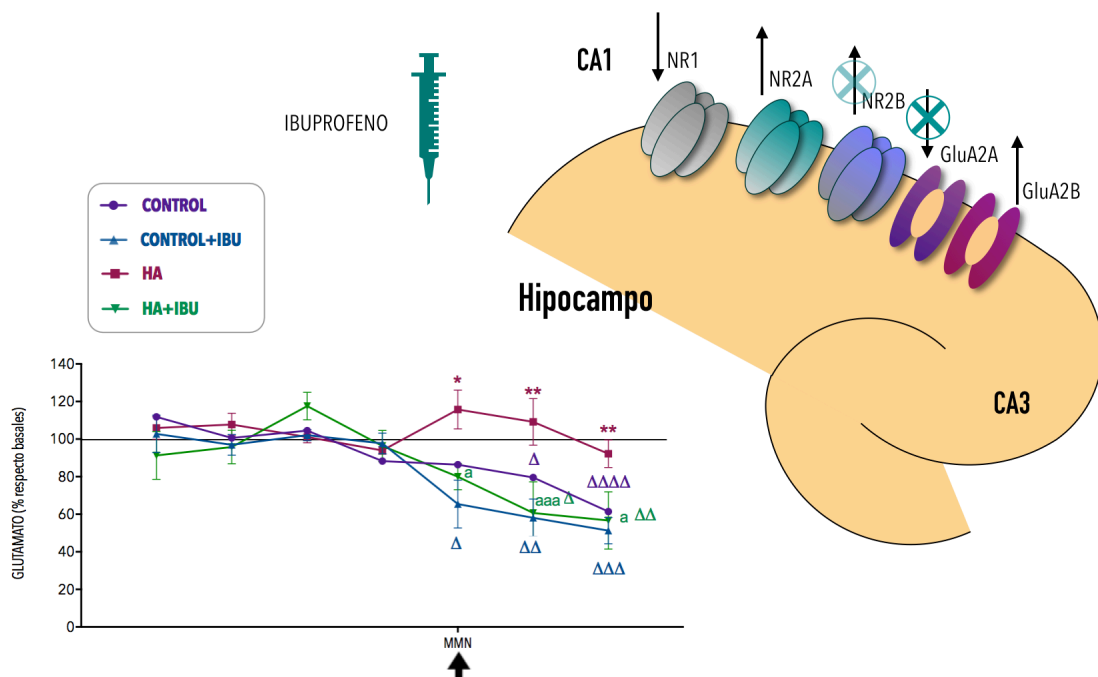
Algunos autores proponen que la respuesta MMN se podría considerar un indicador biológico de la neurotransmisión glutamatérgica (Nagai et al., 2017), ya que los mecanismos moleculares subyacentes a su generación dependen fuertemente de receptores glutamatérgicos del tipo NMDA (Javitt et al., 1996; Umbricht et al., 2002; Shiramatsu et al., 2013). El error en la predicción que causa el MMN desencadena el subsiguiente ajustamiento del modelo de codificación predictiva a través de la inducción de plasticidad asociativa produciendo cambios en la fuerza de conexión (Garrido et al 2009). La plasticidad asociativa se ha sugerido que ocurre a través de receptores NMDA (Verhoog et al., 2013). De hecho la inyección de antagonistas de receptores NMDA en monos inhibe la generación de la respuesta MMN en A1 (corteza auditiva primaria) sin alterar la generación de los componentes de los potenciales evocados exógenos y de paso obligatorio (Javitt et al., 1996). En ratas también se ha demostrado el papel de los receptores NMDA, ya que se ha observado un bloqueo dosis dependiente de la respuesta MMN con el antagonista MK-801 (Tikhonravov et al., 2008). Por otro lado, también se ha demostrado la participación de los receptores frontales de tipo GluN2B en los procesos de detección del cambio en roedores mediante la utilización de antagonistas selectivos (Sivarao et al., 2014).

En esta tesis se ha demostrado la desregulación de la neurotransmisión glutamatérgica a través de la alteración en la expresión en membrana de receptores de glutamato en hipocampo de ratas con HA crónica, en concreto hemos demostrado que la HA crónica produce una disminución de la expresión en membrana de la subunidad NR1 del receptor NMDA y GluA2 del receptor AMPA. Por otro lado, la HA aumenta la expresión en membrana de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA y GluA1 del receptor AMPA (Figura 93). La alteración de la neurotransmisión glutamatérgica en modelos de EHM a través de la alteración de la expresión en membrana de este tipo de receptores ya se había documentado ampliamente en nuestro laboratorio. Cabrera-Pastor et al., (2017) demostraron la alteración de la expresión en membrana en hipocampo de ratas con HA crónica de GluA1 y GluA2 como consecuencia del aumento de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  y de la activación de su receptor IL-1R (Taoro-González et al., 2018). Además demostraron que estas alteraciones se asociaban a la alteración de la memoria espacial. En esta tesis también hemos demostrado una asociación entre la alteración de la memoria de trabajo en HA crónica, como alteración en la respuesta MMN, y la alteración de la expresión en membrana de receptores de glutamato en hipocampo. También hemos comprobado la implicación de la neuroinflamación en estos procesos, ya que revierten con el tratamiento con un anti-inflamatorio. El tratamiento con Ibuprofeno, que produce un aumento de la respuesta MMN en el hipocampo de ratas con HA, revierte únicamente la alteración en la expresión de la subunidad NR2B y GluA2, indicando que la alteración de la expresión del resto de subunidades no tiene porque estar ligada a la alteración de la respuesta MMN.

También hemos demostrado una desregulación en los niveles extracelulares del neurotransmisor glutamato en hipocampo durante la generación de la respuesta MMN en

ratas con HA crónica y la asociación de esta alteración con la inflamación, ya que también revierte con el tratamiento con Ibuprofeno. Las ratas control muestran una disminución en hipocampo de los niveles de glutamato durante la respuesta MMN que no se produce en las ratas con HA. Estos resultados podrían parecer contradictorios con los obtenidos en un estudio realizado por Rowland et al., (2016) en el que demostraron mediante RM y espectroscopía de masas que los pacientes con esquizofrenia presentaban una menor amplitud en la respuesta MMN y niveles de glutamato significativamente inferiores en la corteza cingulada anterior. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la RM analiza la concentración de glutamato total en tejido, no la extracelular, que es la única relevante en la neurotransmisión. Además, las mediciones del neurotransmisor se realizaron en regiones cerebrales diferentes al hipocampo por lo que no tienen que modularse del mismo modo.

Además, el amonio (1 mM) disminuye la respuesta electrofisiológica de los receptores de glutamato postsinápticos (Fan et al., 1990; Lombardi et al., 1994; Marcaida et al., 1995), un fenómeno que también contribuye con la disminución de la neurotransmisión excitatoria y podría explicar la menor respuesta en hipocampo de ratas con HA a pesar de tener mayores niveles de glutamato extracelulares.



**Figura 93:** Implicaciones de la alteración de la neurotransmisión glutamatérgica del hipocampo en la disminución de la respuesta MMN en ratas con HA crónica. La respuesta MMN produce en el hipocampo de ratas control una disminución de los niveles de glutamato extracelular que no se produce en las ratas con HA. La HA también produce alteraciones en la expresión en membrana de las subunidades NR2B y GluA2 de los receptores de glutamato. Estas alteraciones se asocian con la inflamación ya que revierten con el tratamiento con Ibuprofeno y además parecen participar en la alteración de la respuesta MMN ya que con su reversión se produce un aumento de la respuesta.



En relación con la alteración de la neurotransmisión GABAérgica, se ha postulado que los efectos del GABA sobre el MMN podrían estar mediados por mecanismos glutamatérgicos, ya que datos en animales muestran que los efectos de antagonistas GABAérgicos sobre la onda MMN se revierten con antagonistas del NMDA (Javitt et al., 1996). De hecho, las proyecciones excitatorias glutamatérgicas inervan tanto células principales como interneuronas GABAérgicas locales en cada área diana, donde la sinapsis inhibitoria GABAérgica regula la actividad neuronal. Por tanto la alteración simultánea de la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica podría deberse a mecanismos de modulación mutua entre ellas.

### ■ Implicación de la actividad cerebral en el rango de frecuencias de la banda delta en el procesamiento auditivo y en la hiperamonemia crónica

Tradicionalmente, los análisis de potenciales relacionados con eventos (PRE) se han realizado en el dominio del tiempo con el fin de evaluar la amplitud y las latencias de los picos predominantes en fase con el estímulo. Sin embargo, los potenciales evocados no solo reflejan respuestas cerebrales secuenciales a un estímulo de polaridad y latencia fija, sino que también son la expresión de la activación simultánea de redes neuronales que oscilan en diferentes frecuencias y con diferente ubicación espacial (Doege, 2009). Se piensa que las oscilaciones neurales coordinan la actividad cerebral a través de patrones ordenados que optimizan el procesamiento de la información local y facilitan la transmisión de la señal entre regiones (Fries, 2015). El análisis del EEG únicamente en el dominio del tiempo puede ser insuficiente para detectar la activación de diferentes subsistemas. Por el contrario, el análisis en el dominio de la frecuencia revela información adicional significativa que podría ayudar a comprender las alteraciones de la respuesta MMN asociadas a la HA. Una vez comprobado que el modelo de HA crónica reproducía las alteraciones de la onda MMN encontradas en pacientes con EHM, con el fin de avanzar en los mecanismos responsables, analizamos los cambios que se producían en el dominio de la frecuencia de los potenciales evocados y en los registros de potencial de campo local (LFP).

En nuestro estudio no encontramos diferencias en la FD de los PEs por los diferentes sonidos ni en la onda MMN entre las ratas control y las ratas con HA crónica. El análisis de los LFP durante la estimulación auditiva no mostró diferencias en la potencia de las diferentes bandas en controles e HA, por lo que la potencia espectral no estaría reflejando los procesos que alteran la respuesta MMN. Estos resultados podrían equipararse a los encontrados en un estudio realizado por Doege et al., (2009) en esquizofrénicos donde se mostraron diversas alteraciones en el análisis espectral de la componente P300 del potencial relacionado con eventos auditivos, pero no se encontraron diferencias en la potencia espectral entre los sujetos enfermos y los sanos.

El análisis de los LFP durante la estimulación auditiva mostró que tanto en los controles como en las ratas con HA, la mayor potencia se localiza en la banda delta. La actividad delta se ha asociado en clínica con procesos patológicos o de inhibición, y quizá por ello los estudios que relacionan las oscilaciones del EEG con procesos cognitivos se han centrado en las bandas de frecuencia alpha, theta, beta y gamma, excluyendo en cierto modo a la banda delta. De hecho cambios espectrales en la banda de frecuencias gamma alta (>60 Hz) se han descrito ampliamente durante tareas auditivas (Crone et al., 2001; Ray et al., 2008; Cervenka et al., 2013) e incluso durante la desviación auditiva (Edwards et al., 2005). Sin embargo, hay estudios que consideran el ritmo delta es también un ritmo cognitivo (Basar et al., 1999; Schurma et al., 2001). Un hallazgo significativo en este sentido fue la coincidencia de la actividad delta con la componente P300. Se ha demostrado que las oscilaciones delta y theta relacionadas con eventos son los principales contribuyentes de la componente P300 (Demirlap et al., 2001; Stamfer y Basar, 1985; Basar-Eroglu et al., 1992; Karakas et al., 2000; Schürmann et al., 2001). Se ha sugerido también que el aumento de la potencia de las frecuencias delta durante las tareas mentales se asocian con la inhibición de las aferencias sensoriales que interfieren con la concentración interna durante la ejecución de tareas mentales. Estas oscilaciones inhibitorias modularían la actividad de aquellas redes que deberían estar inactivas para realizar la tarea (Harmony, 2013), lo que podría sugerir también la implicación de las oscilaciones delta en la discriminación entre los sonidos irrelevantes (estándar) y los relevantes (extraños) durante el procesamiento de la desviación auditiva a través de la inhibición de los sonidos irrelevantes, es decir, aquellos que se pueden predecir. Nuestros resultados muestran a la banda delta como la predominante durante el procesamiento inconsciente de una desviación auditiva o respuesta MMN en ratas anestesiadas, sin embargo, estudios en los que se ha realizado el análisis espectral de rata anestesiada con hidrato de cloral muestran una predominancia de la banda de 0,1-3 Hz (Sisson y Siegel, 1989) independiente del nivel de anestesia. No podemos discernir pues si la mayor potencia en la banda delta se debe en realidad a la activación de los procesos cognitivos arriba mencionados o al efecto del anestésico. Por otro lado, nuestros resultados muestran a la banda delta como la predominante durante el procesamiento inconsciente de una desviación auditiva o respuesta MMN en ratas anestesiadas, sin embargo, no observamos cambios en la potencia espectral con la HA por lo que la potencia espectral no estaría reflejando los procesos que alteran dicha respuesta.

La potencia espectral en condiciones basales, sin estímulo auditivo, también se centra en la banda delta. En sujetos control se ha demostrado una correlación positiva entre la señal BOLD de resonancia magnética funcional durante el estado de reposo cerebral con la potencia espectral delta (Jaime et al., 2017; Portnova et al., 2017). La mayor potencia en delta en condiciones basales en las ratas sin anestesiar también podría estar reflejando las características del estado cerebral en reposo. Desafortunadamente, no podemos comparar estadísticamente los valores de potencia espectral en estado basal con los de la condición de estimulación y ver si la estimulación produce cambios espectrales en dicha banda, ya que para asegurar la reproducibilidad de la respuesta MMN la rata estaba anestesiada



mientras que durante la adquisición del EEG sin estimulación auditiva no lo estaba. Se ha demostrado la generación del potencial MMN en ratas no anestesiadas (Harms et al., 2014) por lo que una vez conseguida la puesta a punto del modelo de HA, sería interesante repetir los mismos experimentos con ratas en libre movimiento y poder hacer así las comparativas pertinentes.

El tratamiento con Ibuprofeno disminuye la potencia de la banda delta durante la estimulación auditiva en ratas control anestesiadas y en condiciones basales tanto en controles como en ratas con HA crónica. La disminución de la potencia delta tras el tratamiento crónico con Ibuprofeno también se ha documentado en pacientes con enfermedad de Alzheimer, una enfermedad con alto componente inflamatorio (Babiloni et al., 2009) como la EHM. Podríamos especular que los mecanismos neurofisiológico que llevan a esta disminución de la potencia de delta podrían estar relacionados con el papel neuroprotector de los AINEs (Andersen et al., 1995; Anthony et al., 2000; Broe et al., 2000; Stewart et al., 1997; in't Veld et al., 1998; Zandi et al., 2000). El Ibuprofeno modularía la respuesta inflamatoria protegiendo a estructuras del sistema nervioso de múltiples agentes dañinos, como las especies reactivas de oxígeno. De hecho, las dos principales fuentes productoras de especies reactivas de oxígeno son la respiración mitocondrial y la síntesis de PGs (Kaufmann et al., 1997) y el tratamiento con Ibuprofeno estaría inhibiendo su producción. La neuroprotección del Ibuprofeno podría influir indirectamente en los sistemas talamo-corticales y cortico-corticales que producen los ritmos delta (Sarter y Bruno, 2002; Kobayashi y Tadashi, 2000). Además, los cambios en la ritmos cerebrales en las diferentes áreas son consecuencia de cambios en la neurotransmisión, por lo que el Ibuprofeno podría estar modulando la potencia de la banda delta a través de cambios en los niveles de GABA y glutamato y en la expresión en membrana de receptores como hemos evidenciado tanto en controles como en ratas con HA.

### ■ **Conectividad funcional y efectiva: alteración de la coherencia y causalidad en la hiperamonemia crónica**

La especialización e integración funcional constituyen dos principios básicos de la organización cerebral. Mientras diferentes áreas están especializadas en subfunciones particulares, la realización de todas las funciones básicas tanto sensoriales como cognitivas requiere de la integración entre áreas. Es por ello que la comunicación neural requiere coherencia: un grupo de neuronas postsinápticas que reciben "inputs" de diferentes grupos presinápticos responden principalmente al grupo presináptico con el que son coherentes. Es decir, la comunicación selectiva se produce a través de la coherencia selectiva (Fries, 2015). Las medidas de conectividad funcional permiten caracterizar estas interacciones. La conectividad funcional o coherencia se define como las relaciones temporales entre regiones cerebrales distantes, sin referencia de causalidad y la

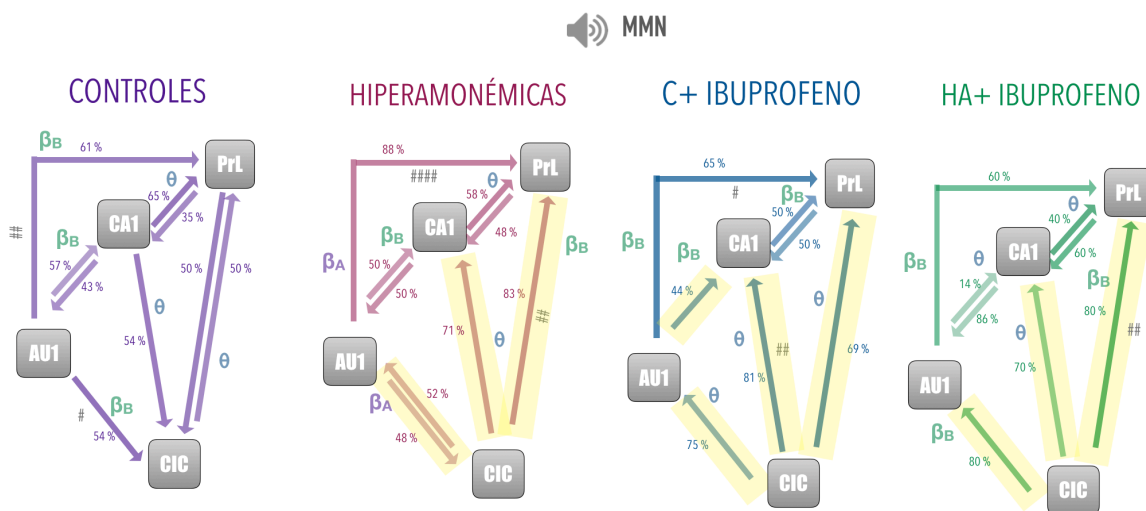
conectividad efectiva obtenida con los algoritmos de causalidad de Granger nos permite saber qué área es responsable de la actividad de otra área (Friston et al, 1994; Astolfi et al., 2004). La sincronización entre las poblaciones neuronales juega un papel importante en el procesamiento de la información en el cerebro (Engel et al. 2001; Li et al. 2007; Schnitzler y Gross 2005; Aviyente et al. 2011) y el estudio de dicha sincronización se ha convertido en una herramienta importante para comprensión de las funciones cerebrales normales (Roelfsema et al., 1997; Steriade et al., 1993; Mizuhara y Yamaguchi, 2007) o patológicas (Uhlhaas, Singer, 2006). Por otro lado, en última instancia, como hemos dicho anteriormente, la alteración en la ritmicidad cerebral entre las diferentes áreas es consecuencia de alteraciones en la neurotransmisión. Una vez demostrada la alteración de la respuesta MMN y su relación con las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica a través de mecanismos inflamatorios quisimos comprobar si estas alteraciones también iban acompañadas de alteraciones en la conectividad funcional y efectiva durante la generación de la respuesta MMN y también en condiciones basales, sin estímulo auditivo.

El análisis de los LFP durante la estimulación auditiva en las ratas con HA muestra cambios respecto a las ratas control en la causalidad y la coherencia entre las distintas áreas y en la FD de estas medidas de sincronización sugiriendo que estos cambios juegan un papel importante en la alteración de la respuesta MMN. Curiosamente, la coherencia y la causalidad entre las diferentes áreas en condiciones basales también fue diferente en controles e HA.

Durante la estimulación auditiva, el aumento de la FD de la coherencia de la banda delta en HA entre AU1-CA1 no se asocia con una disminución de la coherencia entre las áreas. Sin embargo si que observamos una tendencia a tener una menor coherencia entre AU1-PrL y CA1-PrL en HA. La disminución de la coherencia en las frecuencias delta y theta también se ha reportado durante la respuesta P300 en pacientes esquizofrénicos (Doege et al., 2009), pacientes que comparten alteraciones cognitivas con los pacientes con EHM como el déficit de atención (Felipo et al., 2012). Diversos estudios han sugerido que las diversas manifestaciones clínicas en la EH resultan de alteraciones en la sincronización de oscilaciones neuronales. Por ejemplo, se han descrito en varios estudios alteraciones en los procesos oscilatorios cerebrales del sistema motor en estos pacientes (Timmermann et al., 2002, 2003, 2004, 2005, 2008). Timmermann et al., (2003) estudiaron el acoplamiento del electromiograma de los músculos de la mano con las oscilaciones en la corteza motora primaria y encontraron que los pacientes con asterixis tenían un acoplamiento excesivo entre las dos señales a la frecuencia en la que los músculos temblaban cuando levantaban la mano, reflejo de una sincronización tálamo-cortical y corticomuscular alterada. Por tanto, alteraciones en la coherencia entre las distintas áreas que participan en la generación de la respuesta MMN podrían contribuir a los mecanismos responsables de la alteración de la respuesta en ratas con HA crónica. En cuanto al efecto del Ibuprofeno sobre la coherencia entre las diferentes áreas durante la estimulación auditiva en rata

anestesiada observamos que produce una disminución de la coherencia en delta entre AU1-PrL en ratas con HA crónica y tiende a aumentar la coherencia entre CA1-PrL.

El análisis de causalidad durante la estimulación auditiva también mostró diferencias en la FD de la causalidad y la influencia causal entre las diferentes áreas (Figura 94), estando alteradas entre CIC-AU1 y CIC-PrL en la HA. La comunicación entre CIC-AU1 ocurre de forma bidireccional en lugar de ocurrir desde AU1 a CIC. El colículo inferior es una estación importante para la transmisión ascendente de información auditiva al núcleo geniculado medial (MGN) y la corteza temporal. Por otro lado, las proyecciones descendentes desde la corteza a estructuras subcorticales son fundamentales para la plasticidad auditiva, incluida la capacidad de las neuronas de ajustar su respuesta a estímulos significativos o relevantes (Markovitz et al., 2013). Proyecciones descendentes desde la corteza auditiva al colículo inferior también se han descrito en el cerebro de roedores (Herbert et al., 1991) y además, la estimulación eléctrica de la corteza auditiva primaria en cobayas produce la activación del colículo inferior con una organización tonotópica (Markovitz et al., 2013). Se considera que las influencias "top-down" eferentes se propagan a través de actividades neuronales reflejadas en frecuencias en la banda beta baja (Bastos et al., 2015). El aumento de la FD de la causalidad de beta baja a beta alta entre CIC-AU1 en ratas con HA podrían estar reflejando alteraciones en la transmisión de las predicciones entre las áreas superiores (AU1) y las inferiores (CIC), impidiendo que se produzca la adaptación de las respuestas que se pueden predecir y con ello alterando la dinámica de causalidad entre estas dos áreas.



**Figura 94:** Causalidad durante la estimulación auditiva en ratas control e hiperamonémicas sin y con tratamiento con Ibuprofeno.

La comunicación en ratas con HA crónica ocurre desde CIC a PrL en lugar de ocurrir de forma bidireccional. La región ventral del CIC participa predominantemente en la filtración de estímulos acústicos de naturaleza aversiva. La estimulación eléctrica o química de esta región produce "freezing" o inmovilización, excitación o huida, simulando el comportamiento temeroso que tendría el animal ante desafíos ambientales. La administración de NMDA en esta región produce inmovilización y la activación de la corteza pre-límbica (Ferreira-Netto et al., 2007). La alteración de una correcta comunicación entre el CIC y la PrL resultaría en la pérdida del principal sentido evolutivo de la respuesta MMN, la capacidad de generar una respuesta cerebral diferente frente un sonido extraño que pudiera comprometer la supervivencia.

Por otro lado, la influencia causal entre CIC-CA1 está alterada en la HA sin alterarse la FD de la causalidad entre éstas áreas, que se mantiene en la banda theta tanto en controles como en HA. Esto podría estar indicando que los cambios en la FD de la causalidad no tienen porque ir siempre ligados a cambios en el sentido en el que se comunican las áreas. Así por ejemplo, podríamos hipotetizar que cambios en la FD pueden producir cambios en la forma en la que se comunican las áreas al transmitirse la información de forma diferente entre ellas, pero las distintas áreas también pueden influirse unas a otras en diferente sentido y sin cambiar la frecuencia en la que lo hacen debido a otros mecanismos, como por ejemplo cambios en la dinámica temporal de la actividad entre las áreas, que es lo que realmente marca la dirección de la comunicación entre ellas. La comunicación entre CIC y CA1 durante el procesamiento auditivo de estímulos novedosos se ha demostrado en cobayas. Liberman et al., (2009) demostraron que con los estímulos auditivos novedosos se producía el aumento de los disparos unitarios en el CIC y que esto venía acompañado de un aumento del ritmo theta en el hipocampo. Otros estudios en animales han demostrado que en la inhibición del reflejo de sobresalto ante un estímulo auditivo también participan el colículo inferior del sistema auditivo (Nodal y López, 2003) junto con el hipocampo (Koch, 1999). La inhibición del reflejo de sobresalto es un fenómeno neurológico por el que un pre-estímulo débil, generalmente auditivo, inhibe la reacción frente a un estímulo posterior más fuerte. Este mecanismo permite al sistema nervioso adaptarse temporalmente a estímulos sensoriales fuertes que pueden predecirse. Los déficits en la inhibición del reflejo de sobresalto se asocian con la incapacidad de filtrar información innecesaria y se han descrito en pacientes con esquizofrenia y enfermedad de Alzheimer (Braff et al., 2001; Swerdlow et al., 2008). El análisis de causalidad muestra que la HA anula la influencia causal del CA1 sobre el CIC, es decir, anula la respuesta funcional del hipocampo sobre el CIC. Esto sugiere que las ratas con HA crónica no son capaces de diferenciar qué sonidos ya no se tienen que procesar porque se pueden predecir, es decir son innecesarios porque se repiten en el tiempo, y esto puede deberse a que no se forma la correcta huella mnésica temporal de estos sonidos.

El Ibuprofeno normaliza la FD de la causalidad entre CIC-AU1 y AU1-PrL durante la estimulación auditiva, sin embargo no normaliza la influencia causal entre las distintas

áreas, manteniéndose la misma causalidad que había en ratas con HA. Lo que concuerda con la idea que hemos propuesto anteriormente en la que decíamos que los cambios en el sentido de la influencia causal entre las áreas no tienen que producirse necesariamente por cambios en la FD en la que estas áreas se comunican y que pueden haber otros mecanismos implicados. El Ibuprofeno modifica también la comunicación en ratas control produciendo la misma influencia causal que produce en las ratas HA entre las distintas áreas a excepción de la comunicación entre AU1-CA1. El Ibuprofeno estaría produciendo el aumento de la respuesta MMN en hipocampo de controles y de HA activando otras influencias causales comunes en los dos grupos. En ratas con HA crónica los cambios en la influencia causal vienen acompañados de cambios en los sistemas de neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica como hemos explicado en los apartados anteriores. Sin embargo, los cambios en la comunicación en ratas control parecen asociarse a cambios en el sistema GABAérgico más que en el glutamatérgico, ya que el Ibuprofeno aumenta la expresión en membrana de la subunidad alpha-1 y la disminuye de la subunidad alpha-5 del receptor GABA<sub>A</sub> en el hipocampo y previene el aumento de GABA durante la estimulación auditiva sin producir cambios en la liberación de glutamato o en la expresión en membrana de sus receptores.

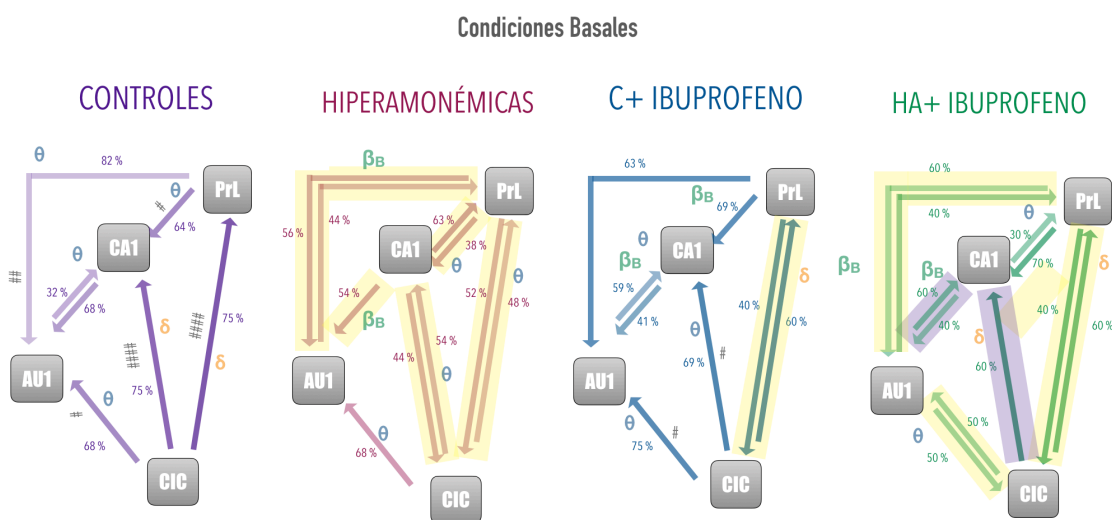
Por otro lado, en condiciones basales, los aumentos de la FD de la coherencia entre AU1-CA1 y AU1-PrL en ratas HA sí que vienen acompañados de una disminución de la coherencia entre estas áreas. En condiciones basales, el Ibuprofeno normaliza la FD de la coherencia entre AU1-CA1 y tiende a aumentar la coherencia entre estas áreas en estas ratas. Se ha demostrado que la coherencia interhemisférica en la corteza somatosensorial primaria de ratas cambia con los diferentes niveles de alpha-cloral (Lu et al., 2007). Lo que hace pensar que quizá las diferencias en la coherencia entre controles e HA y el efecto del Ibuprofeno se hagan más evidentes en las condiciones basales que cuando hay estimulación auditiva porque no están influyendo los niveles de anestesia con hidrato de cloral.

En condiciones basales, con la rata sin anestesiar, se hacen también más evidentes las diferencias en la influencia causal entre controles e HA (Figura 95). Las ratas con HA presentan frecuencias dominantes de la causalidad e influencias causales diferentes entre todas las áreas exceptuando la comunicación entre CIC-AU1. Las ratas con HA crónica además de presentar, como en la condición de estimulación, alterada la comunicación entre CIC-CA1, CIC-AU1 y CIC-PrL, también tienen alterada la comunicación entre CA1-AU1, AU1-PrL y CA1-PrL. Los animales pueden responder selectivamente a un sonido a pesar de la presencia de múltiples distracciones simultáneas, del mismo modo que los humanos pueden responder a una sola voz en una fiesta con mucha gente. En un estudio llevado a cabo en roedores se demostró que la regla para la selección del estímulo auditivo relevante se codifica en AU1 y en la corteza prefrontal medial (Rodgers y DeWeese, 2014). Pero además, antes de formar la regla que nos permita saber si un sonido es merecedor de nuestra atención o no, debemos aprender a identificarlo. En relación con esto un estudio realizado en humanos mediante RM funcional demostró que el

hipocampo y la AU1 participan en la representación neural de patrones acústicos ya aprendidos (Kumar et al., 2014). La alteración de una correcta comunicación entre CA1-AU1 y AU1-PrL en condiciones basales podría implicar que las ratas HA por un lado no formaran las huellas necesarias que permiten reconocer los estímulos, y que tampoco formaran las reglas necesarias para la selección de los estímulos relevantes. Por otro lado, se ha descrito el papel de la conectividad funcional entre el hipocampo y la corteza prefrontal en la memoria de trabajo en roedores (Brito et al., 1982; Seamans et al., 1995; Lee y Kensler et al., 2003; Floresco et al., 1997; Jay et al., 1995), por lo que la formación de huellas mnésicas temporales, es decir la formación de memoria de trabajo sensorial, a través de la comunicación funcional entre CA1 y la PrL podría ser necesaria para poder establecer las reglas de selección de sonidos relevantes e identificar los sonidos.

El tratamiento con Ibuprofeno normaliza la FD de la causalidad entre CIC-CA1 y CIC-PrL y la influencia causal entre CIC-CA1 y AU1-CA1. En controles el Ibuprofeno modifica, y de la misma forma que lo hace en ratas con HA, la influencia causal entre CIC y PrL.

La normalización de la comunicación en condiciones basales entre CIC-CA1 y AU1-CA1 podría estar implicada en el aumento de la respuesta MMN en ratas HA en la condición de estimulación. Además, como hemos dicho anteriormente, una alteración en la comunicación entre dos áreas se debe en definitiva a una alteración en la neurotransmisión. La alteración causal entre el CIC y la AU1 con el hipocampo podría relacionarse con la alteración GABAérgica que hemos descrito en el hipocampo de ratas con HA crónica, ya que el CIC y la AU1 conectan con el hipocampo a través de la corteza entorrinal.



**Figura 95:** Causalidad en condiciones basales en ratas control e hiperamonémicas sin y con tratamiento con Ibuprofeno.



Podríamos hipotetizar que en el proceso de codificación predictiva, cuando se forman las predicciones más precisas en las condiciones basales a partir de un ambiente monótono o repetitivo, es importante una comunicación correcta desde los niveles de procesamiento inferior, como el CIC, hacia los niveles de procesamiento superior, como el hipocampo y una comunicación bidireccional entre el hipocampo y la corteza auditiva primaria. Así por ejemplo, en ratas control, el CIC en este caso estaría actuando como indicador de adaptación a la monotonía. Además, atendiendo al porcentaje elevado de ratas control que responden en este sentido podemos afirmar que es una respuesta constante en todas las ratas, es decir una respuesta que indica que las ratas se encuentra en un ambiente auditivamente monótono. Con la estimulación auditiva, la comunicación toma la dirección desde CA1 a CIC. Esto podría indicar que el hipocampo manda información a los niveles inferiores de que se ha interrumpido la monotonía y que tiene en cuenta los cambios para las futuras predicciones, actuando los niveles superiores como inhibidores de la señal de monotonía de los inferiores. Esto podría concordar con un estudio realizado por Parras y Nieto-Diego et al., (2018) en el que demostraron que los niveles inferiores de procesamiento auditivo como el mesencéfalo y tálamo lemniscales son más susceptibles a sufrir una adaptación pasiva al estímulo bajo la condición *odball*. Por el contrario, las respuestas observadas en las regiones de orden superior apoyan la generación de un mecanismo Bayesiano en el procesamiento auditivo generando señales mayores de error en la predicción. Sin embargo, habrían sido necesarios protocolos de estimulación control (Harms et al., 2016) en este estudio para demostrar que en el CIC la respuesta MMN se debe a una mayor supresión por repetición y en el hipocampo a la generación de una mayor señal de error en la predicción. Por otro lado, la comunicación bidireccional entre AU1 y CA1, tanto en la condición de estimulación como en las condiciones basales, podría estar indicando que las áreas superiores e inferiores se comunican entre ellas continuamente para llegar al consenso entre las predicciones y los inputs sensoriales.

## 5.2 PACIENTES CON ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA

### 5.2.1 ESTUDIO 1:

---

#### ANÁLISIS DEL VOLUMEN DE SUSTANCIA GRIS Y CONECTIVIDAD FUNCIONAL EN REDES ICA Y SU RELACIÓN CON LAS ALTERACIONES COGNITIVAS EN LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

Alrededor del 33-50% de los pacientes con cirrosis que no presentan síntomas clínicos de EH padecen EHM con deterioro cognitivo leve, déficit de atención (Amodio et al., 2005; Weissenborn et al., 2005) y alteración en la coordinación bimanual y visuo-espacial (Felipo et al., 2012 y 2014). El "gold standard" para su diagnóstico es una batería de test psicométricos denominada PHES (*Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*) (Firenci et al., 2002; Weissenborn et al., 2001). El principal beneficio de la utilización de la batería PHES es que permite comparar resultados de distintos estudios realizados en cualquier Hospital, lo cual no era posible anteriormente debido a la diversidad de tests utilizados en cada estudio. Sin embargo, la batería PHES no es lo suficientemente sensible como para detectar alteraciones neurológicas tempranas, que además, en los inicios del diagnóstico, pueden ser bastante heterogéneas (Gimenez-Garzó et al., 2017).

Se ha propuesto que las alteraciones cognitivas presentes de forma típica en la EHM, como el déficit de atención y la incoordinación motora pueden deberse a la alteración de la sincronización de la actividad neuronal entre diferentes áreas (Timmermann et al., 2005). Por otro lado, los pacientes con EHM muestran alteraciones en la sustancia blanca que se relacionan con el deterioro cognitivo (Montoliu et al., 2012). Esto podría alterar la conectividad funcional de las redes neuronales, causando déficits neurológicos. También se ha descrito una disminución significativa en la densidad de sustancia gris en varias áreas cerebrales de pacientes cirróticos (Guevara et al., 2011) y los pacientes con EHM presentan un daño localizado en el precuneus (implicado en la DMN), que correlaciona con la alteración cognitiva (Montoliu et al., 2012). Esto sugiere que las alteraciones en la integridad de sustancia gris pueden ser, al menos en parte, responsables de las alteraciones en la CF.

Varios estudios de RM funcional han documentado una conectividad funcional en el estado de reposo cerebral (CF-er) anormal en los pacientes cirróticos con EHM en la DMN y en algunas otras redes neuronales, que podría jugar un papel importante en la disfunción cognitiva en la EHM (Qi et al., 2012a, 2012b y 2014; Chen et al., 2014 y 2016). Sin embargo, los estudios de estado de reposo cerebral en la EHM generalmente se han centrado en ciertas redes por tener características funcionales implicadas en algunos dominios alterados en la EHM. Además, estos estudios no utilizan test específicos de las diferentes alteraciones cognitivas presentes en la EHM.



En esta tesis, además de utilizar la batería PHES, hemos analizado con más detalle diferentes funciones cognitivas y motoras mediante la utilización de diversos test que nos permiten evaluar de manera más precisa algunas alteraciones neurológicas concretas (funciones de atención, memoria y velocidad del procesamiento) en los pacientes con EHM. Además, hemos analizado la CF-er en todo el cerebro, utilizando el método de análisis de componentes independientes (ICA) con el objetivo de establecer nuevas relaciones entre la CF-er y las diferentes alteraciones cognitivas asociadas a la EHM. También hemos evaluado la relación entre la integridad de sustancia gris y la CF-er en diferentes redes del estado de reposo con algunos parámetros bioquímicos que se alteran en la EHM:

Para la evaluación de la atención selectiva se utilizaron los test de Stroop de colores y palabras (Stroop, 1935), el test SDMT oral, el test d2 y los tests de dígitos. En todos casos los pacientes sin EHM obtuvieron peores resultados que los controles y este deterioro se vio más agravado en el caso de los pacientes con EHM. Además, los resultados obtenidos fueron significativamente diferentes entre los grupos de pacientes, exceptuando en los test de dígitos en el que no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con EHM y los pacientes sin EHM.

El test de Stroop además permite evaluar la flexibilidad cognitiva y el control inhibitorio y tiene como ventaja que no requiere una alta capacidad intelectual del individuo (sólo lectura y colores), tiene en cuenta la edad del sujeto y requiere poco tiempo para su realización, lo cual es una ventaja para la práctica clínica de rutina. Las limitaciones del test residen en que en los individuos con alta frecuencia de lectura o con dificultades para diferenciar colores se genera una interferencia mayor a la esperada.

Los test SDMT y d2 permiten evaluar también la velocidad de procesamiento. Además el test d2 proporciona diversos parámetros que nos permiten obtener información sobre diferentes alteraciones cognitivas de una manera concisa. Los resultados de este test, indican un déficit en la atención selectiva/sostenida y la concentración mental tanto en los pacientes con EHM como en los pacientes sin EHM.

Por tanto, el hecho de que pacientes sin EHM según el PHES, tengan disminuida la atención selectiva y selectiva/sostenida, la flexibilidad cognitiva, el control inhibitorio, la velocidad de procesamiento y la concentración indica que muchos pacientes cirróticos que no son diagnosticados con EHM por la batería PHES presentan ya alteraciones cognitivas importantes de forma temprana en el desarrollo de la EHM. Este déficit cognitivo implica un deterioro de la calidad de vida del paciente cirrótico tanto con EHM como sin EHM, dificultando la realización de tareas que requieran estas funciones cognitivas como, por ejemplo, la conducción de vehículos.

En el estudio de la memoria de trabajo mediante los test de Dígitos y Letras y Números (batería WAIS) observamos que los pacientes con EHM son capaces de memorizar un menor número de series de ítems que los controles y pacientes sin EHM, presentando un

déficit en la memoria de trabajo. Además los pacientes sin EHM también muestran una función cognitiva algo afectada.

El déficit en la memoria de trabajo afecta a la capacidad de procesar y almacenar información verbal y visuoespacial afectando a la vida diaria de los pacientes pudiendo producir olvidos o desorientación.

Los pacientes con EHM tienen disminuida la coordinación bimanual y visuomotora, puesto que necesitan más tiempo para realizar la tarea que los sujetos sanos y que los pacientes sin EHM. Los pacientes sin EHM también tienen peor coordinación que los sujetos control. Las consecuencias en la vida diaria de las alteraciones en la coordinación motora son un empeoramiento de la calidad de vida, pudiendo sufrir caídas, hospitalizaciones y un enlentecimiento psicomotor.

En conclusión, los pacientes con EHM muestran déficits cognitivos, principalmente en atención (tanto selectiva como sostenida, velocidad de procesamiento mental y concentración), memoria de trabajo y alteraciones en la coordinación motora. Además, estas alteraciones aparecen de forma temprana en el desarrollo de la EHM, pudiendo detectarse incluso en pacientes cirróticos no diagnosticados con la enfermedad por el "gold standard", como ya se había documentado en anteriores estudios realizados por nuestro laboratorio (Giménez-Garzó et al., 2017).

En cuanto a los resultados de RM, encontramos una disminución significativa en la CF-er en redes relacionadas con la atención como la DMN (*Default Mode Network*, en español red neuronal por defecto), la RFPI (red frontoparietal izquierda) y la RAD (red de atención dorsal). También en la RS (red de saliencia) implicada en el cambio de actividad entre la DMN y la red de control ejecutivo (RCE) cuando se presenta un estímulo relevante y en la RGB (red de los ganglios basales). Además, nuestros resultados sugieren que los cambios en la CF-er dentro de la RS, la RGB y la DMN podrían tener valor predictivo para la detección de EHM y podrían ser utilizados como biomarcadores diagnósticos de EHM.

Cambios en la DMN ya han sido descritos en la EHM en estudios previos (Qi et al., 2012 y 2014; Chen et al., 2014). Estos estudios demostraron un aumento progresivo del deterioro de la DMN en paralelo con la progresión del deterioro cognitivo (correlaciones negativas entre la CF-er en algunas regiones de la DMN y la ejecución de algunos subtest del PHES). Nuestros resultados concuerdan con éstos, mostrando una reducción de la CF-er en los pacientes sin EHM en comparación con los controles y una reducción aún mayor de la CF-er en pacientes con EHM. Además hemos obtenido buenas correlaciones entre la CF-er de la DMN y la ejecución de una amplia variedad de tareas cognitivas. Estos resultados sugieren una alteración progresiva de la red conforme avanza la enfermedad, apoyando estudios previos en los que se considera la EH como un continuo de disfunción neurocognitiva (Bajaj et al., 2009).

Por otro lado el hecho de que los pacientes sin EHM, aunque en menor medida que los pacientes con EHM, también muestren alteraciones en la CF-er de la DMN podría indicar que la CF-er es un índice más fiable que la batería PHES para dilucidar la disfunción temprana en la función cerebral inducida por la cirrosis hepática. Los pacientes sin EHM muestran una menor CF-er que los controles en la DMN y en la RFPI, sugiriendo que las alteraciones en la CF-er podrían ser previas a las alteraciones volumétricas de las regiones que forman estas redes y podrían explicar las diferencias en la ejecución de los test cognitivos en comparación con los controles.

Hemos encontrado alteraciones en la CF-er en el *precuneus* y en el giro cingulado, que forman parte de la DMN. Estas podrían relacionarse con las alteraciones observadas en los pacientes cirróticos en las funciones cognitivas necesarias para la correcta ejecución del PHES: atención, memoria de trabajo y control ejecutivo. El *precuneus* es un área encargada del cambio de atención voluntario y la memoria de trabajo (Cavanna y Trimble, 2006) y por otro lado, estudios de RM funcional sugieren que la actividad anormal en la corteza prefrontal y la corteza cingulada anterior se asocia con la alteración del control ejecutivo en la EHM (Zhang et al., 2007). Además, Cheng et al., (2017) describieron una relación entre la normalización de los valores de amplitud de las fluctuaciones de baja frecuencia en el *precuneus* después del trasplante hepático y la mejora en la ejecución del test de conexión numérica A del PHES.

El *precuneus* anterior está conectado funcionalmente con la corteza motora (Biswal et al., 1995) y la corteza occipital visual (Zhang et al., 2012) y la corteza cingulada anterior ventral manda proyecciones a la corteza premotora (Pandya et al., 1981). Alteraciones en la CF-er en el *precuneus* y la corteza cingulada con las áreas podría explicar la correlación negativa entre la CF-er y la realización de los test psicomotores en los pacientes.

Los pacientes con EHM muestran una disminución de la CF-er en comparación con los pacientes sin EHM en la RS, localizada en el área motora suplementaria bilateral. La RS, está formada también por la corteza insular anterior bilateral y la corteza cingulada anterior dorsal, y está implicada en la detección y orientación de la atención hacia estímulos externos y eventos internos (Menon y Uddin, 2010). La alteración en el procesamiento de la detección del cambio auditivo, evaluado con la respuesta MMN y el deterioro en la atención presente en los pacientes con EHM (Felipo et al., 2012) podría relacionarse con la disminución de la CF-er de la RS.

Los resultados volumétricos en este estudio muestran atrofia de la sustancia gris en la ínsula en los pacientes con EHM y también en el área motora suplementaria bilateral y la corteza cingulada. Estas alteraciones estructurales podrían explicar las alteraciones funcionales y la menor conectividad en la RS. Además, la ínsula está funcionalmente conectada con el área motora suplementaria (Cauda et al., 2011), que juega un papel crucial en la planificación e iniciación de movimientos (Potgieser et al., 2014) y en la coordinación bimanual (Wilson et al., 2014).

La reducción significativa de sustancia gris en la ínsula en los pacientes con EHM podría estar afectando a la conectividad de esta área con el área motora suplementaria bilateral, lo que lleva a la disminución de la CF-er de este cluster encontrado en pacientes con EHM. El área motora suplementaria tiene múltiples conexiones de sustancia blanca con áreas motoras, de lenguaje y límbicas. Estas alteraciones, junto con la alteración generalizada de la conectividad anatómica de sustancia blanca en el cerebro de pacientes con EHM en comparación con cirróticos sin EHM y sujetos control (Montoliu et al., 2014), podrían explicar las alteraciones en la iniciación del movimiento implicadas en la bradiquinesia en la EHM (Joebges et al., 2003) y contribuir a la alteración en el control postural de estos pacientes (Urios et al., 2017). La menor conectividad en esta red podría explicar la baja destreza manual en la ejecución de subtest del PHES que evalúan la coordinación visuomotora (SDT y LTT) y las correlaciones encontradas.

Hasta la fecha, pocos estudios han demostrado cambios funcionales y estructurales en la ínsula de pacientes con EHM en comparación con controles (Qi et al., 2012; Chen et al., 2012). Nosotros hemos encontrado una reducción significativa de sustancia gris en la ínsula bilateral en pacientes con EHM en comparación con pacientes sin EHM, que correlaciona con las alteraciones cognitivas.

El déficit de atención es una de las características más tempranas y clave en el desarrollo de la EHM (Amodio et al., 2005; Weissenborn et al., 2005; Felipo et al., 2012). Hemos observado también una disminución significativa de la CF-er en los pacientes con EHM en comparación con los controles en la RAD (red de atención dorsal), lo que concuerda con estudios anteriores (Qi et al., 2012; Chen et al., 2014). La RAD es responsable de la orientación de la atención endógena, la atención selectiva y está implicada en el cambio voluntario de atención (Corbetta et al., 2002; Fox et al., 2006).

El lóbulo parietal inferior dentro de la red frontoparietal izquierda (RFPI) está implicado en una amplia variedad de funciones cognitivas, que incluye la memoria de trabajo y la atención localizada (Ciaramelli et al., 2008). Se ha demostrado la relación entre la normalización de los valores de las fluctuaciones de baja frecuencia en el lóbulo parietal inferior después del trasplante hepático y la mejora de las funciones cognitivas en los pacientes cirróticos (Cheng et al., 2017). En nuestro estudio, aunque encontramos diferencias en la CF-er entre controles y pacientes sin y con EHM, no obtuvimos correlaciones significativas con la realización de los test psicométricos.

Tanto la DMN como la RFPI están dentro de la RCE (red de control ejecutivo), la cual está estrechamente relacionada con la RS. El modelo "triple red" se ha propuesto recientemente, el cual incluye la RD, la DMN y la RCE. En este modelo la RS facilitaría el cambio de activación entre la DMN y la RCE, a través de señales de las señales transitorias adecuadas que activan RCE para mediar los procesos de control cognitivo y desactivan la DMN (Menon y Uddin, 2010). El acoplamiento funcional y la relación de anticorrelación entre estas 3 redes es crítico para la ejecución de ciertas tareas cerebrales como la memoria de trabajo, la atención y el control ejecutivo (Menon y Uddin, 2010;

Menon, 2011), todas ellas alteradas en la EHM (Amodio et al., 2005; Weissenborn et al., 2005; Felipe et al., 2012).

La alteración de la organización intrínseca y de interconectividad en la RS (red de saliencia), la RCE y la DMN es característica de muchos desórdenes psiquiátricos y neurológicos (Menon y Uddin, 2010). Chen et al., (2016) mostraron alteraciones en la conectividad en la RS y su acoplamiento funcional con la DMN y la RCE en pacientes con EHM. Alteraciones en la RS y consecuentemente en la activación y desactivación de la RCE y la DMN respectivamente podrían explicar los cambios de atención y los déficits de coordinación encontrados en los pacientes con EHM.

Encontramos una disminución significativa de la CF-er en los pacientes con EHM en comparación con los sin EHM en el giro cingulado bilateral en la RGB. Además, los núcleos basales (caudado y putamen) muestran una atrofia significativa de sustancia gris en los pacientes con EHM en comparación con los sin EHM y controles, que podría estar afectando a la CF-er de dicha red. La RGB está implicada en numerosas vías neuronales, incluyendo aquellas relacionadas con las funciones emocionales, motivacionales, asociativas y cognitivas. En relación con esto, también se ha demostrado la disminución de la conectividad entre el tálamo y los ganglios basales en los pacientes con EHM en comparación con los sujetos control (Qi et al., 2013). Las alteraciones en la CF-er de esta red podrían explicar las correlaciones encontradas de la menor CF-er de la RGB con la severidad de la enfermedad y los déficits de atención y coordinación motora.

Tradicionalmente, el cerebelo se ha considerado como un órgano regulador de la función motora, pero se ha demostrado la asociación entre la alteración cerebelar y la alteración de la función ejecutiva en enfermedades que cursan con deterioro cognitivo (Kühn et al., 2012; Segarra et al., 2008). El flujo de sangre cerebelar está aumentado en pacientes con EHM, concretamente en la vermis cerebelar de este grupo de pacientes. Esta alteración correlaciona negativamente con la ejecución del test de conexión numérica A y B del PHES (Felipo et al., 2014). Las alteraciones en el volumen de sustancia gris del cerebelo junto con las alteraciones en el flujo sanguíneo, podrían contribuir a la alteración en la función ejecutiva y en la velocidad de procesamiento cognitivo en los pacientes evaluadas con la realización de estos subtest del PHES.

Los principales factores contribuyentes al deterioro cognitivo en la EH son la hiperamonemia y la inflamación. El efecto sinérgico entre la hiperamonemia y la inflamación se ha propuesto como el principal responsable de las alteraciones neurológicas de la EH (Shawcross et al., 2004). Nosotros hemos encontrado que los niveles de IL-6 en suero correlacionan con la conectividad de la RS en el área motora suplementaria bilateral y también con la disminución de volumen de sustancia gris en la ínsula y el cerebelo derecho, sugiriendo que la inflamación periférica podría estar implicada en las alteraciones de coordinación visuo-motora en la EHM.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que cambios en la RS, la RGB y la DMN se asocian con alteraciones cognitivas y podrían tener valor predictivo para la detección de la EHM y se podrían utilizar como biomarcadores diagnósticos de la enfermedad. Además, alteraciones en el volumen de sustancia gris en áreas implicadas en estas redes podrían contribuir a las alteraciones en la CF-er y a las alteraciones cognitivas de la EHM.

### 5.2.2 ESTUDIO 2:

---

#### ANÁLISIS DEL VOLUMEN DE SUSTANCIA GRIS Y CONECTIVIDAD FUNCIONAL DEL HIPOCAMPO Y SU RELACIÓN CON LAS ALTERACIONES EN EL APRENDIZAJE Y MEMORIA CON ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA

Los procesos de aprendizaje, memoria y cognición se relacionan con el hipocampo (Squire et al., 2004; Zeidman et al., 2016). Esta región tiene una amplia conectividad y las lesiones en la porción anterior tienen un efecto perjudicial en el aprendizaje, la memoria y la orientación espacial (Andelman et al., 2010; Scoville y Milner, 1957).

El hipocampo no es una formación anatómica unitaria. Se han identificado varias subregiones que difieren tanto histológicamente, en sus diferentes capas (Joseph y Cardozo, 2004), como en sus conexiones eferentes (Aggleton, 2012). Los estudios de neuroimagen funcional han demostrado la relación entre las funciones cognitivas de nivel superior y las diferentes subregiones dentro del hipocampo (Zeidman et al., 2016; Aggleton, 2012).

Varios estudios han evaluado la memoria en pacientes con EHM, sin embargo los resultados obtenidos son contradictorios y no determinan con claridad si existe o no alteración en la memoria en estos pacientes (Hegedus et al., 1984; McCrea et al., 1996; Tarter et al., 1984, 1987 y 1990; Thomas et al., 1998; Weissenborn et al., 2003).

La RM permite estudiar los cambios neuroanatómicos y funcionales asociados con patologías como la EHM, y asociar estos cambios con déficits cognitivos específicos, como las alteraciones en la memoria. En estudios con pacientes cirróticos se ha descrito una disminución significativa en la densidad de sustancia gris en varias áreas cerebrales (Guevara et al., 2011; García-García et al., 2017). En un estudio anterior de nuestro laboratorio y en esta tesis hemos demostrado la disminución del volumen del hipocampo en pacientes con EHM en comparación con controles sanos (Montoliu et al., 2012 y García-García et al., 2018). Por otro lado, los pacientes con EHM también presentan cambios en el grosor cortical en el *precuneus* (implicado en la DMN) y alteraciones en la



integridad microestructural de sustancia blanca, que correlaciona con alteraciones cognitivas (Montoliu et al., 2012 y 2014).

Como hemos explicado en el apartado anterior, estudios recientes han evaluado la relación entre el deterioro cognitivo asociado a la EHM y cambios en los patrones de CF-er (García-García et al., 2018; Chen et al., 2014, 2015 y 2016; Qi et al., 2012a, 2012b, 2012c y 2014). Importantes redes funcionales, como la DMN, redes de atención, la red visual y circuitos tálamo-corticales están alteradas en los pacientes cirróticos (García-García et al., 2018; Chen et al., 2014; Chen et al., 2015 y 2016; Qi et al., 2014). Por otro lado, como hemos explicado también, varios estudios apoyan la idea de una relación sinérgica entre la hiperamonemia y la inflamación en el desarrollo de las alteraciones neurológicas de la EHM (Shawcross et al., 2004 y Felipo et al., 2012).

No hay estudios que hayan evaluado los cambios estructurales y en la CF-er en las diferentes regiones de hipocampo en relación con la función de memoria, la capacidad cognitiva y los marcadores de inflamación en los pacientes cirróticos con EHM. En esta tesis hemos evaluado los procesos de memoria en el aprendizaje, la memoria a largo plazo y de reconocimiento en pacientes con y sin EHM y controles sanos. También hemos evaluado la relación entre la función de memoria y las alteraciones en la integridad estructural y en la conectividad funcional de diferentes subregiones del sistema hipocampal mediante técnicas de RM. Finalmente, hemos evaluado la correlación entre los niveles de amonio y los marcadores inflamatorios, la función de memoria y los parámetros de RM.

Los resultados en el comportamiento muestran un peor aprendizaje verbal y una peor memoria a largo plazo en los pacientes cirróticos en comparación con los controles sanos. Como esperábamos, la peor realización de la tarea de memoria verbal episódica fue más evidente en los pacientes con EHM que en los pacientes sin EHM. Estos resultados concuerdan con los de Torres et al., (2013) que describieron alteraciones en la memoria episódica verbal y en la velocidad de procesamiento de la información en los pacientes con EHM.

En cuanto a los análisis volumétricos de las subregiones del hipocampo, observamos una disminución del volumen de la fimbria derecha en los dos grupos de pacientes, en comparación con el grupo control. La fimbria contiene axones que emanan principalmente de las neuronas de CA1 y *subiculum* (Joseph y Cardozo, 2004). Alteraciones en el "output" de información del hipocampo debido a alteraciones en la integridad de la fimbria podrían explicar la reducida capacidad de aprendizaje y memoria a largo plazo en los pacientes. Esta propuesta parece estar reforzada por la correlación directa observada entre el volumen de diferentes subregiones del hipocampo y las puntuaciones obtenidas en la realización del TAVEC. Cabe destacar, que estas correlaciones fueron más abundantes y alcanzaron índices de correlación mayores para la memoria a largo plazo que para el aprendizaje total. Además, muchas de estas correlaciones fueron mayores en los pacientes que en el grupo de controles, aunque

debido a las limitaciones de potencia estadística, sólo unas pocas alcanzaron la significación estadística en el grupo de EHM.

Los análisis de CF-er también han revelado alteraciones funcionales entre las subregiones del hipocampo y ciertas áreas corticales. Observamos una disminución de la CF-er en pacientes con EHM, en comparación con el grupo control, entre el *subiculum* izquierdo y el *precuneus* bilateral. Además, observamos que los pacientes con EHM presentan una menor conectividad entre el *presubiculum* izquierdo y el *precuneus* izquierdo, en comparación con los pacientes sin EHM. Una vez más, los análisis de correlación mostraron que la disminución de la CF-er entre estas áreas contribuye al deterioro de la capacidad de memoria en los pacientes cirróticos, ya que la disminución en la CF-er observada en ambos grupos de pacientes se asocia con una peor puntuación en el aprendizaje total y en la memoria a largo plazo. La conectividad de estas dos semillas del hipocampo con las áreas mencionadas correlaciona inversamente con los niveles de IL-6, sugiriendo que la inflamación tiene un papel importante en las alteraciones de la CF-er del hipocampo.

Encontramos también una correlación positiva entre el volumen de la fimbria derecha y la CF-er entre el *subiculum* izquierdo y el *precuneus* bilateral, lo que sugiere que estas alteraciones podrían estar relacionadas.

No podemos pasar por alto los problemas de atención observados en los pacientes cirróticos, una alteración cognitiva que podría interferir en los procesos de memoria episódica. El proceso de atención es una función básica que interfiere en la ejecución de otros procesos cognitivos de orden superior, como la codificación y almacenamiento de la memoria a largo plazo. En relación con esto, en un estudio previo de Weissenborn et al., (2003) concluyeron que la menor capacidad de memoria en los pacientes con EH temprana podría deberse a los déficits de atención que interfieren en la codificación del material que debe ser memorizado. Los procesos de control cognitivo, como son los procesos atencionales, están controlados por redes neuronales como la DMN, la RS y la RFPI. Como hemos explicado en el estudio anterior, en esta tesis hemos demostrado que los pacientes con EHM muestran una disminución de la CF-er en estas redes y, que específicamente, la estructura más afectada en la DMN es el *precuneus*. De forma consistente con el estudio 1, en este segundo estudio hemos demostrados la alteración de la CF-er entre la subregión *presubiculum* izquierdo del hipocampo y el *precuneus* en pacientes con EHM, en comparación con pacientes sin EHM y controles sanos. Estas áreas son responsables de la formación y almacenamiento de la memoria y la atención y el control ejecutivo, respectivamente, procesos todos ellos necesarios para la correcta ejecución del TAVEC.

Los niveles aumentados de amonio y la inflamación contribuyen a las alteraciones neurológicas en los pacientes con EHM (Felipo, 2013; Shawcross et al., 2004; Felipo et al., 2012). En modelos animales de HE, se ha demostrado que la hiperamonemia produce alteraciones estructurales en la corteza entorrinal (Insausti et al., 1997). En esta tesis



hemos querido determinar si estos factores también contribuyen al peor aprendizaje y memoria encontrados en estos pacientes. Los resultados muestran que las variables inflamatorias se asocian con la peor realización de las tareas de aprendizaje y memoria en los pacientes cirróticos, ya que encontramos correlaciones inversas entre las puntuaciones del TAVEC y los niveles en suero de IL-6 e IL-18. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado en pacientes con VIH en el que se relacionó el nivel de diferentes citoquinas plasmáticas con el peor rendimiento en la memoria (Correia et al., 2013). Además, como muestran las correlaciones dentro del grupo de sin EHM, la combinación de los niveles aumentados de amonio e IL-18 podrían contribuir al bajo rendimiento en la memoria a largo plazo. Aunque estos pacientes no mostraron una memoria a largo plazo significativamente menor que los controles, la correlaciones encontradas dentro de este grupo podrían explicar el hecho de que los pacientes sin EHM forman un grupo heterogéneo. Algunos de los pacientes de este grupo muestran un peor rendimiento en la memoria y también una menor CF-er, y esto podría explicar las correlaciones encontradas. Además, en un estudio anterior de nuestro laboratorio, demostramos que algunos pacientes clasificados como pacientes sin EHM, en función de la puntuación del PHES, mostraban déficits de atención y de coordinación, y que las alteraciones neurológicas más tempranas varían en los diferentes pacientes cirróticos. Demostramos también que algunos de estos pacientes tienen un mayor riesgo de sufrir complicaciones clínicas, incluyendo EH clínica, y que deben ser diagnosticados y sometidos a seguimiento clínico (Giménez-Garzó et al., 2017).

Finalmente, es importante enfatizar la creciente evidencia acerca del papel de la corteza parahipocampal en la memoria episódica (Ward et al., 2014). Desafortunadamente, el algoritmo que hemos utilizado en esta tesis sólo incluye estructuras subcorticales, dividiendo el hipocampo en varias subregiones, pero sin tener en cuenta estructuras corticales como el giro parahipocampal. Estudios futuros serían necesarios para cerciorar la posible implicación de las regiones corticales parahipocampales en los déficits de memoria de los pacientes con EHM. Otra de las limitaciones del protocolo de segmentación utilizado en el estudio es que sólo abarca el eje anterior-posterior cuando divide el hipocampo en las subregiones relevantes. Sin embargo, como sugieren los resultados de estudios recientes, el hipocampo puede tener una organización funcional más compleja en el eje longitudinal (Strange et al., 2014). Una vez más, se deberían llevar a cabo estudios futuros con los algoritmos apropiados que permitieran segmentar el hipocampo en el eje longitudinal y explorar la relevancia de los subregiones resultantes y las redes en el rendimiento en la memoria episódica.

En conclusión, este es uno de los pocos estudios que abordan los déficits en la memoria episódica y su neuropatología subyacente asociada en pacientes cirróticos. Hemos observado que tanto los pacientes con EHM como los pacientes sin EHM tienen alterados el aprendizaje y la memoria a largo plazo y que estas alteraciones se asocian con alteraciones funcionales y estructurales de las estructuras hipocampales. Como era de esperar, las alteraciones anatómicas y comportamentales son más evidentes en los

pacientes con EHM que en los pacientes sin EHM. La CF-er es más sensible que el análisis estructural en la detección de alteraciones en el sistema hipocampal asociadas con el aprendizaje y la memoria en los pacientes con EHM. Aunque es cierto que estos pacientes presentan otro tipo de alteraciones cognitivas (por ejemplo, déficits en la atención), este estudio demuestra que las alteraciones en las zonas hipocampales dificultan el proceso de aprendizaje y además interfieren en almacenamiento de nueva información.

## **6. CONCLUSIONES**

### MODELOS ANIMALES

1. El modelo de ratas con HA crónica reproduce en el hipocampo las alteraciones en la respuesta MMN encontradas en pacientes con EHM. La disminución de la amplitud y del área bajo la curva de la respuesta MMN en el hipocampo de las ratas con HA sugiere que se activan un número menor de neuronas y durante periodos más cortos, y además las neuronas se activan de una forma menos coordinada.
2. La alteración de la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica en el hipocampo de ratas con HA es un factor importante en la alteración de la respuesta MMN:
  - La menor respuesta MMN en ratas con HA crónica se asocia con la pérdida del aumento de GABA extracelular inducido por la estimulación auditiva en ratas control y con una menor expresión en membrana de la subunidad alpha-5 del receptor GABA<sub>A</sub> en el hipocampo.
  - En ratas con HA crónica tampoco se produce la disminución de glutamato extracelular durante la respuesta MMN y está disminuida la expresión en membrana de la subunidad GluA2 del receptor AMPA y aumentada la de la subunidad NR2B del receptor NMDA.
3. La neuroinflamación participa en la alteración de la respuesta MMN en hiperamonemia alterando la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica en el hipocampo. El anti-inflamatorio Ibuprofeno restaura la respuesta de los neurotransmisores al estímulo auditivo, la expresión en membrana de los receptores mencionados y, en paralelo, normaliza la respuesta MMN.
4. Las ratas con HA crónica presentan alteraciones en la comunicación funcional entre las diferentes áreas durante la respuesta MMN. La información fluye bidireccionalmente entre CIC-AU1 en lugar de fluir de AU1 a CIC, y fluye de CIC a CA1 y a PrL en lugar de fluir en los sentidos contrarios, como en las ratas control.
5. El tratamiento con Ibuprofeno altera la influencia causal en las ratas control de forma que la comunicación entre las distintas áreas es igual a la que presentan las ratas con HA. El Ibuprofeno aumenta la respuesta MMN, que presenta mayor amplitud y área bajo la curva en hipocampo tanto en ratas control como en ratas HA, sugiriendo que induce mecanismos que aumentan la eficiencia de la generación de la respuesta MMN.
6. La conectividad funcional en estado basal también está alterada en las ratas con HA crónica. Aumentos en la FD de la coherencia entre AU1-CA1 y AU1-PrL se asocian con una disminución de la coherencia entre éstas áreas. En condiciones basales, las ratas HA presentan mayores FD en la causalidad y tienen alterada la causalidad de la comunicación entre todas las combinaciones de áreas excepto entre CIC-AU1.

7. La restauración en ratas hiperamonémicas por el Ibuprofeno de la comunicación desde CIC a CA1 y la comunicación bidireccional entre AU1-CA1 parece ser importante para la restauración de la respuesta MMN. La comunicación entre CIC-CA1 sería necesaria para el filtrado de la información auditiva no relevante y la comunicación entre AU1-CA1 para la formación de representaciones neurales que permitan identificar los sonidos distintos.

### PACIENTES CON EHM

8. Aunque los pacientes con EHM muestran una atrofia mayor que los sin EHM, ambos grupos muestran una disminución del volumen de sustancia gris cerebral en comparación con los controles.
9. La pérdida de volumen en cerebelo derecho e ínsula derecha correlaciona con la peor ejecución de los test psicométricos, indicando que la atrofia de sustancia gris estaría participando en las alteraciones cognitivas. El volumen de sustancia gris en el cerebelo derecho permite diferenciar los pacientes cirróticos con y sin EHM con excelentes valores de sensibilidad y especificidad.
10. Los pacientes con EHM tienen disminuida la conectividad funcional en estado de reposo en la red de los ganglios basales y en redes relacionadas con la atención como la DMN (*default mode network*), la red frontoparietal izquierda, la RAD (red de atención dorsal) y la red de saliencia. La disminución del volumen de sustancia gris en las áreas cerebrales que forman estas redes podría contribuir a las alteraciones en la conectividad funcional en estado de reposo.
11. La conectividad funcional en estado de reposo de la DMN, la RAD y la RGB (red de los ganglios basales) tiene valor predictivo para la detección de EHM y podría utilizarse como biomarcador diagnóstico de la misma. Las correlaciones entre las CF-er con los test psicométricos permiten asociar las pérdidas de CF-er en estas tres redes con los déficits cognitivos.
12. Los pacientes sin EHM ó con EHM presentan déficit en el aprendizaje y en la memoria verbal a largo plazo. Estas alteraciones son más acusadas en los pacientes con EHM que en los sin EHM y correlacionan con la disminución de la conectividad funcional e integridad estructural en diferentes regiones del hipocampo lo que indica una implicación de las alteraciones en el hipocampo en el déficit de aprendizaje y en la dificultad de almacenar información nueva en los pacientes con EHM.
13. El análisis de la conectividad funcional es más sensible que el de las alteraciones estructurales en la detección de alteraciones en el hipocampo asociadas con el deterioro del aprendizaje y memoria en pacientes con EHM.

## Conclusiones

14. El aumento de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-18 se asocia con déficits de memoria y aprendizaje, menores volúmenes en diferentes regiones del hipocampo y menor conectividad funcional del hipocampo con estructuras corticales. Esto sugiere que la inflamación juega un papel clave en el desarrollo de las alteraciones estructurales y funcionales del hipocampo, y en las subsiguientes alteraciones en la memoria y aprendizaje.

# 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aggleton, J. P. (2012). Multiple anatomical systems embedded within the primate medial temporal lobe: implications for hippocampal function. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(7), 1579-1596. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.09.005>
- Aguinis, H., Gottfredson, R. K., & Joo, H. (2013). Best-practice recommendations for defining, identifying, and handling outliers. *Organizational Research Methods: ORM*, 16(2), 270-301. <https://doi.org/10.1177/1094428112470848>
- Agusti, A., Dziejczak, J. L., Hernandez-Rabaza, V., Guilarte, T. R., & Felipo, V. (2014). Rats with minimal hepatic encephalopathy due to portacaval shunt show differential increase of translocator protein (18 kDa) binding in different brain areas, which is not affected by chronic MAP-kinase p38 inhibition. *Metabolic Brain Disease*, 29(4), 955-963. <https://doi.org/10.1007/s11011-013-9461-8>
- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19(6), 716-723. <https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>
- Alarcón, F., & Giménez-Roldán, S. (2005). Systemic diseases that cause movement disorders. *Parkinsonism & Related Disorders*, 11(1), 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2004.10.003>
- Amodio, P., Marchetti, P., Del Piccolo, F., de Tourtchaninoff, M., Varghese, P., Zuliani, C., ... Guérit, J. M. (1999). Spectral versus visual EEG analysis in mild hepatic encephalopathy. *Clinical Neurophysiology*, 110(8), 1334-1344. [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(99\)00076-0](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(99)00076-0)
- Amodio, P., Pellegrini, A., Ubiali, E., Mathy, I., Piccolo, F. D., Orsato, R., ... Guérit, J. M. (2006). The EEG assessment of low-grade hepatic encephalopathy: comparison of an artificial neural network-expert system (ANNES) based evaluation with visual EEG readings and EEG spectral analysis. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 117(10), 2243-2251. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2006.06.714>
- Amodio, P., Quero, J. C., Del Piccolo, F., Gatta, A., & Schalm, S. W. (1996). Diagnostic tools for the detection of subclinical hepatic encephalopathy: comparison of standard and computerized psychometric tests with spectral-EEG. *Metabolic Brain Disease*, 11(4), 315-327.
- Amodio, P., Valenti, P., Piccolo, F. D., Pellegrini, A., Schiff, S., Angeli, P., ... Gatta, A. (2005). P300 latency for the diagnosis of minimal hepatic encephalopathy: Evidence that spectral EEG analysis and psychometric tests are enough. *Digestive and Liver Disease*, 37(11), 861-868. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2005.06.009>
- Amodio, P., Del Piccolo, F., Pettenò, E., Mapelli, D., Angeli, P., Iemmolo, R., ... Gatta, A. (2001). Prevalence and prognostic value of quantified electroencephalogram (EEG) alterations in cirrhotic patients. *Journal of Hepatology*, 35(1), 37-45. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(01\)00129-5](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(01)00129-5)
- Amodio, P., & Montagnese, S. (2015). Clinical Neurophysiology of Hepatic Encephalopathy. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 5(Suppl 1), S60-S68. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2014.06.007>
- Amodio, P., Montagnese, S., Gatta, A., & Morgan, M. Y. (2004). Characteristics of minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 19(3-4), 253-267.
- Amodio, P., Schiff, S., Del Piccolo, F., Mapelli, D., Gatta, A., & Umiltà, C. (2005). Attention dysfunction in cirrhotic patients: an inquiry on the role of executive control, attention orienting and focusing. *Metabolic Brain Disease*, 20(2), 115-127.



Andelman, F., Hoofien, D., Goldberg, I., Aizenstein, O., & Neufeld, M. Y. (2010). Bilateral hippocampal lesion and a selective impairment of the ability for mental time travel. *Neurocase*, 16(5), 426-435. <https://doi.org/10.1080/13554791003623318>

Andersen, K., Launer, L. J., Ott, A., Hoes, A. W., Breteler, M. M., & Hofman, A. (1995). Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease the risk for Alzheimer's disease? The Rotterdam Study. *Neurology*, 45(8), 1441-1445.

Anderson, S. A., Classey, J. D., Condé, F., Lund, J. S., & Lewis, D. A. (1995). Synchronous development of pyramidal neuron dendritic spines and parvalbumin-immunoreactive chandelier neuron axon terminals in layer III of monkey prefrontal cortex. *Neuroscience*, 67(1), 7-22.

Anthony, J. C., Breitner, J. C., Zandi, P. P., Meyer, M. R., Jurasova, I., Norton, M. C., & Stone, S. V. (2000). Reduced prevalence of AD in users of NSAIDs and H2 receptor antagonists: the Cache County study. *Neurology*, 54(11), 2066-2071.

Antoniades, C. G., Berry, P. A., Wendon, J. A., & Vergani, D. (2008). The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure. *Journal of Hepatology*, 49(5), 845-861. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.08.009>

Aoki, Y., Hirai, K., & Tanikawa, K. (1993). Mechanism of thrombocytopenia in liver cirrhosis: kinetics of indium-111 tropolone labelled platelets. *European Journal of Nuclear Medicine*, 20(2), 123-129.

Aseni, P., Frangi, M., Beati, C., Vertemati, M., & Romani, F. (1988). Is thrombocytopenia in liver failure dependent on an inadequate synthesis of thrombopoietic stimulating factor by the liver? *Medical Hypotheses*, 26(4), 217-219.

Ashburner, J. et al. (2013). SPM8 Manual. London: Institute of Neurology, UCL.

Astolfi, L., Cincotti, F., Mattia, D., Salinari, S., Babiloni, C., Basilisco, A., ... Babiloni, F. (2004). Estimation of the effective and functional human cortical connectivity with structural equation modeling and directed transfer function applied to high-resolution EEG. *Magnetic Resonance Imaging*, 22(10), 1457-1470. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2004.10.006>

Aviyente, S., Tootell, A., & Bernat, E. M. (2017). Time-frequency phase-synchrony approaches with ERPs. *International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology*, 111, 88-97. <https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2016.11.006>

Ayala Gómez, Adela-Emilia. (2012). Cirrosis Hepatica. *Farmacia Salud. Farmacia Abierta, Vol. 26, Núm. 4*. Recuperado de <https://es.scribd.com/document/338435374/Farma-Cirrosis-Hepatica>

**B**abiloni, C., Frisoni, G. B., Del Percio, C., Zanetti, O., Bonomini, C., Cassetta, E., ... Rossini, P. M. (2009). Ibuprofen treatment modifies cortical sources of EEG rhythms in mild Alzheimer's disease. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 120(4), 709-718. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2009.02.005>

Baccarani, U., Zola, E., Adani, G. L., Cavalletti, M., Schiff, S., Cagnin, A., ... Montagnese, S. (2010). Reversal of hepatic myelopathy after liver transplantation: Fifteen plus one. *Liver Transplantation*, 16(11), 1336-1337. <https://doi.org/10.1002/lt.22149>

Bajaj, J. S., Saeian, K., Schubert, C. M., Hafeezullah, M., Franco, J., Varma, R. R., ... Sanyal, A. J. (2009). Minimal hepatic encephalopathy is associated with motor vehicle crashes: the reality beyond the driving test. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(4), 1175-1183. <https://doi.org/10.1002/hep.23128>

- Bajaj, J. S., Wade, J. B., & Sanyal, A. J. (s. f.). Spectrum of neurocognitive impairment in cirrhosis: Implications for the assessment of hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 50(6), 2014-2021. <https://doi.org/10.1002/hep.23216>
- Baldeweg, T. (2006). Repetition effects to sounds: evidence for predictive coding in the auditory system. *Trends in Cognitive Sciences*, 10(3), 93-94. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2006.01.010>
- Balzano, T., Forteza, J., Molina, P., Giner, J., Monzó, A., Sancho-Jiménez, J., ... Felipo, V. (2018). The Cerebellum of Patients with Steatohepatitis Shows Lymphocyte Infiltration, Microglial Activation and Loss of Purkinje and Granular Neurons. *Scientific Reports*, 8(1), 3004. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21399-6>
- Barch, D. M., & Ceaser, A. (2012). Cognition in schizophrenia: core psychological and neural mechanisms. *Trends in Cognitive Sciences*, 16(1), 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.11.015>
- Barrett, G., Neshige, R., & Shibasaki, H. (1987). Human auditory and somatosensory event-related potentials: effects of response condition and age. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 66(4), 409-419.
- Basar, E., Basar-Eroglu, C., Karakas, S., & Schürmann, M. (1999). Oscillatory brain theory: a new trend in neuroscience. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine: The Quarterly Magazine of the Engineering in Medicine & Biology Society*, 18(3), 56-66.
- Başar-Eroglu, C., Başar, E., Demiralp, T., & Schürmann, M. (1992). P300-response: possible psychophysiological correlates in delta and theta frequency channels. A review. *International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology*, 13(2), 161-179.
- Bastos, A. M., Litvak, V., Moran, R., Bosman, C. A., Fries, P., & Friston, K. J. (2015). A DCM study of spectral asymmetries in feedforward and feedback connections between visual areas V1 and V4 in the monkey. *NeuroImage*, 108, 460-475. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.12.081>
- Begleiter, H., Porjesz, B., & Chou, C. L. (1981). Auditory brainstem potentials in chronic alcoholics. *Science (New York, N.Y.)*, 211(4486), 1064-1066.
- Belitski, A., Gretton, A., Magri, C., Murayama, Y., Montemurro, M. A., Logothetis, N. K., & Panzeri, S. (2008). Low-frequency local field potentials and spikes in primary visual cortex convey independent visual information. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(22), 5696-5709. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0009-08.2008>
- Benedet, M. J. & Alejandre, M. Á. (s. f.). Test de Aprendizaje Verbal España-Complutense: manual, 2ª rev. TEA ediciones, Madrid (2014).
- Bentle, L. A., & Lardy, H. A. (1976). Interaction of anions and divalent metal ions with phosphoenolpyruvate carboxykinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 251(10), 2916-2921.
- Bickford, R. G., & Butt, H. R. (1955). Hepatic Coma: The Electroencephalographic Pattern. *The Journal of Clinical Investigation*, 34(6), 790-799. <https://doi.org/10.1172/JCI103134>
- Birn, R. M., Smith, M. A., Jones, T. B., & Bandettini, P. A. (2008). The respiration response function: the temporal dynamics of fMRI signal fluctuations related to changes in respiration. *NeuroImage*, 40(2), 644-654. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.11.059>
- Biswal, B., Yetkin, F. Z., Haughton, V. M., & Hyde, J. S. (1995). Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*, 34(4), 537-541.

- Blauenfeldt, R. A., Olesen, S. S., Hansen, J. B., Graversen, C., & Drewes, A. M. (2010). Abnormal brain processing in hepatic encephalopathy: evidence of cerebral reorganization? *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 22(11), 1323-1330. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e32833d4717>
- Blei, A. T. (s. f.). Advances in hepatic encephalopathy and metabolic nitrogen exchange. Edited by Livio Capocaccia, Manuela Merli, and Oliviero Riggio, 630 Pp. Boca Raton: CRC Press, 1995. \$199.95. *Hepatology*, 22(6), 1891-1891. <https://doi.org/10.1002/hep.1840220642>
- Bode, C., Kugler, V., & Bode, J. C. (1987). Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. *Journal of Hepatology*, 4(1), 8-14.
- Bonanni, L., Thomas, A., Tiraboschi, P., Perfetti, B., Varanese, S., & Onofri, M. (2008). EEG comparisons in early Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia patients with a 2-year follow-up. *Brain*, 131(3), 690-705. <https://doi.org/10.1093/brain/awm322>
- Bone, R. C. (1996). Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Annals of Internal Medicine*, 125(8), 680-687.
- Bonhomme, V., & Hans, P. (2004). Monitoring depth of anaesthesia: is it worth the effort? *European Journal of Anaesthesiology*, 21(6), 423-428.
- Boyer, L., Richieri, R., Dassa, D., Boucekine, M., Fernandez, J., Vaillant, F., ... Lancon, C. (2013). Association of metabolic syndrome and inflammation with neurocognition in patients with schizophrenia. *Psychiatry Research*, 210(2), 381-386. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2013.06.020>
- Braff, D. L., Geyer, M. A., & Swerdlow, N. R. (2001). Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology*, 156(2-3), 234-258.
- Bragin, A., Jandó, G., Nádasdy, Z., Hetke, J., Wise, K., & Buzsáki, G. (1995). Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(1 Pt 1), 47-60.
- Brecher, M., Porjesz, B., & Begleiter, H. (1987). The N2 component of the event-related potential in schizophrenic patients. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 66(4), 369-375.
- Brito, G. N., Thomas, G. J., Davis, B. J., & Gingold, S. I. (1982). Prelimbic cortex, mediodorsal thalamus, septum, and delayed alternation in rats. *Experimental Brain Research*, 46(1), 52-58.
- Broe, G. A., Grayson, D. A., Creasey, H. M., Waite, L. M., Casey, B. J., Bennett, H. P., ... Halliday, G. M. (2000). Anti-inflammatory drugs protect against Alzheimer disease at low doses. *Archives of Neurology*, 57(11), 1586-1591.
- Butterworth, R. F. (1996). The neurobiology of hepatic encephalopathy. *Seminars in Liver Disease*, 16(3), 235-244. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1007236>
- Buzsáki, G. (2002). Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron*, 33(3), 325-340. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00586-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00586-X)
- Buzsaki, G. (2011). *Rhythms of the Brain*. Oxford, New York: Oxford University Press.

- Cabrera-Pastor, A., Balzano, T., Hernández-Rabaza, V., Malaguarnera, M., Llansola, M., & Felipo, V. (2018). Increasing extracellular cGMP in cerebellum in vivo reduces neuroinflammation, GABAergic tone and motor in-coordination in hyperammonemic rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 69, 386-398. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.12.013>
- Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., & Felipo, V. (2016). Hyperammonemia alters glycinergic neurotransmission and modulation of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway by extracellular glycine in cerebellum in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 137(4), 539-548. <https://doi.org/10.1111/jnc.13579>
- Cabrera-Pastor, A., Taoro-González, L., López-Merino, E., Celma, F., Llansola, M., & Felipo, V. (2018). Chronic hyperammonemia alters in opposite ways membrane expression of GluA1 and GluA2 AMPA receptor subunits in cerebellum. Molecular mechanisms involved. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1864(1), 286-295. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.10.031>
- Caggiano, A. O., & Kraig, R. P. (1996). Eicosanoids and nitric oxide influence induction of reactive gliosis from spreading depression in microglia but not astrocytes. *The Journal of Comparative Neurology*, 369(1), 93-108. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960520\)369:1<AID-CNE7>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960520)369:1<AID-CNE7>3.0.CO;2-F)
- Cagnin, A., Taylor-Robinson, S. D., Forton, D. M., & Banati, R. B. (2006). In vivo imaging of cerebral «peripheral benzodiazepine binding sites» in patients with hepatic encephalopathy. *Gut*, 55(4), 547-553. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.075051>
- Cauda, F., D'Agata, F., Sacco, K., Duca, S., Geminiani, G., & Vercelli, A. (2011). Functional connectivity of the insula in the resting brain. *NeuroImage*, 55(1), 8-23. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.11.049>
- Cauli, O., Llansola, M., Erceg, S., & Felipo, V. (2006). Hypolocomotion in rats with chronic liver failure is due to increased glutamate and activation of metabotropic glutamate receptors in substantia nigra. *Journal of Hepatology*, 45(5), 654-661. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.06.019>
- Cauli, O., Mansouri, M. T., Agusti, A., & Felipo, V. (2009). Hyperammonemia increases GABAergic tone in the cerebellum but decreases it in the rat cortex. *Gastroenterology*, 136(4), 1359-1367, e1-2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.12.057>
- Cauli, O., Rodrigo, R., Llansola, M., Montoliu, C., Monfort, P., Piedrafita, B., ... Felipo, V. (2009). Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 24(1), 69-80. <https://doi.org/10.1007/s11011-008-9115-4>
- Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Boix, J., & Felipo, V. (2007). Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 46(2), 514-519. <https://doi.org/10.1002/hep.21734>
- Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Llansola, M., Mansouri, M. T., & Felipo, V. (2009). Neuroinflammation contributes to hypokinesia in rats with hepatic encephalopathy: ibuprofen restores its motor activity. *Journal of Neuroscience Research*, 87(6), 1369-1374. <https://doi.org/10.1002/jnr.21947>
- Cavanna, A. E., & Trimble, M. R. (2006). The precuneus: a review of its functional anatomy and behavioural correlates. *Brain: A Journal of Neurology*, 129(Pt 3), 564-583. <https://doi.org/10.1093/brain/awl004>

- Cervenka, M. C., Nagle, S., & Boatman-Reich, D. (2011). Cortical High-Gamma Responses in Auditory Processing. *American journal of audiology*, 20(2). [https://doi.org/10.1044/1059-0889\(2011/10-0036\)](https://doi.org/10.1044/1059-0889(2011/10-0036))
- Chang, C., Cunningham, J. P., & Glover, G. H. (2009). Influence of heart rate on the BOLD signal: the cardiac response function. *NeuroImage*, 44(3), 857-869. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.09.029>
- Chao-Gan, Y., & Yu-Feng, Z. (2010). DPARSF: A MATLAB Toolbox for «Pipeline» Data Analysis of Resting-State fMRI. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 4, 13. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2010.00013>
- Chen, H.-J., Chen, Q.-F., Liu, J., & Shi, H.-B. (2016). Aberrant salience network and its functional coupling with default and executive networks in minimal hepatic encephalopathy: a resting-state fMRI study. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep27092>
- Chen, H.-J., Jiang, L.-F., Sun, T., Liu, J., Chen, Q.-F., & Shi, H.-B. (2015). Resting-state functional connectivity abnormalities correlate with psychometric hepatic encephalopathy score in cirrhosis. *European Journal of Radiology*, 84(11), 2287-2295. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2015.08.005>
- Chen, H.-J., Jiao, Y., Zhu, X.-Q., Zhang, H.-Y., Liu, J.-C., Wen, S., & Teng, G.-J. (2013). Brain dysfunction primarily related to previous overt hepatic encephalopathy compared with minimal hepatic encephalopathy: resting-state functional MR imaging demonstration. *Radiology*, 266(1), 261-270. <https://doi.org/10.1148/radiol.12120026>
- Chen, H.-J., Wang, Y., Zhu, X.-Q., Li, P.-C., & Teng, G.-J. (2014). Classification of Cirrhotic Patients with or without Minimal Hepatic Encephalopathy and Healthy Subjects Using Resting-State Attention-Related Network Analysis. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089684>
- Chen, H.-J., Zhu, X.-Q., Jiao, Y., Li, P.-C., Wang, Y., & Teng, G.-J. (2012). Abnormal baseline brain activity in low-grade hepatic encephalopathy: A resting-state fMRI study. *Journal of the Neurological Sciences*, 318(1), 140-145. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.02.019>
- Chen, H.-J., Zhu, X.-Q., Shu, H., Yang, M., Zhang, Y., Ding, J., ... Teng, G.-J. (2012). Structural and functional cerebral impairments in cirrhotic patients with a history of overt hepatic encephalopathy. *European Journal of Radiology*, 81(10), 2463-2469. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2011.10.008>
- Chen, H.-J., Zhu, X.-Q., Yang, M., Liu, B., Zhang, Y., Wang, Y., & Teng, G.-J. (2012). Changes in the regional homogeneity of resting-state brain activity in minimal hepatic encephalopathy. *Neuroscience Letters*, 507(1), 5-9. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.11.033>
- Chen, Q.-F., Chen, H.-J., Liu, J., Sun, T., & Shen, Q.-T. (2016). Machine Learning Classification of Cirrhotic Patients with and without Minimal Hepatic Encephalopathy Based on Regional Homogeneity of Intrinsic Brain Activity. *PloS One*, 11(3), e0151263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151263>
- Cheng, Y., Huang, L.-X., Zhang, L., Ma, M., Xie, S.-S., Ji, Q., ... Shen, W. (2017). Longitudinal Intrinsic Brain Activity Changes in Cirrhotic Patients before and One Month after Liver Transplantation. *Korean Journal of Radiology*, 18(2), 370-377. <https://doi.org/10.3348/kjr.2017.18.2.370>
- Cherniack, E. P. (2012). A berry thought-provoking idea: the potential role of plant polyphenols in the treatment of age-related cognitive disorders. *The British Journal of Nutrition*, 108(5), 794-800. <https://doi.org/10.1017/S0007114512000669>
- Child, C. G., & Turcotte, J. G. (1964). Surgery and portal hypertension. *Major Problems in Clinical Surgery*, 1, 1-85.



- Chitty, K. M., Lagopoulos, J., Hickie, I. B., & Hermens, D. F. (2015). Hippocampal glutamatergic/NMDA receptor functioning in bipolar disorder: A study combining mismatch negativity and proton magnetic resonance spectroscopy. *Psychiatry Research*, 233(2), 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.05.002>
- Chu, N. S., & Yang, S. S. (1987). Brain-stem auditory evoked potentials in different types of hepatic diseases. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 67(4), 337-339.
- Chu, N.-S., & Yang, S.-S. (1988). Portal-systemic encephalopathy: alterations in somatosensory and brainstem auditory evoked potentials. *Journal of the Neurological Sciences*, 84(1), 41-50. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(88\)90172-4](https://doi.org/10.1016/0022-510X(88)90172-4)
- Chu, N.-S., Yang, S.-S., & Liaw, Y.-F. (1997). Evoked potentials in liver diseases. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 12(9-10). <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.1997.tb00512.x>
- Churchwell, J. C., Morris, A. M., Musso, N. D., & Kesner, R. P. (2010). Prefrontal and hippocampal contributions to encoding and retrieval of spatial memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(3), 415-421. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.12.008>
- Ciaramelli, E., Grady, C. L., & Moscovitch, M. (2008). Top-down and bottom-up attention to memory: a hypothesis (AtoM) on the role of the posterior parietal cortex in memory retrieval. *Neuropsychologia*, 46(7), 1828-1851. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2008.03.022>
- Clemmesen, J. O., Larsen, F. S., Kondrup, J., Hansen, B. A., & Ott, P. (1999). Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 29(3), 648-653. <https://doi.org/10.1002/hep.510290309>
- Compañy, L., Zapater, P., Pérez-Mateo, M., & Jover, R. (2010). Extrapyrarnidal signs predict the development of overt hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 22(5), 519-525. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e328333df0f>
- Cooper, A. J. (1993). Ammonia metabolism in mammals: interorgan relationships. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 341, 21-37.
- Cooper, R, Osselton J. W, & Shaw J. C. (1980). *EEG technology*. Butterworths, London 3rd Ed. Recuperado de <https://www.alibris.com/EEG-technology-R-Cooper/book/1914811>
- Corbetta, M., & Shulman, G. L. (2002). Control of goal-directed and stimulus-driven attention in the brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 3(3), 201-215. <https://doi.org/10.1038/nrn755>
- Córdoba, J., Alonso, J., Rovira, A., Jacas, C., Sanpedro, F., Castells, L., ... Guardia, J. (2001). The development of low-grade cerebral edema in cirrhosis is supported by the evolution of (1)H-magnetic resonance abnormalities after liver transplantation. *Journal of Hepatology*, 35(5), 598-604.
- Córdoba, J., Cabrera, J., Lataif, L., Penev, P., Zee, P., & Blei, A. T. (1998). High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 27(2), 339-345. <https://doi.org/10.1002/hep.510270204>
- Córdoba, J., Olivé, G., Alonso, J., Rovira, A., Segarra, A., Pérez, M., ... Vargas, V. (2001). Improvement of magnetic resonance spectroscopic abnormalities but not pallidal hyperintensity followed amelioration of hepatic encephalopathy after occlusion of a large spleno-renal shunt. *Journal of Hepatology*, 34(1), 176-178.
- Córdoba, Juan. (2011). New assessment of hepatic encephalopathy. *Journal of Hepatology*, 54(5), 1030-1040. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.015>

Córdoba, Juan, & Mínguez, B. (2008). Hepatic encephalopathy. *Seminars in Liver Disease*, 28(1), 70-80. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1040322>

Córdoba, Juan, Ragner, N., Flavià, M., Vargas, V., Jacas, C., Alonso, J., & Rovira, A. (2003). T2 hyperintensity along the cortico-spinal tract in cirrhosis relates to functional abnormalities. *Hepatology*, 38(4), 1026-1033. <https://doi.org/10.1002/hep.1840380429>

Correia, S., Cohen, R., Gongvatana, A., Ross, S., Olchowski, J., Devlin, K., ... Delamonte, S. (2013). Relationship of plasma cytokines and clinical biomarkers to memory performance in HIV. *Journal of Neuroimmunology*, 265(1-2), 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.09.005>

Crone, N. E., Boatman, D., Gordon, B., & Hao, L. (2001). Induced electrocorticographic gamma activity during auditory perception. *Clinical Neurophysiology*, 112(4), 565-582. [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(00\)00545-9](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(00)00545-9)

da Matta, S. M., Janaina Matos, M., Kummer, A. M. E., Barbosa, I. G., Teixeira, A. L., & Silva, A. C. S. E. (2014). Cognitive alterations in chronic kidney disease: an update. *Jornal Brasileiro De Nefrologia: 'Orgao Oficial De Sociedades Brasileira E Latino-Americana De Nefrologia*, 36(2), 241-245.

**D**adsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Agusti, A., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., ... Felipo, V. (2016a). Infliximab reduces peripheral inflammation, neuroinflammation, and extracellular GABA in the cerebellum and improves learning and motor coordination in rats with hepatic encephalopathy. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 245. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0710-8>

Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernandez-Rabaza, V., ... Felipo, V. (2016b). Reducing Peripheral Inflammation with Infliximab Reduces Neuroinflammation and Improves Cognition in Rats with Hepatic Encephalopathy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9, 106. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00106>

Daniela Mapelli, P. Iannizzi, & A. Biancardi. (2006). Neuropsychological dysfunction in minimal hepatic encephalopathy: A review compared with own experience (pp. 467-473). Presentado en Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism, Dordrecht, The Netherlands: Springer, Dordrecht.

Davenport, A., & Bramley, P. N. (1993). Cerebral function analyzing monitor and visual evoked potentials as a noninvasive method of detecting cerebral dysfunction in patients with acute hepatic and renal failure treated with intermittent machine hemofiltration. *Renal Failure*, 15(4), 515-522.

Dawson, G. D. (1951). A summation technique for detecting small signals in a large irregular background. *The Journal of Physiology*, 115(1), 2p-3p.

D.C. Delis, J.H. Kramer, E. Kaplan, & B.A. Ober. (1987). *California Verbal Learning Test: Adult version. Manual*. Psychological Corporation, San Antonio, TX.

de Groot, J. C., de Leeuw, F. E., Oudkerk, M., van Gijn, J., Hofman, A., Jolles, J., & Breteler, M. M. (2000). Cerebral white matter lesions and cognitive function: the Rotterdam Scan Study. *Annals of Neurology*, 47(2), 145-151.

De Luca, M., Smith, S., De Stefano, N., Federico, A., & Matthews, P. M. (2005). Blood oxygenation level dependent contrast resting state networks are relevant to functional activity in the neocortical sensorimotor system. *Experimental Brain Research*, 167(4), 587-594. <https://doi.org/10.1007/s00221-005-0059-1>

Delis, D., Kramer, J., Kaplan, E. & Ober, B. (s. f.). *The California Verbal Learning Test: Adult version. Manual*. New York: Psychological Corporation (1987).

- Demiralp, T., Ademoglu, A., Comerchero, M., & Polich, J. (2001). Wavelet analysis of P3a and P3b. *Brain Topography*, 13(4), 251-267.
- Demiralp, T., Ademoglu, A., Istefanopoulos, Y., Başar-Eroglu, C., & Başar, E. (2001). Wavelet analysis of oddball P300. *International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology*, 39(2-3), 221-227.
- Dhiman, R. K., & Chawla, Y. K. (2009). Minimal hepatic encephalopathy. *Indian Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Indian Society of Gastroenterology*, 28(1), 5-16. <https://doi.org/10.1007/s12664-009-0003-6>
- Díaz-Gerevini, G. T., Repossi, G., Dain, A., Tarres, M. C., Das, U. N., & Eynard, A. R. (2014). Cognitive and motor perturbations in elderly with longstanding diabetes mellitus. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 30(6), 628-635. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.11.007>
- Doege, K., Bates, A. T., White, T. P., Das, D., Boks, M. P., & Liddle, P. F. (2009). Reduced event-related low frequency EEG activity in schizophrenia during an auditory oddball task. *Psychophysiology*, 46(3), 566-577. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.2009.00785.x>
- Doeller, C. F., Opitz, B., Mecklinger, A., Krick, C., Reith, W., & Schröger, E. (2003). Prefrontal cortex involvement in preattentive auditory deviance detection: neuroimaging and electrophysiological evidence. *NeuroImage*, 20(2), 1270-1282. [https://doi.org/10.1016/S1053-8119\(03\)00389-6](https://doi.org/10.1016/S1053-8119(03)00389-6)
- Dumuis, A., Sebben, M., Haynes, L., Pin, J. P., & Bockaert, J. (1988). NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature*, 336(6194), 68-70. <https://doi.org/10.1038/336068a0>
- Dumuis, Aline, Pin, J. P., Oomagari, K., Sebben, M., & Bockaert, J. (1990). Arachidonic acid released from striatal neurons by joint stimulation of ionotropic and metabotropic quisqualate receptors. *Nature*, 347(6289), 182-184. <https://doi.org/10.1038/347182a0>
- Dürschmid, S., Edwards, E., Reichert, C., Dewar, C., Hinrichs, H., Heinze, H.-J., ... Knight, R. T. (2016). Hierarchy of prediction errors for auditory events in human temporal and frontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(24), 6755-6760. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525030113>
- Duva, C. A., Floresco, S. B., Wunderlich, G. R., Lao, T. L., Pinel, J. P., & Phillips, A. G. (1997). Disruption of spatial but not object-recognition memory by neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus in rats. *Behavioral Neuroscience*, 111(6), 1184-1196.
- E**dwards, E., Soltani, M., Deouell, L. Y., Berger, M. S., & Knight, R. T. (2005). High gamma activity in response to deviant auditory stimuli recorded directly from human cortex. *Journal of Neurophysiology*, 94(6), 4269-4280. <https://doi.org/10.1152/jn.00324.2005>
- Elfferich, M. D., Nelemans, P. J., Ponds, R. W., De Vries, J., Wijnen, P. A., & Drent, M. (2010). Everyday cognitive failure in sarcoidosis: the prevalence and the effect of anti-TNF-alpha treatment. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*, 80(3), 212-219. <https://doi.org/10.1159/000314225>
- Elias, E. (1979). The Hepatic Coma Syndromes and Lactulose. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 52(5), 487-488.
- Elithorn, A., Lunzer, M., & Weinman, J. (1975). Cognitive deficits associated with chronic hepatic encephalopathy and their response to levodopa. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 38(8), 794-798.



El-Mlili, N., Rodrigo, R., Naghizadeh, B., Cauli, O., & Felipo, V. (2008). Chronic hyperammonemia reduces the activity of neuronal nitric oxide synthase in cerebellum by altering its localization and increasing its phosphorylation by calcium-calmodulin kinase II. *Journal of Neurochemistry*, 106(3), 1440-1449. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05495.x>

Engel, A. K., Fries, P., & Singer, W. (2001). Dynamic predictions: Oscillations and synchrony in top-down processing. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(10), 704-716. <https://doi.org/10.1038/35094565>

Erceg, S., Monfort, P., Hernandez-Viadel, M., Llansola, M., Montoliu, C., & Felipo, V. (2005). Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain Research*, 1036(1-2), 115-121. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.12.045>

Erceg, S., Monfort, P., Hernández-Viadel, M., Rodrigo, R., Montoliu, C., & Felipo, V. (2005). Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 41(2), 299-306. <https://doi.org/10.1002/hep.20565>

**F**. Mauguière, C. Fischer, & N. André-Obadia. (2004). Potentiels évoqués en neurologie: réponses pathologiques et indications. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Neurologie, 17-031-B-11, 2007.*

Fan, P., Lavoie, J., Lé, N. L., Szerb, J. C., & Butterworth, R. F. (1990). Neurochemical and electrophysiological studies on the inhibitory effect of ammonium ions on synaptic transmission in slices of rat hippocampus: evidence for a postsynaptic action. *Neuroscience*, 37(2), 327-334.

Fedele, D., Martini, A., Cardone, C., Comacchio, F., Bellavere, F., Molinari, G., ... Crepaldi, G. (1984). Impaired auditory brainstem-evoked responses in insulin-dependent diabetic subjects. *Diabetes*, 33(11), 1085-1089.

Felipo, V. (2013). Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(12), 851-858. <https://doi.org/10.1038/nrn3587>

Felipo, V., & Butterworth, R. F. (2002). Neurobiology of ammonia. *Progress in Neurobiology*, 67(4), 259-279.

Felipo, V., Ordoño, J. F., Urios, A., El Mlili, N., Giménez-Garzó, C., Aguado, C., ... Montoliu, C. (2012). Patients with minimal hepatic encephalopathy show impaired mismatch negativity correlating with reduced performance in attention tests. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 55(2), 530-539. <https://doi.org/10.1002/hep.24704>

Felipo, V., Urios, A., Montesinos, E., Molina, I., Garcia-Torres, M. L., Civera, M., ... Montoliu, C. (2012). Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 27(1), 51-58. <https://doi.org/10.1007/s11011-011-9269-3>

Felipo, V., Urios, A., Valero, P., Sánchez, M., Serra, M. A., Pareja, I., ... Montoliu, C. (2013). Serum nitrotyrosine and psychometric tests as indicators of impaired fitness to drive in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 33(10), 1478-1489. <https://doi.org/10.1111/liv.12206>

Ferenci, P., Lockwood, A., Mullen, K., Tarter, R., Weissenborn, K., & Blei, A. T. (2002). Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 35(3), 716-721. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.31250>

- Ferreira-Netto, C., Borelli, K. G., & Brandão, M. L. (2007). Distinct Fos expression in the brain following freezing behavior elicited by stimulation with NMDA of the ventral or dorsal inferior colliculus. *Experimental Neurology*, 204(2), 693-704. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.12.023>
- Floresco, S. B., Seamans, J. K., & Phillips, A. G. (1997). Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(5), 1880-1890.
- Földy, C., Dyhrfeld-Johnsen, J., & Soltesz, I. (2005). Structure of cortical microcircuit theory. *The Journal of Physiology*, 562(Pt 1), 47-54. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.076448>
- Fox, M. D., Corbetta, M., Snyder, A. Z., Vincent, J. L., & Raichle, M. E. (2006). Spontaneous neuronal activity distinguishes human dorsal and ventral attention systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), 10046-10051. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604187103>
- Fox, M. D., & Greicius, M. (2010). Clinical applications of resting state functional connectivity. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 4, 19. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2010.00019>
- Fox, M. D., & Raichle, M. E. (2007). Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(9), 700-711. <https://doi.org/10.1038/nrn2201>
- Freund, T. F., & Antal, M. (1988). GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature*, 336(6195), 170-173. <https://doi.org/10.1038/336170a0>
- Friedman, S., Schiano, T. 2004. Cirrhosis and its sequelae. In: Goldman L, Ausiello D, eds. Cecil Textbook of Medicine. 22nd ed. Philadelphia, Pa.: Saunders. 936-44. (s. f.).
- Fries, P. (2015). Rhythms for Cognition: Communication through Coherence. *Neuron*, 88(1), 220-235. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.034>
- Friston, K. (2003). Learning and inference in the brain. *Neural Networks: The Official Journal of the International Neural Network Society*, 16(9), 1325-1352. <https://doi.org/10.1016/j.neunet.2003.06.005>
- Friston, K. (2005). A theory of cortical responses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360(1456), 815-836. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1622>
- Friston, K. J., Frith, C. D., Liddle, P. F., & Frackowiak, R. S. (1993). Functional connectivity: the principal-component analysis of large (PET) data sets. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 13(1), 5-14. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.4>
- Friston K. J., Holmes A. P., Worsley K. J., Poline J.-P., Frith C. D., & Frackowiak R. S. J. (2004). Statistical parametric maps in functional imaging: A general linear approach. *Human Brain Mapping*, 2(4), 189-210. <https://doi.org/10.1002/hbm.460020402>
- Friston, Karl J. (1994). Functional and effective connectivity in neuroimaging: A synthesis. *Human Brain Mapping*, 2(1-2), 56-78. <https://doi.org/10.1002/hbm.460020107>
- Fruhauf, N. R., Radunz, S., Grabellus, F., Laube, T., Uerschels, A. K., & Kaiser, G. M. (2011). Neuromonitoring in a porcine model of acute hepatic failure. *Laboratory Animals*, 45(3), 174-178. <https://doi.org/10.1258/la.2011.010083>

- G**alambos, J. T. (1979). The hepatic coma syndromes and lactulose: By H. O. Conn and M. M. Lieberthal. 419 pp., \$42.00. Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland. *Gastroenterology*, 77(6), 1360. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:0016508579901914>
- Gallai, V., Alberti, A., Balò, S., Mazzotta, G., Clerici, C., Gentili, G., ... Morelli, A. (1995). Cognitive event-related potential in hepatic encephalopathy. *Acta Neurologica Scandinavica*, 91(5), 358-361. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1995.tb07021.x>
- García Martínez, R., Rovira, A., Alonso, J., Aymerich, F. X., Huerga, E., Jacas, C., ... Córdoba, J. (2010). A long-term study of changes in the volume of brain ventricles and white matter lesions after successful liver transplantation. *Transplantation*, 89(5), 589-594. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181ca7bb3>
- García-García, R., Cruz-Gómez, Á. J., Mangas-Losada, A., Urios, A., Forn, C., Escudero-García, D., ... Montoliu, C. (2017). Reduced resting state connectivity and gray matter volume correlate with cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *PloS One*, 12(10), e0186463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186463>
- García-Martínez, R., Rovira, A., Alonso, J., Jacas, C., Simón-Talero, M., Chavarria, L., ... Córdoba, J. (2011). Hepatic encephalopathy is associated with posttransplant cognitive function and brain volume. *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 17(1), 38-46. <https://doi.org/10.1002/lt.22197>
- Garrido, M. I., Kilner, J. M., Kiebel, S. J., & Friston, K. J. (2009). Dynamic causal modeling of the response to frequency deviants. *Journal of Neurophysiology*, 101(5), 2620-2631. <https://doi.org/10.1152/jn.90291.2008>
- Gazzard, B. G., Price, H., & Dawson, A. M. (1986). Detection of hepatic encephalopathy. *Postgraduate Medical Journal*, 62(725), 163-166.
- Geissler, A., Lock, G., Fründ, R., Held, P., Hollerbach, S., Andus, T., ... Holstege, A. (1997). Cerebral abnormalities in patients with cirrhosis detected by proton magnetic resonance spectroscopy and magnetic resonance imaging. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 25(1), 48-54. <https://doi.org/10.1053/jhep.1997.v25.pm0008985263>
- Gerok, W., & Häussinger, D. (1984). [Ammonium detoxication and pH regulation by the liver]. *Die Medizinische Welt*, 35(1-2), 28-34.
- Giard, M. H., Perrin, F., Pernier, J., & Bouchet, P. (1990). Brain generators implicated in the processing of auditory stimulus deviance: a topographic event-related potential study. *Psychophysiology*, 27(6), 627-640.
- Gibson, G. E., Zimmer, A., Krook, L., Richardson, E. P., & Visek, W. J. (1974). Brain histology and behavior of mice injected with urease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 33(2), 201-211.
- Gierse, J. K., Hauser, S. D., Creely, D. P., Koboldt, C., Rangwala, S. H., Isakson, P. C., & Seibert, K. (1995). Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclooxygenase. *The Biochemical Journal*, 305 ( Pt 2), 479-484.
- Giguère, J. F., Hamel, E., & Butterworth, R. F. (1992). Increased densities of binding sites for the «peripheral-type» benzodiazepine receptor ligand [3H]PK 11195 in rat brain following portacaval anastomosis. *Brain Research*, 585(1-2), 295-298.

- Gilberstadt, S. J., Gilberstadt, H., Zieve, L., Buegel, B., Collier, R. O., & McClain, C. J. (1980). Psychomotor performance defects in cirrhotic patients without overt encephalopathy. *Archives of Internal Medicine*, 140(4), 519-521.
- Giménez-Garzó, C., Garcés, J. J., Urios, A., Mangas-Losada, A., García-García, R., González-López, O., ... Montoliu, C. (2017). The PHES battery does not detect all cirrhotic patients with early neurological deficits, which are different in different patients. *PLOS ONE*, 12(2), e0171211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171211>
- Girón-González, J. A., Martínez-Sierra, C., Rodríguez-Ramos, C., Macías, M. A., Rendón, P., Díaz, F., ... Martín-Herrera, L. (2004). Implication of inflammation-related cytokines in the natural history of liver cirrhosis. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 24(5), 437-445. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2004.0951.x>
- Gloveli, T., Dugladze, T., Saha, S., Monyer, H., Heinemann, U., Traub, R. D., ... Buhl, E. H. (2005). Differential involvement of oriens/pyramidal interneurons in hippocampal network oscillations in vitro. *The Journal of Physiology*, 562(Pt 1), 131-147. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.073007>
- Goldberger, A. L., Peng, C.-K., & Lipsitz, L. A. (2002). What is physiologic complexity and how does it change with aging and disease? *Neurobiology of Aging*, 23(1), 23-26. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(01\)00266-4](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00266-4)
- González Torre, J. A., Cruz-Gómez, Á. J., Belenguier, A., Sanchis-Segura, C., Ávila, C., & Forn, C. (2017). Hippocampal dysfunction is associated with memory impairment in multiple sclerosis: A volumetric and functional connectivity study. *Multiple Sclerosis Journal*, 23(14), 1854-1863. <https://doi.org/10.1177/1352458516688349>
- Goodin, D. S., & Aminoff, M. J. (1986). Electrophysiological differences between subtypes of dementia. *Brain: A Journal of Neurology*, 109 ( Pt 6), 1103-1113.
- Götz, T., Huonker, R., Kranczioch, C., Reuken, P., Witte, O. W., Günther, A., & Debener, S. (2013). Impaired evoked and resting-state brain oscillations in patients with liver cirrhosis as revealed by magnetoencephalography. *NeuroImage: Clinical*, 2, 873-882. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2013.06.003>
- Grimm, G., Madl, C., Katzenschlager, R., Oder, W., Ferenci, P., & Gangl, A. (1992). Detailed evaluation of evoked potentials in Wilson's disease. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 82(2), 119-124.
- Grimm, G., Oder, W., Prayer, L., Ferenci, P., & Madl, C. (1990). Evoked potentials in assessment and follow-up of patients with Wilson's disease. *Lancet (London, England)*, 336(8721), 963-964.
- Groeneweg, M., Quero, J. C., De Bruijn, I., Hartmann, I. J., Essink-bot, M. L., Hop, W. C., & Schalm, S. W. (1998). Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 28(1), 45-49. <https://doi.org/10.1002/hep.510280108>
- Guérit, J.-M. (1998). Neuromonitoring in the operating room: why, when, and how to monitor? *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 106(1), 1-21. [https://doi.org/10.1016/S0013-4694\(97\)00077-1](https://doi.org/10.1016/S0013-4694(97)00077-1)
- Guevara, M., Baccaro, M. E., Gómez-Ansón, B., Frisoni, G., Testa, C., Torre, A., ... Ginès, P. (2011). Cerebral magnetic resonance imaging reveals marked abnormalities of brain tissue density in patients with cirrhosis without overt hepatic encephalopathy. *Journal of Hepatology*, 55(3), 564-573. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.12.008>

Guevara, M., Baccaro, M. E., Torre, A., Gómez-Ansón, B., Ríos, J., Torres, F., ... Ginès, P. (2009). Hyponatremia is a risk factor of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a prospective study with time-dependent analysis. *The American Journal of Gastroenterology*, 104(6), 1382-1389. <https://doi.org/10.1038/ajg.2009.293>

**H**aenschel, C., Vernon, D. J., Dwivedi, P., Gruzelier, J. H., & Baldeweg, T. (2005). Event-related brain potential correlates of human auditory sensory memory-trace formation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(45), 10494-10501. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1227-05.2005>

Hammerich, L., & Tacke, F. (2014). Interleukins in chronic liver disease: lessons learned from experimental mouse models. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 7, 297-306. <https://doi.org/10.2147/CEG.S43737>

Harmony, T. (2013). The functional significance of delta oscillations in cognitive processing. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00083>

Harms, L., Fulham, W. R., Todd, J., Budd, T. W., Hunter, M., Meehan, C., ... Michie, P. T. (2014). Mismatch Negativity (MMN) in Freely-Moving Rats with Several Experimental Controls. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110892>

Hartmann, I. J., Groeneweg, M., Quero, J. C., Beijeman, S. J., de Man, R. A., Hop, W. C., & Schalm, S. W. (2000). The prognostic significance of subclinical hepatic encephalopathy. *The American Journal of Gastroenterology*, 95(8), 2029-2034. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2000.02265.x>

Hegedus, A. M., Tarter, R. E., Thiel, D. H. V., Schade, R. R., Gavaler, J. S., & Starzl, T. E. (1985). Neuropsychiatric Characteristics Associated with Primary Biliary Cirrhosis. *The International Journal of Psychiatry in Medicine*, 14(4), 303-314. <https://doi.org/10.2190/5UL2-FFMA-A4U4-CHBL>

Herbert, H., Aschoff, A., & Ostwald, J. (s. f.). Topography of projections from the auditory cortex to the inferior colliculus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 304(1), 103-122. <https://doi.org/10.1002/cne.903040108>

Hermenegildo, C., Marcaida, G., Montoliu, C., Grisolia, S., Miñana, M. D., & Felipo, V. (1996). NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. *Neurochemical Research*, 21(10), 1237-1244.

Hermenegildo, C., Montoliu, C., Llansola, M., Muñoz, M. D., Gaztelu, J. M., Miñana, M. D., & Felipo, V. (1998). Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo. *The European Journal of Neuroscience*, 10(10), 3201-3209.

Hernandez-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Gonzalez-Usano, A., Agusti, A., Balzano, T., ... Felipo, V. (2016a). Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarization of microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0549-z>

Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-González, L., Malaguarnera, M., Agustí, A., Llansola, M., & Felipo, V. (2016b). Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by sulforaphane. *Journal of Neuroinflammation*, 13, 41. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0505-y>



- Hilgier, W., Zielińska, M., Borkowska, H. D., Gadamski, R., Walski, M., Oja, S. S., ... Albrecht, J. (1999). Changes in the extracellular profiles of neuroactive amino acids in the rat striatum at the asymptomatic stage of hepatic failure. *Journal of Neuroscience Research*, 56(1), 76-84. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990401\)56:1<76::AID-JNR10>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990401)56:1<76::AID-JNR10>3.0.CO;2-Y)
- Hilsabeck, R. C., Perry, W., & Hassanein, T. I. (2002). Neuropsychological impairment in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 35(2), 440-446. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.31257>
- Himberg, J., Hyvärinen, A., & Esposito, F. (2004). Validating the independent components of neuroimaging time series via clustering and visualization. *NeuroImage*, 22(3), 1214-1222. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.03.027>
- Hotz, M. A., Ritz, R., Linder, L., Scollo-Lavizzari, G., & Haefeli, W. E. (2000). Auditory and electroencephalographic effects of midazolam and  $\alpha$ -hydroxy-midazolam in healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 49(1), 72-79. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2000.00104.x>
- Hourmand-Ollivier, I., Piquet, M.-A., Toudic, J. P., Denise, P., & Dao, T. (2006). Actigraphy: A new diagnostic tool for hepatic encephalopathy. *Journal of Gastroenterology*, 12(14), 2243-2244.
- Hovens, I. B., Schoemaker, R. G., van der Zee, E. A., Absalom, A. R., Heineman, E., & van Leeuwen, B. L. (2014). Postoperative cognitive dysfunction: Involvement of neuroinflammation and neuronal functioning. *Brain, Behavior, and Immunity*, 38, 202-210. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.02.002>
- Hsu, T.-W., Wu, C. W., Cheng, Y.-F., Chen, H.-L., Lu, C.-H., Cho, K.-H., ... Lin, C.-P. (2012). Impaired Small-World Network Efficiency and Dynamic Functional Distribution in Patients with Cirrhosis. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035266>
- Hyman, J. M., Zilli, E. A., Paley, A. M., & Hasselmo, M. E. (2005). Medial prefrontal cortex cells show dynamic modulation with the hippocampal theta rhythm dependent on behavior. *Hippocampus*, 15(6), 739-749. <https://doi.org/10.1002/hipo.20106>
- I**n 't Veld, B. A., Launer, L. J., Hoes, A. W., Ott, A., Hofman, A., Breteler, M. M., & Stricker, B. H. (1998). NSAIDs and incident Alzheimer's disease. The Rotterdam Study. *Neurobiology of Aging*, 19(6), 607-611.
- Insausti, A. M., Gaztelu, J. M., Gonzalo, L. M., Romero-Vives, M., Barrenechea, C., Felipo, V., & Insausti, R. (1997). Diet induced hyperammonemia decreases neuronal nuclear size in rat entorhinal cortex. *Neuroscience Letters*, 231(3), 179-181.
- Iwasa, M., Kinosada, Y., Nakatsuka, A., Watanabe, S., & Adachi, Y. (1999). Magnetization transfer contrast of various regions of the brain in liver cirrhosis. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 20(4), 652-654.
- J**ääskeläinen, I. P., Varonen, R., Näätänen, R., & Pekkonen, E. (1999). Decay of cortical pre-attentive sound discrimination in middle-age. *Neuroreport*, 10(1), 123-126.
- Jackson Beatty. (1995). Principles of Behavioral Neuroscience. WC Brown Communications.
- Jaime, S., Gu, H., Sadacca, B. F., Stein, E. A., Cavazos, J. E., Yang, Y., & Lu, H. (2017). Delta Rhythm Orchestrates the Neural Activity Underlying the Resting State BOLD Signal via Phase-amplitude Coupling. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 1-15. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx310>

- Javitt, D. C., Steinschneider, M., Schroeder, C. E., & Arezzo, J. C. (1996). Role of cortical N-methyl-D-aspartate receptors in auditory sensory memory and mismatch negativity generation: implications for schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(21), 11962-11967.
- Javitt, Daniel C., & Sweet, R. A. (2015). Auditory dysfunction in schizophrenia: integrating clinical and basic features. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(9), 535-550. <https://doi.org/10.1038/nrn4002>
- Jay, T. M., Glowinski, J., & Thierry, A. M. (1995). Inhibition of hippocampoprefrontal cortex excitatory responses by the mesocortical DA system. *Neuroreport*, 6(14), 1845-1848.
- Jay, T. M., & Witter, M. P. (1991). Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *The Journal of Comparative Neurology*, 313(4), 574-586. <https://doi.org/10.1002/cne.903130404>
- Jemel, B., Achenbach, C., Müller, B. W., Röpcke, B., & Oades, R. D. (2002). Mismatch negativity results from bilateral asymmetric dipole sources in the frontal and temporal lobes. *Brain Topography*, 15(1), 13-27.
- Jenne, C. N., & Kubes, P. (2013). Immune surveillance by the liver. *Nature Immunology*, 14(10), 996-1006. <https://doi.org/10.1038/ni.2691>
- Jiang, R., Tan, Z., Deng, L., Chen, Y., Xia, Y., Gao, Y., ... Sun, B. (2011). Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 54(3), 900-909. <https://doi.org/10.1002/hep.24486>
- Joebges, E. M., Heidemann, M., Schimke, N., Hecker, H., Ennen, J. C., & Weissenborn, K. (2003). Bradykinesia in minimal hepatic encephalopathy is due to disturbances in movement initiation. *Journal of Hepatology*, 38(3), 273-280.
- Jones, E. A., Giger-Mateeva, V. I., Reits, D., Riemsdag, F. C., Liberov, B., & Spekrijse, H. (2001). Visual event-related potentials in cirrhotic patients without overt encephalopathy: the effects of flumazenil. *Metabolic Brain Disease*, 16(1-2), 43-53.
- Jones, E. A., & Weissenborn, K. (1997). Neurology and the liver. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 63(3), 279-293.
- Jos J. Eggermont, Robert F Burkard, & Manuel Don. (2007). Auditory Evoked Potentials. Basic Principles and Clinical Application (1 st). Lippincott, Williams & Wilkins.
- Joseph, J.T and Cardozo, D.L. (2004). Functional Neuroanatomy: An Interactive Text and Manual. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 63(6), 677-677. <https://doi.org/10.1093/jnen/63.6.677-a>
- Jover, R., Compañy, L., Gutiérrez, A., Lorente, M., Zapater, P., Poveda, M. J., ... Pérez-Mateo, M. (2005). Clinical significance of extrapyramidal signs in patients with cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 42(5), 659-665. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.12.030>
- Jover, R., Compañy, L., Gutiérrez, A., Zapater, P., Pérez-Serra, J., Girona, E., ... Pérez-Mateo, M. (2003). Minimal hepatic encephalopathy and extrapyramidal signs in patients with cirrhosis. *The American Journal of Gastroenterology*, 98(7), 1599-1604. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2003.07528.x>
- Jover, R., Rodrigo, R., Felipo, V., Insausti, R., Sáez-Valero, J., García-Ayllón, M. S., ... Pérez-Mateo, M. (2006). Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced

hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(6), 1257-1266. <https://doi.org/10.1002/hep.21180>

**K**abali, B., Velayutham, G., & Kapali, S. C. (2014). Brainstem evoked response audiometry: an investigatory tool in detecting hepatic encephalopathy in decompensated chronic liver disease. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 58(1), 51-55.

Kaiser, A., & Schreiber, T. (2002). Information transfer in continuous processes. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 166(1), 43-62. [https://doi.org/10.1016/S0167-2789\(02\)00432-3](https://doi.org/10.1016/S0167-2789(02)00432-3)

Kale, R. A., Gupta, R. K., Saraswat, V. A., Hasan, K. M., Trivedi, R., Mishra, A. M., ... Narayana, P. A. (2006). Demonstration of interstitial cerebral edema with diffusion tensor MR imaging in type C hepatic encephalopathy. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(4), 698-706. <https://doi.org/10.1002/hep.21114>

Kamath, P. S., Wiesner, R. H., Malinchoc, M., Kremers, W., Therneau, T. M., Kosberg, C. L., ... Kim, W. R. (2001). A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 33(2), 464-470. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.22172>

Kamiński, M., Ding, M., Truccolo, W. A., & Bressler, S. L. (2001). Evaluating causal relations in neural systems: granger causality, directed transfer function and statistical assessment of significance. *Biological Cybernetics*, 85(2), 145-157. <https://doi.org/10.1007/s004220000235>

Karakaş, S., Erzençin, O. U., & Başar, E. (2000). A new strategy involving multiple cognitive paradigms demonstrates that ERP components are determined by the superposition of oscillatory responses. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 111(10), 1719-1732.

Kasai, K., Yamada, H., Kamio, S., Nakagome, K., Iwanami, A., Fukuda, M., ... Kato, N. (2002). Do high or low doses of anxiolytics and hypnotics affect mismatch negativity in schizophrenic subjects? An EEG and MEG study. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 113(1), 141-150.

Kaufmann, W. E., Worley, P. F., Pegg, J., Bremer, M., & Isakson, P. (1996). COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(6), 2317-2321.

Keiding, S., Sørensen, M., Bender, D., Munk, O. L., Ott, P., & Vilstrup, H. (2006). Brain metabolism of <sup>13</sup>N-ammonia during acute hepatic encephalopathy in cirrhosis measured by positron emission tomography. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(1), 42-50. <https://doi.org/10.1002/hep.21001>

Kellendonk, C., Simpson, E. H., Polan, H. J., Malleret, G., Vronskaya, S., Winiger, V., ... Kandel, E. R. (2006). Transient and selective overexpression of dopamine D2 receptors in the striatum causes persistent abnormalities in prefrontal cortex functioning. *Neuron*, 49(4), 603-615. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.01.023>

Kharbanda, P. S., & Prabhakar, S. (2004). Subclinical hepatic encephalopathy: Elusive 'gold standard'. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 19(1), 1-3. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2004.03290.x>

Kim, C. K., McGorray, S. P., Bartholomew, B. A., Marsh, M., Dicken, T., Wassertheil-Smoller, S., ... Sheps, D. S. (2005). Depressive Symptoms and Heart Rate Variability in Postmenopausal Women. *Archives of Internal Medicine*, 165(11), 1239-1244. <https://doi.org/10.1001/archinte.165.11.1239>



- Kim, D. H., Lipsitz, L. A., Ferrucci, L., Varadhan, R., Guralnik, J. M., Carlson, M. C., ... Chaves, P. H. M. (2006). Association Between Reduced Heart Rate Variability and Cognitive Impairment in Older Disabled Women in the Community: Women's Health and Aging Study I. *Journal of the American Geriatrics Society*, 54(11), 1751-1757. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2006.00940.x>
- Knyazev, G. G. (2012). EEG delta oscillations as a correlate of basic homeostatic and motivational processes. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36(1), 677-695. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.10.002>
- Ko, D., Kwon, S., Lee, G.-T., Im, C. H., Kim, K. H., & Jung, K.-Y. (2012). Theta Oscillation Related to the Auditory Discrimination Process in Mismatch Negativity: Oddball versus Control Paradigm. *Journal of Clinical Neurology (Seoul, Korea)*, 8(1), 35-42. <https://doi.org/10.3988/jcn.2012.8.1.35>
- Kobayashi, Y., & Isa, T. (2002). Sensory-motor gating and cognitive control by the brainstem cholinergic system. *Neural Networks: The Official Journal of the International Neural Network Society*, 15(4-6), 731-741.
- Koch, M. (1999). The neurobiology of startle. *Progress in Neurobiology*, 59(2), 107-128.
- Kochanek, K. D., Murphy, S. L., Xu, J., & Tejada-Vera, B. (2016). Deaths: Final Data for 2014. National Vital Statistics Reports: From the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System, 65(4), 1-122.
- Kok, A. (2000). Age-related changes in involuntary and voluntary attention as reflected in components of the event-related potential (ERP). *Biological Psychology*, 54(1), 107-143. [https://doi.org/10.1016/S0301-0511\(00\)00054-5](https://doi.org/10.1016/S0301-0511(00)00054-5)
- Kolios, G., Valatas, V., & Kouroumalis, E. (2006). Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 12(46), 7413-7420.
- Kono, I., Ueda, Y., Nakajima, K., Araki, K., Kagawa, K., & Kashima, K. (1994). Subcortical impairment in subclinical hepatic encephalopathy. *Journal of the Neurological Sciences*, 126(2), 162-167.
- Kramer, L., Bauer, E., Gendo, A., Funk, G., Madl, C., Pidlich, J., & Gangl, A. (2002). Neurophysiological evidence of cognitive impairment in patients without hepatic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *The American Journal of Gastroenterology*, 97(1), 162-166. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05441.x>
- Krieger, S., Jauss, M., Jansen, O., Stiehl, A., Sauer, P., Geissler, M., ... Krieger, D. (1997). MRI findings in chronic hepatic encephalopathy depend on portosystemic shunt: results of a controlled prospective clinical investigation. *Journal of Hepatology*, 27(1), 121-126.
- Krieger, S., Jauss, M., Jansen, O., Theilmann, L., Geissler, M., & Krieger, D. (1996). Neuropsychiatric profile and hyperintense globus pallidus on T1-weighted magnetic resonance images in liver cirrhosis. *Gastroenterology*, 111(1), 147-155.
- Kügler, C. F. A., Petter, J., Taghavy, A., Lotterer, E., Wensing, G., Hahn, E. G., & Fleig, W. E. (1994). Dynamics of cognitive brain dysfunction in patients with cirrhotic liver disease: an event-related P300 potential perspective. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 91(1), 33-41. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(94\)90016-7](https://doi.org/10.1016/0013-4694(94)90016-7)
- Kuhlbusch, R., Enck, P., & Häussinger, D. (1998). [Hepatic encephalopathy: neuropsychological and neurophysiological diagnosis]. *Zeitschrift Fur Gastroenterologie*, 36(12), 1075-1083.

- Kühn, S., Romanowski, A., Schubert, F., & Gallinat, J. (2012). Reduction of cerebellar grey matter in Crus I and II in schizophrenia. *Brain Structure & Function*, 217(2), 523-529. <https://doi.org/10.1007/s00429-011-0365-2>
- Kullmann, D. M. (2011). Interneuron networks in the hippocampus. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(5), 709-716. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.05.006>
- Kullmann, F., Hollerbach, S., Holstege, A., & Schölmerich, J. (1995). Subclinical hepatic encephalopathy: the diagnostic value of evoked potentials. *Journal of Hepatology*, 22(1), 101-110. [https://doi.org/10.1016/0168-8278\(95\)80267-3](https://doi.org/10.1016/0168-8278(95)80267-3)
- Kullmann, Frank, Hollerbach, Stephan, Lock, Guntram, Holstege, Axel, Dierks, Thomas, & Scholmerich, Jürgen. (2001). Brain electrical activity mapping of EEG for the diagnosis of (sub)clinical hepatic encephalopathy in chronic liver disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 13(5), 513-522.
- Kumar, S., Bonnici, H. M., Teki, S., Agus, T. R., Pressnitzer, D., Maguire, E. A., & Griffiths, T. D. (2014). Representations of specific acoustic patterns in the auditory cortex and hippocampus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1791). <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1000>
- Kurkela, J. L. O., Lipponen, A., Kyläheiko, I., & Astikainen, P. (2018). Electrophysiological evidence of memory-based detection of auditory regularity violations in anesthetized mice. *Scientific Reports*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21411-z>
- L**an, R. Y. Z., Salunga, T. L., Tsuneyama, K., Lian, Z.-X., Yang, G.-X., Hsu, W., ... Gershwin, M. E. (2009). Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *Journal of Autoimmunity*, 32(1), 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2008.11.001>
- Laneuville, O., Breuer, D. K., Dewitt, D. L., Hla, T., Funk, C. D., & Smith, W. L. (1994). Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 271(2), 927-934.
- Lario, M., Muñoz, L., Ubeda, M., Borrero, M.-J., Martínez, J., Monserrat, J., ... Albillos, A. (2013). Defective thymopoiesis and poor peripheral homeostatic replenishment of T-helper cells cause T-cell lymphopenia in cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 59(4), 723-730. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.05.042>
- Larsson, P. G., & Kostov, H. (2005). Lower frequency variability in the alpha activity in EEG among patients with epilepsy. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 116(11), 2701-2706. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2005.07.019>
- Lazeyras, F., Spahr, L., DuPasquier, R., Delavelle, J., Burkhard, P., Hadengue, A., ... Vingerhoets, F. (2002). Persistence of mild parkinsonism 4 months after liver transplantation in patients with preoperative minimal hepatic encephalopathy: a study on neuroradiological and blood manganese changes. *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*, 15(4), 188-195. <https://doi.org/10.1007/s00147-002-0415-z>
- Le Campion, A., Gagnerault, M.-C., Auffray, C., Bécourt, C., Poitrasson-Rivière, M., Lallemand, E., ... Lucas, B. (2009). Lymphopenia-induced spontaneous T-cell proliferation as a cofactor for autoimmune disease development. *Blood*, 114(9), 1784-1793. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-192120>
- Lee, I., & Kesner, R. P. (2003). Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(4), 1517-1523.

- Lee, M. H., Smyser, C. D., & Shimony, J. S. (2013). Resting-state fMRI: a review of methods and clinical applications. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 34(10), 1866-1872. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A3263>
- Leke, R., Bak, L. K., Iversen, P., Sørensen, M., Keiding, S., Vilstrup, H., ... Waagepetersen, H. S. (2011). Synthesis of neurotransmitter GABA via the neuronal tricarboxylic acid cycle is elevated in rats with liver cirrhosis consistent with a high GABAergic tone in chronic hepatic encephalopathy. *Journal of Neurochemistry*, 117(5), 824-832. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07244.x>
- Lerea, L. S., Carlson, N. G., Simonato, M., Morrow, J. D., Roberts, J. L., & McNamara, J. O. (1997). Prostaglandin F2alpha is required for NMDA receptor-mediated induction of c-fos mRNA in dentate gyrus neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(1), 117-124.
- Lewis, D. A., & Moghaddam, B. (2006). Cognitive dysfunction in schizophrenia: convergence of gamma-aminobutyric acid and glutamate alterations. *Archives of Neurology*, 63(10), 1372-1376. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.10.1372>
- Li, X., Cui, D., Jiruska, P., Fox, J. E., Yao, X., & Jefferys, J. G. R. (2007). Synchronization measurement of multiple neuronal populations. *Journal of Neurophysiology*, 98(6), 3341-3348. <https://doi.org/10.1152/jn.00977.2007>
- Lieberman, T., Velluti, R. A., & Pedemonte, M. (2009). Temporal correlation between auditory neurons and the hippocampal theta rhythm induced by novel stimulations in awake guinea pigs. *Brain Research*, 1298, 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.08.061>
- Lin, W.-C., Hsu, T.-W., Chen, C.-L., Lu, C.-H., Chen, H.-L., & Cheng, Y.-F. (2015). Resting State-fMRI with ReHo Analysis as a Non-Invasive Modality for the Prognosis of Cirrhotic Patients with Overt Hepatic Encephalopathy. *PloS One*, 10(5), e0126834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126834>
- Liu, Q., Duan, Z. P., Ha, D. K., Bengmark, S., Kurtovic, J., & Riordan, S. M. (2004). Synbiotic modulation of gut flora: Effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology*, 39(5), 1441-1449. <https://doi.org/10.1002/hep.20194>
- Llansola, M., Montoliu, C., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Gomez-Gimenez, B., ... Felipo, V. (2015). Interplay between glutamatergic and GABAergic neurotransmission alterations in cognitive and motor impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Neurochemistry International*, 88, 15-19. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.10.011>
- Lo, C. J., Fu, M., & Lo, F. R. (1998). Prostaglandin I2 analogue, iloprost, down regulates mitogen-activated protein kinases of macrophages. *The Journal of Surgical Research*, 76(2), 159-164. <https://doi.org/10.1006/jsre.1998.5312>
- Lockwood, A. H. (2000). «What's in a name?» Improving the care of cirrhotics. *Journal of Hepatology*, 32(5), 859-861.
- Lockwood, A. H., Murphy, B. W., Donnelly, K. Z., Mahl, T. C., & Perini, S. (1993). Positron-emission tomographic localization of abnormalities of brain metabolism in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 18(5), 1061-1068.
- Lockwood, A. H., Yap, E. W., & Wong, W. H. (1991). Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 11(2), 337-341. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1991.67>

- Lodi, R., Tonon, C., Stracciari, A., Weiger, M., Camaggi, V., Iotti, S., ... Barbiroli, B. (2004). Diffusion MRI shows increased water apparent diffusion coefficient in the brains of cirrhotics. *Neurology*, 62(5), 762-766.
- Lombardi, G., Mannaioni, G., Leonardi, P., Cherici, G., Carlà, V., & Moroni, F. (1994). Ammonium acetate inhibits ionotropic receptors and differentially affects metabotropic receptors for glutamate. *Journal of Neural Transmission. General Section*, 97(3), 187-196.
- Lu, H., Zuo, Y., Gu, H., Waltz, J. A., Zhan, W., Scholl, C. A., ... Stein, E. A. (2007). Synchronized delta oscillations correlate with the resting-state functional MRI signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(46), 18265-18269. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705791104>
- Lv, X.-F., Qiu, Y.-W., Tian, J.-Z., Xie, C.-M., Han, L.-J., Su, H.-H., ... Zhang, X.-L. (2013). Abnormal regional homogeneity of resting-state brain activity in patients with HBV-related cirrhosis without overt hepatic encephalopathy. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 33(3), 375-383. <https://doi.org/10.1111/liv.12096>
- Lv, X.-F., Ye, M., Han, L.-J., Zhang, X.-L., Cai, P.-Q., Jiang, G.-H., ... Xie, C.-M. (2013). Abnormal baseline brain activity in patients with HBV-related cirrhosis without overt hepatic encephalopathy revealed by resting-state functional MRI. *Metabolic Brain Disease*, 28(3), 485-492. <https://doi.org/10.1007/s11011-013-9420-4>
- M**. Kuba, J. Kremláček, P. Hůlek, Z. Kubová, & F. Vít. (1996). Advanced electrophysiological diagnostics of hepatic and portosystemic encephalopathy. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 39 (1996), 21-26.
- M.<sup>a</sup> J. Benedet, & M.<sup>a</sup> A. Alejandre. (2014). TAVEC. Test de Aprendizaje Verbal España-Complutense. TEA EDICIONES.
- Madl, C., Grimm, G., Ferenci, P., Kramer, L., Yeganehfar, W., Oder, W., ... Lenz, K. (1994). Serial recording of sensory evoked potentials: A noninvasive prognostic indicator in fulminant liver failure. *Hepatology*, 20(6), 1487-1494. <https://doi.org/10.1002/hep.1840200618>
- Mangas-Losada, A., García-García, R., Urios, A., Escudero-García, D., Tosca, J., Giner-Durán, R., ... Felipo, V. (2017). Minimal hepatic encephalopathy is associated with expansion and activation of CD4+CD28-, Th22 and Tfh and B lymphocytes. *Scientific Reports*, 7(1), 6683. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05938-1>
- Mani, A. R., Montagnese, S., Jackson, C. D., Jenkins, C. W., Head, I. M., Stephens, R. C., ... Morgan, M. Y. (2009). Decreased heart rate variability in patients with cirrhosis relates to the presence and degree of hepatic encephalopathy. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(2), G330-G338. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90488.2008>
- Mantini, D., Perrucci, M. G., Del Gratta, C., Romani, G. L., & Corbetta, M. (2007). Electrophysiological signatures of resting state networks in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(32), 13170-13175. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700668104>
- Mapas de estadísticos paramétricos (SPM) en medicina nuclear. (2003). *Revista Española de Medicina Nuclear*, 22(1), 43-53. [https://doi.org/10.1016/S0212-6982\(03\)72141-7](https://doi.org/10.1016/S0212-6982(03)72141-7)
- Marcaida, G., Felipo, V., Hermenegildo, C., Miñana, M. D., & Grisolia, S. (1992). Acute ammonia toxicity is mediated by the NMDA type of glutamate receptors. *FEBS Letters*, 296(1), 67-68.

- Marcaida, G., Miñana, M. D., Burgal, M., Grisolia, S., & Felipo, V. (1995). Ammonia prevents activation of NMDA receptors by glutamate in rat cerebellar neuronal cultures. *The European Journal of Neuroscience*, 7(12), 2389-2396.
- Mardini, H., Smith, F. E., Record, C. O., & Blamire, A. M. (2011). Magnetic resonance quantification of water and metabolites in the brain of cirrhotics following induced hyperammonaemia. *Journal of Hepatology*, 54(6), 1154-1160. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.09.030>
- Margulies, D. S., Böttger, J., Long, X., Lv, Y., Kelly, C., Schäfer, A., ... Villringer, A. (2010). Resting developments: a review of fMRI post-processing methodologies for spontaneous brain activity. *Magma (New York, N.Y.)*, 23(5-6), 289-307. <https://doi.org/10.1007/s10334-010-0228-5>
- Marini, J. C., & Broussard, S. R. (2006). Hyperammonemia increases sensitivity to LPS. *Molecular Genetics and Metabolism*, 88(2), 131-137. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.12.013>
- Markovitz, C. D., Tang, T. T., & Lim, H. H. (2013). Tonotopic and localized pathways from primary auditory cortex to the central nucleus of the inferior colliculus. *Frontiers in Neural Circuits*, 7, 77. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00077>
- Masferrer, J. L., Zweifel, B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., ... Seibert, K. (1994). Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(8), 3228-3232.
- Mauguière F., Fischer C., & André-Obadia N. (2007). Potentiels évoqués en neurologie: réponses pathologiques et indications. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Neurologie*, 17-031-B-11.
- McCrea, M., Cordoba, J., Vessey, G., Blei, A. T., & Randolph, C. (1996). Neuropsychological characterization and detection of subclinical hepatic encephalopathy. *Archives of Neurology*, 53(8), 758-763.
- McKinney, A. M., Lohman, B. D., Sarikaya, B., Uhlmann, E., Spanbauer, J., Singewald, T., & Brace, J. R. (2010). Acute hepatic encephalopathy: diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery findings, and correlation with plasma ammonia level and clinical outcome. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 31(8), 1471-1479. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A2112>
- Mendoza, G., Martí-Fàbregas, J., Kulisevsky, J., & Escartin, A. (1994). Hepatic Myelopathy: A Rare Complication of Portacaval Shunt. *European Neurology*, 34(4), 209-212. <https://doi.org/10.1159/000117040>
- Menon, V. (2011). Large-scale brain networks and psychopathology: a unifying triple network model. *Trends in Cognitive Sciences*, 15(10), 483-506. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.08.003>
- Menon, V., & Uddin, L. Q. (2010). Saliency, switching, attention and control: a network model of insula function. *Brain Structure and Function*, 214(5-6), 655-667. <https://doi.org/10.1007/s00429-010-0262-0>
- Merton, P. A., & Morton, H. B. (1980). Stimulation of the cerebral cortex in the intact human subject. *Nature*, 285(5762), 227. <https://doi.org/10.1038/285227a0>
- Michalak, A., & Butterworth, R. F. (1997). Ornithine transcarbamylase deficiency: pathogenesis of the cerebral disorder and new prospects for therapy. *Metabolic Brain Disease*, 12(3), 171-182.
- Miese, F., Kircheis, G., Wittsack, H. J., Wenserski, F., Hemker, J., Mödder, U., ... Cohnen, M. (2006). 1H-MR spectroscopy, magnetization transfer, and diffusion-weighted imaging in alcoholic and



- nonalcoholic patients with cirrhosis with hepatic encephalopathy. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 27(5), 1019-1026.
- Miller, K. J., Leuthardt, E. C., Schalk, G., Rao, R. P. N., Anderson, N. R., Moran, D. W., ... Ojemann, J. G. (2007). Spectral changes in cortical surface potentials during motor movement. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(9), 2424-2432. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3886-06.2007>
- Mínguez, B., Rovira, A., Alonso, J., & Córdoba, J. (2007). Decrease in the volume of white matter lesions with improvement of hepatic encephalopathy. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 28(8), 1499-1500. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A0611>
- Mitchell, J. A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R. J., & Vane, J. R. (1993). Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(24), 11693-11697.
- Mizuhara, H., & Yamaguchi, Y. (2007). Human cortical circuits for central executive function emerge by theta phase synchronization. *NeuroImage*, 36(1), 232-244. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.02.026>
- Monfort, P., Corbalán, R., Martínez, L., López-Talavera, J., Córdoba, J., & Felipo, V. (2001). Altered content and modulation of soluble guanylate cyclase in the cerebellum of rats with portacaval anastomosis. *Neuroscience*, 104(4), 1119-1125.
- Monfort, Pilar, Muñoz, M.-D., ElAyadi, A., Kosenko, E., & Felipo, V. (2002). Effects of hyperammonemia and liver failure on glutamatergic neurotransmission. *Metabolic Brain Disease*, 17(4), 237-250.
- Montagnese, S., Amodio, P., & Morgan, M. Y. (2004). Methods for diagnosing hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a multidimensional approach. *Metabolic Brain Disease*, 19(3-4), 281-312.
- Montagnese, S., Jackson, C., & Morgan, M. Y. (2007). Spatio-temporal decomposition of the electroencephalogram in patients with cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 46(3), 447-458. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.10.015>
- Montoliu, C., Gonzalez-Escamilla, G., Atienza, M., Urios, A., Gonzalez, O., Wassel, A., ... Cantero, J. L. (2012). Focal cortical damage parallels cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *NeuroImage*, 61(4), 1165-1175. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.03.041>
- Montoliu C, Llansola M, & Felipo V. (2015). Neuroinflammation and neurological alterations in chronic liver diseases. Recuperado de <http://nnjournal.net/article/view/1110/565>
- Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M. A., del Olmo, J. A., Ferrandez, A., Rodrigo, J. M., & Felipo, V. (2007). Activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in lymphocytes correlates with minimal hepatic encephalopathy in cirrhotic patients. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 85(3), 237-245. <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0149-y>
- Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M. A., del Olmo, J. A., Urios, A., Rodrigo, J. M., & Felipo, V. (2009). IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 43(3), 272-279. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31815e7f58>
- Montoliu, C., Urios, A., Forn, C., García-Panach, J., Avila, C., Gimenez-Garzó, C., ... Felipo, V. (2014). Reduced white matter microstructural integrity correlates with cognitive deficits in minimal hepatic encephalopathy. *Gut*, 63(6), 1028-1030. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306175>

Morstyn, R., Duffy, F. H., & McCarley, R. W. (1983). Altered P300 topography in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 40(7), 729-734.

Msall, M., Batshaw, M. L., Suss, R., Brusilow, S. W., & Mellits, E. D. (1984). Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. Outcome of urea-cycle enzymopathies. *The New England Journal of Medicine*, 310(23), 1500-1505. <https://doi.org/10.1056/NEJM198406073102304>

Mullen, K. D., & Prakash, R. K. (Eds.). (2012). *Hepatic Encephalopathy*. Humana Press. Recuperado de [//www.springer.com/in/book/9781617798351](http://www.springer.com/in/book/9781617798351)

Munoz-Lopez, M., MohedanoMorian, A., & Insausti, R. (2010). Anatomical Pathways for Auditory Memory in Primates. *Frontiers in Neuroanatomy*, 4. <https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00129>

**N**äätänen, R., & Alho, K. (1995a). Mismatch negativity to change in complex spectrotemporal sound pattern: a new way to study neural learning in the human brain. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology. Supplement*, 44, 179-184.

Näätänen, R., & Alho, K. (1995b). Mismatch negativity--a unique measure of sensory processing in audition. *The International Journal of Neuroscience*, 80(1-4), 317-337.

Näätänen, R., Teder, W., Alho, K., & Lavikainen, J. (1992). Auditory attention and selective input modulation: a topographical ERP study. *Neuroreport*, 3(6), 493-496.

Näätänen, Risto. (1992). *Attention and brain function*. Hillsdale, NJ, US: Lawrence Erlbaum Associates, Inc.

Näätänen, Risto, Sussman, E. S., Salisbury, D., & Shafer, V. L. (2014). Mismatch Negativity (MMN) as an Index of Cognitive Dysfunction. *Brain topography*, 27(4), 451-466. <https://doi.org/10.1007/s10548-014-0374-6>

Naegel, T., Grodd, W., Viebahn, R., Seeger, U., Klose, U., Seitz, D., ... Voigt, K. (2000). MR imaging and (1)H spectroscopy of brain metabolites in hepatic encephalopathy: time-course of renormalization after liver transplantation. *Radiology*, 216(3), 683-691. <https://doi.org/10.1148/radiology.216.3.r00se27683>

Nagai, T., Kirihara, K., Tada, M., Koshiyama, D., Koike, S., Suga, M., ... Kasai, K. (2017). Reduced Mismatch Negativity is Associated with Increased Plasma Level of Glutamate in First-episode Psychosis. *Scientific Reports*, 7(1), 2258. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02267-1>

Nardone, R., Buratti, T., Oliviero, A., Lochmann, A., & Tezzon, F. (2006). Corticospinal involvement in patients with a portosystemic shunt due to liver cirrhosis. *Journal of Neurology*, 253(1), 81-85. <https://doi.org/10.1007/s00415-005-0930-9>

Neufeld, M. Y., Chistik, V., Chapman, J., & Korczyn, A. D. (1999). Intermittent rhythmic delta activity (IRDA) morphology cannot distinguish between focal and diffuse brain disturbances. *Journal of the Neurological Sciences*, 164(1), 56-59. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(99\)00018-0](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(99)00018-0)

Neuman, M. G., Maor, Y., Nanau, R. M., Melzer, E., Mell, H., Opris, M., ... Malnick, S. (2015). Alcoholic Liver Disease: Role of Cytokines. *Biomolecules*, 5(3), 2023-2034. <https://doi.org/10.3390/biom5032023>

Nguyen, J. C. D., Killcross, A. S., & Jenkins, T. A. (2014). Obesity and cognitive decline: role of inflammation and vascular changes. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 375. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00375>



Ni, L., Qi, R., Zhang, L. J., Zhong, J., Zheng, G., Zhang, Z., ... Lu, G. M. (2012). Altered regional homogeneity in the development of minimal hepatic encephalopathy: a resting-state functional MRI study. *PLoS One*, 7(7), e42016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042016>

Niedermeyer, E., & Lopes da Silva, F. H. (2005). *Electroencephalography: basic principles, clinical applications, and related fields* (5th ed). Philadelphia; London: Lippincott Williams & Wilkins. Recuperado de <https://trove.nla.gov.au/version/45745233>

Nodal, F. R., & López, D. E. (2003). Direct input from cochlear root neurons to pontine reticulospinal neurons in albino rat. *Journal of Comparative Neurology*, 460(1), 80-93. <https://doi.org/10.1002/cne.10656>

Norenberg, M. D. (1987). The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochemical Pathology*, 6(1-2), 13-33.

Norenberg, M. D. (1996). Astrocytic-ammonia interactions in hepatic encephalopathy. *Seminars in Liver Disease*, 16(3), 245-253. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1007237>

Norenberg, M. D., Huo, Z., Neary, J. T., & Roig-Cantesano, A. (1997). The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia*, 21(1), 124-133.

Odeh, M., Sabo, E., Srugo, I., & Oliven, A. (2004). Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 24(2), 110-116. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2004.0894.x>

Odom, J. V., Bach, M., Barber, C., Brigell, M., Marmor, M. F., Tormene, A. P., ... Vaegan. (2004). Visual evoked potentials standard (2004). *Documenta Ophthalmologica*, 108(2), 115-123. <https://doi.org/10.1023/B:DOOP.0000036790.67234.22>

Olesen SS, Gram M, Jackson CD, Halliday E, Sandberg TH, Drewes AM, & Morgan MY. (2016). Electroencephalogram variability in patients with cirrhosis associates with the presence and severity of hepatic encephalopathy. *Journal of Hepatology*, 65(3):517-23. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jhep.2016.05.004>.

ondas theta | PsicoWisdom. (s. f.). Recuperado 24 de abril de 2018, de <https://psicowisdom.wordpress.com/tag/ondas-theta/>

Opitz, B., Rinne, T., Mecklinger, A., von Cramon, D. Y., & Schröger, E. (2002). Differential contribution of frontal and temporal cortices to auditory change detection: fMRI and ERP results. *NeuroImage*, 15(1), 167-174. <https://doi.org/10.1006/nimg.2001.0970>

Oppong, K. N., Bartlett, K., Record, C. O., & al Mardini, H. (1995). Synaptosomal glutamate transport in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 22(2), 553-558.

Oria, M., Chatauret, N., Chavarria, L., Romero-Giménez, J., Palenzuela, L., Pardo-Yules, B., ... Córdoba, J. (2010). Motor-evoked potentials in awake rats are a valid method of assessing hepatic encephalopathy and of studying its pathogenesis. *Hepatology*, 52(6), 2077-2085. <https://doi.org/10.1002/hep.23938>

Oria, M., Raguer, N., Chatauret, N., Bartolí, R., Odena, G., Planas, R., & Córdoba, J. (2006). Functional abnormalities of the motor tract in the rat after portocaval anastomosis and after carbon tetrachloride

induction of cirrhosis. *Metabolic Brain Disease*, 21(4), 297-308. <https://doi.org/10.1007/s11011-006-9036-z>

**P**andya, D. N., Van Hoesen, G. W., & Mesulam, M. M. (1981). Efferent connections of the cingulate gyrus in the rhesus monkey. *Experimental Brain Research*, 42(3-4), 319-330.

Parras, G. G., Nieto-Diego, J., Carbajal, G. V., Valdés-Baizabal, C., Escera, C., & Malmierca, M. S. (2017). Neurons along the auditory pathway exhibit a hierarchical organization of prediction error. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02038-6>

Parsons-Smith, B. G., Summerskill, W. H., Dawson, A. M., & Sherlock, S. (1957). The electroencephalograph in liver disease. *Lancet (London, England)*, 273(7001), 867-871.

Penny, W. D., Friston, K. J., Ashburner, J. T., Kiebel, S. J., & Nichols, T. E. (2011). *Statistical Parametric Mapping: The Analysis of Functional Brain Images*. Elsevier.

Peter Jezzard, Paul M Matthews, & Stephen M Smith. (2001). *Functional Magnetic Resonance Imaging: An Introduction to Methods - Oxford Scholarship*. Recuperado de <http://www.oxfordscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780192630711.001.0001/acprof-9780192630711>

Pfurtscheller, G., & Lopes da Silva, F. H. (1999). Event-related EEG/MEG synchronization and desynchronization: basic principles. *Clinical Neurophysiology*, 110(11), 1842-1857. [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(99\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(99)00141-8)

Piccolo, F. D., Amodio, P., Mapelli, D., Montagnese, S., Pellegrini, A., Valenti, P., ... Gatta, A. (2003). Rifaximin reduces EEG relative beta power in patients with minimal hepatic encephalopathy: preliminary findings. En *Encephalopathy and Nitrogen Metabolism in Liver Failure* (pp. 361-367). Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-010-0159-5\\_35](https://doi.org/10.1007/978-94-010-0159-5_35)

Picton, T. W., Stuss, D. T., Champagne, S. C., & Nelson, R. F. (1984). The effects of age on human event-related potentials. *Psychophysiology*, 21(3), 312-325.

Polich, J., Howard, L., & Starr, A. (1985). Effects of age on the P300 component of the event-related potential from auditory stimuli: peak definition, variation, and measurement. *Journal of Gerontology*, 40(6), 721-726.

Portnova, G. V., Teterova, A., Balaev, V., Atanov, M., Skiteva, L., Ushakov, V., ... Martynova, O. (2018). Correlation of BOLD Signal with Linear and Nonlinear Patterns of EEG in Resting State EEG-Informed fMRI. *Frontiers in Human Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2017.00654>

Potgieser, A. R. E., Jong, D., M, B., Wagemakers, M., Hoving, E. W., & Groen, R. J. M. (2014). Insights from the supplementary motor area syndrome in balancing movement initiation and inhibition. *Frontiers in Human Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00960>

Prasad, S., Dhiman, R. K., Duseja, A., Chawla, Y. K., Sharma, A., & Agarwal, R. (2007). Lactulose improves cognitive functions and health-related quality of life in patients with cirrhosis who have minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 45(3), 549-559. <https://doi.org/10.1002/hep.21533>

Proal, E., Alvarez-Segura, M., de la Iglesia-Vayá, M., Martí-Bonmatí, L., & Castellanos, F. X. (2011). Actividad funcional cerebral en estado de reposo: REDES EN CONEXIÓN. *Revista de neurología*, 52(01), S3-10.

Puca, F. M., Antonaci, F., Panella, C., Guglielmi, F. W., Barone, M., Francavilla, A., & Cerutti, R. (1989). Psychomotor dysfunctions in alcoholic and post-necrotic cirrhotic patients without overt encephalopathy. *Acta Neurologica Scandinavica*, 79(4), 280-287.

Pugh, R. N., Murray-Lyon, I. M., Dawson, J. L., Pietroni, M. C., & Williams, R. (1973). Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *The British Journal of Surgery*, 60(8), 646-649.

Pujol, A., Pujol, J., Graus, F., Rimola, A., Peri, J., Mercader, J. M., ... Tolosa, E. (1993). Hyperintense globus pallidus on T1-weighted MRI in cirrhotic patients is associated with severity of liver failure. *Neurology*, 43(1), 65-69.

**Q**i, R., Xu, Q., Zhang, L. J., Zhong, J., Zheng, G., Wu, S., ... Lu, G. (2012). Structural and functional abnormalities of default mode network in minimal hepatic encephalopathy: a study combining DTI and fMRI. *PLoS One*, 7(7), e41376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041376>

Qi, R., Zhang, L. J., Luo, S., Ke, J., Kong, X., Xu, Q., ... Lu, G. M. (2014). Default Mode Network Functional Connectivity: A Promising Biomarker for Diagnosing Minimal Hepatic Encephalopathy. *Medicine*, 93(27). <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000227>

Qi, R., Zhang, L. J., Xu, Q., Zhong, J., Wu, S., Zhang, Z., ... Lu, G. (2012). Selective Impairments of Resting-State Networks in Minimal Hepatic Encephalopathy. *PLOS ONE*, 7(5), e37400. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037400>

Qi, R., Zhang, L. J., Zhong, J., Wu, S., Zhang, Z., Zhong, Y., ... Lu, G. (2012). Dynamic changes of intrinsic brain activity in cirrhotic patients after transjugular intrahepatic portosystemic shunt: a resting-state FMRI study. *PLoS One*, 7(10), e46681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046681>

Qi, R., Zhang, L. J., Zhong, J., Zhang, Z., Ni, L., Jiao, Q., ... Lu, G. (2013). Altered effective connectivity network of the basal ganglia in low-grade hepatic encephalopathy: a resting-state fMRI study with Granger causality analysis. *PLoS One*, 8(1), e53677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053677>

Qi, R., Zhang, L. J., Zhong, J., Zhang, Z., Ni, L., Zheng, G., & Lu, G. M. (2013). Disrupted thalamic resting-state functional connectivity in patients with minimal hepatic encephalopathy. *European Journal of Radiology*, 82(5), 850-856. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2012.12.016>

Qi, R., Zhang, L., Wu, S., Zhong, J., Zhang, Z., Zhong, Y., ... Lu, G. (2012). Altered Resting-State Brain Activity at Functional MR Imaging during the Progression of Hepatic Encephalopathy. *Radiology*, 264(1), 187-195. <https://doi.org/10.1148/radiol.12111429>

Quero, J. C., Hartmann, I. J., Meulstee, J., Hop, W. C., & Schalm, S. W. (1996). The diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis using neuropsychological tests and automated electroencephalogram analysis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 24(3), 556-560. <https://doi.org/10.1002/hep.510240316>

**R**acanelli, V., & Rehermann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(2 Suppl 1), S54-62. <https://doi.org/10.1002/hep.21060>

Raftery, G., He, J., Pearce, R., Birchall, D., Newton, J. L., Blamire, A. M., & Isaacs, J. D. (2012). Disease activity and cognition in rheumatoid arthritis: an open label pilot study. *Arthritis Research & Therapy*, 14(6), R263. <https://doi.org/10.1186/ar4108>

- Randolph, C., Hilsabeck, R., Kato, A., Kharbanda, P., Li, Y.-Y., Mapelli, D., ... Weissenborn, K. (2009). Neuropsychological assessment of hepatic encephalopathy: ISHEN practice guidelines. *Liver International*, 29(5), 629-635. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2009.02009.x>
- Rao, R. P., & Ballard, D. H. (1999). Predictive coding in the visual cortex: a functional interpretation of some extra-classical receptive-field effects. *Nature Neuroscience*, 2(1), 79-87. <https://doi.org/10.1038/4580>
- Ray, S., Niebur, E., Hsiao, S. S., Sinai, A., & Crone, N. E. (2008). High-frequency gamma activity (80-150 Hz) is increased in human cortex during selective attention. *Clinical neurophysiology: official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 119(1), 116-133. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2007.09.136>
- Reeves, R. R., Struve, F. A., Rash, C. J., & Burke, R. S. (2007). P300 cognitive evoked potentials before and after liver transplantation. *Metabolic Brain Disease*, 22(2), 139-144. <https://doi.org/10.1007/s11011-007-9055-4>
- Rehnström, S., Simert, G., Hansson, J. A., Johnson, G., & Vang, J. (1977). Chronic hepatic encephalopathy. A psychometrical study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 12(3), 305-311.
- Rikkers, L., Jenko, P., Rudman, D., & Freides, D. (1978). Subclinical hepatic encephalopathy: detection, prevalence, and relationship to nitrogen metabolism. *Gastroenterology*, 75(3), 462-469.
- Rinne, J. O., Tommola, J., Laine, M., Krause, B. J., Schmidt, D., Kaasinen, V., ... Sunnari, M. (2000). The translating brain: cerebral activation patterns during simultaneous interpreting. *Neuroscience Letters*, 294(2), 85-88.
- Rinne, T., Degerman, A., & Alho, K. (2005). Superior temporal and inferior frontal cortices are activated by infrequent sound duration decrements: an fMRI study. *NeuroImage*, 26(1), 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.01.017>
- Riordan, S. M., & Williams, R. (1997). Treatment of hepatic encephalopathy. *The New England Journal of Medicine*, 337(7), 473-479. <https://doi.org/10.1056/NEJM199708143370707>
- Robinson, J., Manseau, F., Ducharme, G., Amilhon, B., Vigneault, E., El Mestikawy, S., & Williams, S. (2016). Optogenetic Activation of Septal Glutamatergic Neurons Drive Hippocampal Theta Rhythms. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(10), 3016-3023. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2141-15.2016>
- Rodgers, C. C., & DeWeese, M. R. (2014). Neural correlates of task switching in prefrontal cortex and primary auditory cortex in a novel stimulus selection task for rodents. *Neuron*, 82(5), 1157-1170. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.031>
- Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez-Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Garcia-Verdugo, J.-M., & Felipe, V. (2010). Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, 139(2), 675-684. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.03.040>
- Rodrigo, R., Erceg, S., Rodriguez-Diaz, J., Saez-Valero, J., Piedrafita, B., Suarez, I., & Felipe, V. (2007). Glutamate-induced activation of nitric oxide synthase is impaired in cerebral cortex in vivo in rats with chronic liver failure. *Journal of Neurochemistry*, 102(1), 51-64. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04446.x>

- Roelfsema, P. R., Engel, A. K., König, P., & Singer, W. (1997). Visuomotor integration is associated with zero time-lag synchronization among cortical areas. *Nature*, 385(6612), 157-161. <https://doi.org/10.1038/385157a0>
- Rolando, N., Wade, J., Davalos, M., Wendon, J., Philpott-Howard, J., & Williams, R. (2000). The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 32(4 Pt 1), 734-739. <https://doi.org/10.1053/jhep.2000.17687>
- Romero-Gómez, M., Boza, F., García-Valdecasas, M. S., García, E., & Aguilar-Reina, J. (2001). Subclinical hepatic encephalopathy predicts the development of overt hepatic encephalopathy. *The American Journal of Gastroenterology*, 96(9), 2718-2723. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.04130.x>
- Romero-Gómez, M., Córdoba, J., Jover, R., del Olmo, J. A., Ramírez, M., Rey, R., ... Felipo, V. (2007). Value of the critical flicker frequency in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 45(4), 879-885. <https://doi.org/10.1002/hep.21586>
- Rosazza, C., & Minati, L. (2011). Resting-state brain networks: literature review and clinical applications. *Neurological Sciences*, 32(5), 773-785. <https://doi.org/10.1007/s10072-011-0636-y>
- Rosburg, T., Marinou, V., Haueisen, J., Smesny, S., & Sauer, H. (2004). Effects of lorazepam on the neuromagnetic mismatch negativity (MMNm) and auditory evoked field component N100m. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 29(9), 1723-1733. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300477>
- Rose, C., & Jalan, R. (2004). Is minimal hepatic encephalopathy completely reversible following liver transplantation? *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 10(1), 84-87. <https://doi.org/10.1002/lt.20030>
- Rousseeuw, P. J., & Zomeren, B. C. van. (1990). Unmasking Multivariate Outliers and Leverage Points. *Journal of the American Statistical Association*, 85(411), 633-639. <https://doi.org/10.1080/01621459.1990.10474920>
- Rovira, A., Córdoba, J., Sanpedro, F., Grivé, E., Rovira-Gols, A., & Alonso, J. (2002). Normalization of T2 signal abnormalities in hemispheric white matter with liver transplant. *Neurology*, 59(3), 335-341.
- Rovira, A., Grivé, E., Pedraza, S., Rovira, A., & Alonso, J. (2001). Magnetization transfer ratio values and proton MR spectroscopy of normal-appearing cerebral white matter in patients with liver cirrhosis. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 22(6), 1137-1142.
- Rovira, Alex, Mínguez, B., Aymerich, F. X., Jacas, C., Huerga, E., Córdoba, J., & Alonso, J. (2007). Decreased white matter lesion volume and improved cognitive function after liver transplantation. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 46(5), 1485-1490. <https://doi.org/10.1002/hep.21911>
- Rowland, L. M., Summerfelt, A., Wijtenburg, S. A., Du, X., Chiappelli, J. J., Krishna, N., ... Hong, L. E. (2016). Frontal Glutamate and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Levels and Their Associations With Mismatch Negativity and Digit Sequencing Task Performance in Schizophrenia. *JAMA Psychiatry*, 73(2), 166-174. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2015.2680>
- Ruusuvirta, T., Lipponen, A., Pellinen, E., Penttonen, M., & Astikainen, P. (2013). Auditory cortical and hippocampal-system mismatch responses to duration deviants in urethane-anesthetized rats. *PLoS One*, 8(1), e54624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054624>



- Sagalés, T., Gimeno, V., de la Calzada, M. D., Casellas, F., Macià, M. D., & Soriano, M. V. (1990). Brain mapping analysis in patients with hepatic encephalopathy. *Brain Topography*, 2(3), 221-228. <https://doi.org/10.1007/BF01140590>
- Saji, S., Kumar, S., & Thomas, V. (2011). A randomized double blind placebo controlled trial of probiotics in minimal hepatic encephalopathy. *Tropical Gastroenterology*, 32(2), 128-132.
- Sandford, N. L., & Saul, R. E. (1988). Assessment of hepatic encephalopathy with visual evoked potentials compared with conventional methods. *Hepatology*, 8(5), 1094-1098. <https://doi.org/10.1002/hep.1840080519>
- Sarter, M., & Bruno, J. P. (2002). Mild cognitive impairment and the cholinergic hypothesis: a very different take on recent data. *Annals of Neurology*, 52(3), 384-385. <https://doi.org/10.1002/ana.10308>
- Savić, M. M., Milinković, M. M., Rallapalli, S., Clayton, T., Joksimović, S., Van Linn, M., & Cook, J. M. (2009). The differential role of  $\alpha 1$ - and  $\alpha 5$ -containing GABAA receptors in mediating diazepam effects on spontaneous locomotor activity and water-maze learning and memory in rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 12(9), 1179-1193. <https://doi.org/10.1017/S1461145709000108>
- Sawhney, I. M., Verma, P. K., Dhiman, R. K., Chopra, J. S., Sharma, A., Chawla, Y. K., & Dilawari, J. B. (1997). Visual and auditory evoked responses in acute severe hepatitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 12(7), 554-559.
- Saxena, N., Bhatia, M., Joshi, Y. K., Garg, P. K., Dwivedi, S. N., & Tandon, R. K. (2002). Electrophysiological and neuropsychological tests for the diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy and prediction of overt encephalopathy. *Liver*, 22(3), 190-197. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0676.2002.01431.x>
- Saxena, N., Bhatia, M., Joshi, Y. K., Garg, P. K., & Tandon, R. K. (2001). Auditory P300 event-related potentials and number connection test for evaluation of subclinical hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis of the liver: A follow-up study. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 16(3), 322-327. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2001.02388.x>
- Schaefer, P. W., Grant, P. E., & Gonzalez, R. G. (2000). Diffusion-weighted MR imaging of the brain. *Radiology*, 217(2), 331-345. <https://doi.org/10.1148/radiology.217.2.r00nv24331>
- Schafer, D. F., & Jones, E. A. (1982). Hepatic encephalopathy and the gamma-aminobutyric-acid neurotransmitter system. *Lancet (London, England)*, 1(8262), 18-20.
- Schafer, D. F., Pappas, S. C., Brody, L. E., Jacobs, R., & Jones, E. A. (1984). Visual evoked potentials in a rabbit model of hepatic encephalopathy. I. Sequential changes and comparisons with drug-induced comas. *Gastroenterology*, 86(3), 540-545.
- Schnitzler, A., & Gross, J. (2005). Functional connectivity analysis in magnetoencephalography. *International Review of Neurobiology*, 68, 173-195. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(05\)68007-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(05)68007-5)
- Schomerus, H., & Hamster, W. (1998). Neuropsychological aspects of portal-systemic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 13(4), 361-377.
- Schomerus, H., Hamster, W., Blunck, H., Reinhard, U., Mayer, K., & Dölle, W. (1981). Latent portasystemic encephalopathy. I. Nature of cerebral functional defects and their effect on fitness to drive. *Digestive Diseases and Sciences*, 26(7), 622-630.

- Schulz, C., Schutte, K., Kropf, S., Schmitt, F. C., Vasapolli, R., Kliegis, L. M., ... Malfertheiner, P. (2016). RiMINI - the influence of rifaximin on minimal hepatic encephalopathy (MHE) and on the intestinal microbiome in patients with liver cirrhosis: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials [Electronic Resource]*, 17(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s13063-016-1205-8>
- Schuppan, D., & Afdhal, N. H. (2008). Liver cirrhosis. *Lancet (London, England)*, 371(9615), 838-851. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60383-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60383-9)
- Schürmann, M., Başar-Eroglu, C., Kolev, V., & Başar, E. (2001). Delta responses and cognitive processing: single-trial evaluations of human visual P300. *International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology*, 39(2-3), 229-239.
- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 20(1), 11-21.
- Seamans, J. K., Floresco, S. B., & Phillips, A. G. (1995). Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. *Behavioral Neuroscience*, 109(6), 1063-1073.
- Segarra, N., Bernardo, M., Valdes, M., Caldu, X., Falcón, C., Rami, L., ... Junque, C. (2008). Cerebellar deficits in schizophrenia are associated with executive dysfunction. *Neuroreport*, 19(15), 1513-1517. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3283108bd8>
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., ... Isakson, P. (1994). Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(25), 12013-12017.
- Seregi, A., Keller, M., & Hertting, G. (1987). Are cerebral prostanoids of astroglial origin? Studies on the prostanoid forming system in developing rat brain and primary cultures of rat astrocytes. *Brain Research*, 404(1-2), 113-120.
- Shaposhnikova, N. A. (2007). [Role of zinc deficiency in development of hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis]. [Russian]. *Ekspierimental'Naia i Klinicheskaia Gastroenterologija*, 1(3), 108-112.
- Shawcross, D. L., Olde Damink, S. W. M., Butterworth, R. F., & Jalan, R. (2005). Ammonia and hepatic encephalopathy: the more things change, the more they remain the same. *Metabolic Brain Disease*, 20(3), 169-179. <https://doi.org/10.1007/s11011-005-7205-0>
- Shawcross, D. L., Sharifi, Y., Canavan, J. B., Yeoman, A. D., Abeles, R. D., Taylor, N. J., ... Wendon, J. A. (2011). Infection and systemic inflammation, not ammonia, are associated with Grade 3/4 hepatic encephalopathy, but not mortality in cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 54(4), 640-649. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.07.045>
- Shawcross, D. L., Wright, G., Olde Damink, S. W. M., & Jalan, R. (2007). Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 22(1), 125-138. <https://doi.org/10.1007/s11011-006-9042-1>
- Shawcross, Debbie L., Davies, N. A., Williams, R., & Jalan, R. (2004). Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 40(2), 247-254.
- Sherlock, S., Summerskill, W. H., White, L. P., & Phear, E. A. (1954). Portal-systemic encephalopathy; neurological complications of liver disease. *Lancet (London, England)*, 267(6836), 454-457.



- Shih, V. E., & Tanaka, K. (1978). Plasma and urine amino acid changes in rats treated with hypoglycin. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 88(3), 539-543.
- Shin, S. Y., Julian, L., & Katz, P. (2013). The relationship between cognitive function and physical function in rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 40(3), 236-243. <https://doi.org/10.3899/jrheum.120871>
- Shiramatsu, T. I., Kanzaki, R., & Takahashi, H. (2013). Cortical Mapping of Mismatch Negativity with Deviance Detection Property in Rat. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082663>
- Siciliano, M., Annicchiarico, B. E., Lucchese, F., & Bombardieri, G. (2006). Effects of a single, short intravenous dose of acetyl-L-carnitine on pattern-reversal visual-evoked potentials in cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*, 33(1-2), 76-80.
- Singhal, A., Nagarajan, R., Hinkin, C. H., Kumar, R., Sayre, J., Elderkin-Thompson, V., ... Thomas, M. A. (2010). Two-dimensional MR spectroscopy of minimal hepatic encephalopathy and neuropsychological correlates in vivo. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI*, 32(1), 35-43. <https://doi.org/10.1002/jmri.22216>
- Sisson, D. F., & Siegel, J. (1989). Chloral hydrate anesthesia: EEG power spectrum analysis and effects on VEPs in the rat. *Neurotoxicology and Teratology*, 11(1), 51-56.
- Sivarao, D. V., Chen, P., Yang, Y., Li, Y.-W., Pieschl, R., & Ahljanian, M. K. (2014). NR2B Antagonist CP-101,606 Abolishes Pitch-Mediated Deviance Detection in Awake Rats. *Frontiers in Psychiatry*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2014.00096>
- Słowik, A., Ciećko-Michalska, I., Bogdał, J., & Szczudlik, A. (2001). [The diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy]. *Przegląd Lekarski*, 58(12), 1059-1062.
- Smolnik, R., Pietrowsky, R., Fehm, H. L., & Born, J. (1998). Enhanced selective attention after low-dose administration of the benzodiazepine antagonist flumazenil. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 18(3), 241-247.
- Sobukawa, E., Sakimura, K., Hoshino, S., Hoshino, M., & Miyoshi, K. (1994). Hepatic Myelopathy: An Unusual Neurological Complication of Advanced Hepatic Disease. *Internal Medicine*, 33(11), 718-722. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.33.718>
- spm8\_manual.pdf. (s. f.). Recuperado de [http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/doc/spm8\\_manual.pdf](http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/doc/spm8_manual.pdf)
- Sporns, O. (2002). Network analysis, complexity, and brain function. *Complexity*, 8(1), 56-60. <https://doi.org/10.1002/cplx.10047>
- Squire, L. R., Stark, C. E. L., & Clark, R. E. (2004). The medial temporal lobe. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 279-306. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144130>
- Stallings, W. C., Metzger, A. L., Pattridge, K. A., Fee, J. A., & Ludwig, M. L. (1991). Structure-function relationships in iron and manganese superoxide dismutases. *Free Radical Research Communications*, 12-13 Pt 1, 259-268.
- Stampfer, H. G., & Başar, E. (1985). Does frequency analysis lead to better understanding of human event related potentials. *The International Journal of Neuroscience*, 26(3-4), 181-196.

- Steinlein, O., Anokhin, A., Yping, M., Schalt, E., & Vogel, F. (1992). Localization of a gene for the human low-voltage EEG on 20q and genetic heterogeneity. *Genomics*, 12(1), 69-73. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90408-K](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90408-K)
- Steriade, M., McCormick, D. A., & Sejnowski, T. J. (1993). Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5134), 679-685.
- Stewart, G. R., Frederickson, C. J., Howell, G. A., & Gage, F. H. (1984). Cholinergic denervation-induced increase of chelatable zinc in mossy-fiber region of the hippocampal formation. *Brain Research*, 290(1), 43-51.
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews. Neuroscience*, 15(10), 655-669. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Streetz, K. L., Tacke, F., Leifeld, L., Wüstefeld, T., Graw, A., Klein, C., ... Trautwein, C. (2003). Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 38(1), 218-229. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50268>
- Supekar, K., Uddin, L. Q., Prater, K., Amin, H., Greicius, M. D., & Menon, V. (2010). Development of functional and structural connectivity within the default mode network in young children. *NeuroImage*, 52(1), 290-301. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.04.009>
- Sutter, R., Stevens, R. D., & Kaplan, P. W. (2013). Significance of triphasic waves in patients with acute encephalopathy: a nine-year cohort study. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 124(10), 1952-1958. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2013.03.031>
- Swerdlow, N. R., Weber, M., Qu, Y., Light, G. A., & Braff, D. L. (2008). Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. *Psychopharmacology*, 199(3), 331-388. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1072-4>
- Szekely, C. A., Thorne, J. E., Zandi, P. P., Ek, M., Messias, E., Breitner, J. C. S., & Goodman, S. N. (2004). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease: a systematic review. *Neuroepidemiology*, 23(4), 159-169. <https://doi.org/10.1159/000078501>
- T**akeda, S., Sato, N., & Morishita, R. (2014). Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 171. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00171>
- Talairach, & Tournoux. (1988). Co-Planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain. 3-D Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging (1.<sup>a</sup> ed.). Thieme.
- Tang, D. G., Grossi, I. M., Tang, K. Q., Diglio, C. A., & Honn, K. V. (1995). Inhibition of TPA and 12(S)-HETE-stimulated tumor cell adhesion by prostacyclin and its stable analogs: rationale for their antimetastatic effects. *International Journal of Cancer*, 60(3), 418-425.
- Taoro-Gonzalez, L., Arenas, Y. M., Cabrera-Pastor, A., & Felipo, V. (2018). Hyperammonemia alters membrane expression of GluA1 and GluA2 subunits of AMPA receptors in hippocampus by enhancing activation of the IL-1 receptor: underlying mechanisms. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1082-z>
- Tarter, R. E., Arria, A. M., Carra, J., & Van Thiel, D. H. (1987). Memory impairments concomitant with nonalcoholic cirrhosis. *The International Journal of Neuroscience*, 32(3-4), 853-859.

- Tarter, R. E., Hegedus, A. M., Van Thiel, D. H., Edwards, N., & Schade, R. R. (1987). Neurobehavioral correlates of cholestatic and hepatocellular disease: differentiation according to disease specific characteristics and severity of the identified cerebral dysfunction. *The International Journal of Neuroscience*, 32(3-4), 901-910.
- Tarter, R. E., Hegedus, A. M., Van Thiel, D. H., Schade, R. R., Gavalier, J. S., & Starzl, T. E. (1984). Nonalcoholic cirrhosis associated with neuropsychological dysfunction in the absence of overt evidence of hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, 86(6), 1421-1427.
- Tarter, R. E., Switala, J. A., Arria, A., Plail, J., & Van Thiel, D. H. (1990). Subclinical hepatic encephalopathy. Comparison before and after orthotopic liver transplantation. *Transplantation*, 50(4), 632-637.
- Teunissen, C. E., van Boxtel, M. P. J., Bosma, H., Bosmans, E., Delanghe, J., De Bruijn, C., ... de Vente, J. (2003). Inflammation markers in relation to cognition in a healthy aging population. *Journal of Neuroimmunology*, 134(1-2), 142-150.
- Thomas, G. J., Brito, G. N., Stein, D. P., & Berko, J. K. (1982). Memory and septo-hippocampal connections in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 96(3), 339-347.
- Thomas, M. A., Huda, A., Guze, B., Curran, J., Bugbee, M., Fairbanks, L., ... Fawzy, F. (1998). Cerebral 1H MR spectroscopy and neuropsychologic status of patients with hepatic encephalopathy. *AJR. American Journal of Roentgenology*, 171(4), 1123-1130. <https://doi.org/10.2214/ajr.171.4.9763008>
- Thompson, K., Maltby, J., Fallowfield, J., McAulay, M., Millward-Sadler, H., & Sheron, N. (1998). Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 28(6), 1597-1606. <https://doi.org/10.1002/hep.510280620>
- Tikhonravov, D., Neuvonen, T., Pertovaara, A., Savioja, K., Ruusuvirta, T., Näätänen, R., & Carlson, S. (2008). Effects of an NMDA-receptor antagonist MK-801 on an MMN-like response recorded in anesthetized rats. *Brain Research*, 1203, 97-102. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.006>
- Timmermann, L., Butz, M., Gross, J., Ploner, M., Südmeyer, M., Kircheis, G., ... Schnitzler, A. (2008). Impaired cerebral oscillatory processing in hepatic encephalopathy. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 119(2), 265-272. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2007.09.138>
- Timmermann, L., Gross, J., Butz, M., Kircheis, G., Häussinger, D., & Schnitzler, A. (2003). Mini-asterixis in hepatic encephalopathy induced by pathologic thalamo-motor-cortical coupling. *Neurology*, 61(5), 689-692.
- Timmermann, L., Gross, J., Butz, M., Kircheis, G., Haussinger, D., & Schnitzler, A. (2004). Pathological oscillatory coupling within the human motor system in different tremor syndromes as revealed by magnetoencephalography. *Neurology & Clinical Neurophysiology: NCN*, 2004, 26.
- Timmermann, L., Gross, J., Kircheis, G., Häussinger, D., & Schnitzler, A. (2002). Cortical origin of mini-asterixis in hepatic encephalopathy. *Neurology*, 58(2), 295-298.
- Timmermann, Lars, Butz, M., Gross, J., Kircheis, G., Häussinger, D., & Schnitzler, A. (2005). Neural synchronization in hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 20(4), 337-346. <https://doi.org/10.1007/s11011-005-7916-2>
- Torres, D. S., Abrantes, J., & Brandão-Mello, C. E. (2013). Cognitive assessment of patients with minimal hepatic encephalopathy in Brazil. *Metabolic Brain Disease*, 28(3), 473-483. <https://doi.org/10.1007/s11011-013-9405-3>

Tremblay, K. L., & Burkard, R. F. (2012). *Translational Perspectives in Auditory Neuroscience: Hearing Across the Life Span – Assessment and Disorders*. Plural Publishing.

Tse, C.-Y., & Penney, T. B. (2008). On the functional role of temporal and frontal cortex activation in passive detection of auditory deviance. *NeuroImage*, 41(4), 1462-1470. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.03.043>

**U**eda, T., Musha, T., Asada, T., & Yagi, T. (2016). Classification Method for Mild Cognitive Impairment Based on Power Variability of EEG Using Only a Few Electrodes. *Electronics and Communications in Japan*, 99(11), 107-114. <https://doi.org/10.1002/ecj.11906>

Uhlhaas, P. J., & Singer, W. (2006). Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology. *Neuron*, 52(1), 155-168. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.020>

Umbricht, D., Koller, R., Vollenweider, F. X., & Schmid, L. (2002). Mismatch negativity predicts psychotic experiences induced by NMDA receptor antagonist in healthy volunteers. *Biological Psychiatry*, 51(5), 400-406.

Urios, A., Mangas-Losada, A., Gimenez-Garzó, C., González-López, O., Giner-Durán, R., Serra, M. A., ... Montoliu, C. (s. f.). Altered postural control and stability in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy correlate with cognitive deficits. *Liver International*, 37(7), 1013-1022. <https://doi.org/10.1111/liv.13345>

**V**an den Heuvel, M. P., & Hulshoff Pol, H. E. (2010). Exploring the brain network: a review on resting-state fMRI functional connectivity. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 20(8), 519-534. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2010.03.008>

Van der Rijt, C. C. D., Schalm, S. W., de Groot, G. H., & de Vlieger, M. (1984). Objective measurement of hepatic encephalopathy by means of automated EEG analysis. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 57(5), 423-426. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(84\)90071-3](https://doi.org/10.1016/0013-4694(84)90071-3)

Van Leemput, K., Bakkour, A., Benner, T., Wiggins, G., Wald, L. L., Augustinack, J., ... Fischl, B. (2009). Automated segmentation of hippocampal subfields from ultra-high resolution in vivo MRI. *Hippocampus*, 19(6), 549-557. <https://doi.org/10.1002/hipo.20615>

Verhoog, M. B., Goriounova, N. A., Obermayer, J., Stroeder, J., Hjorth, J. J. J., Testa-Silva, G., ... Mansvelder, H. D. (2013). Mechanisms underlying the rules for associative plasticity at adult human neocortical synapses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(43), 17197-17208. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3158-13.2013>

Vicente Felipo, A. U., nez-Garzó, Omar Cauli, M.-J., Andrés, S., s-Costa, O. G., Lez, M. A. S., ... N, V. B. (2014). Non invasive blood flow measurement in cerebellum detects minimal hepatic encephalopathy earlier than psychometric tests. *World Journal of Gastroenterology*, 20(33), 11815-11825. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i33.11815>

Vigo, D. E., Siri, L. N., Guevara, M. S. L. de, Martínez-Martínez, J. A., Fahrer, R. D., Cardinali, D. P., ... Guinjoan, S. M. (2004). Relation of depression to heart rate nonlinear dynamics in patients ≥60 years of age with recent unstable angina pectoris or acute myocardial infarction. *American Journal of Cardiology*, 93(6), 756-760. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2003.11.056>

- Ward, A. M., Schultz, A. P., Huijbers, W., Van Dijk, K. R. A., Hedden, T., & Sperling, R. A. (2014). The parahippocampal gyrus links the default-mode cortical network with the medial temporal lobe memory system. *Human Brain Mapping*, 35(3), 1061-1073. <https://doi.org/10.1002/hbm.22234>
- Wasmuth, H. E., Kunz, D., Yagmur, E., Timmer-Stranghöner, A., Vidacek, D., Siewert, E., ... Lammert, F. (2005). Patients with acute on chronic liver failure display «sepsis-like» immune paralysis. *Journal of Hepatology*, 42(2), 195-201. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.10.019>
- Waternberg, N., Alehan, F., Dabby, R., Lerman-Sagie, T., Pavot, P., & Towne, A. (2002). Clinical and radiologic correlates of frontal intermittent rhythmic delta activity. *Journal of Clinical Neurophysiology: Official Publication of the American Electroencephalographic Society*, 19(6), 535-539.
- Weaver, J. D., Huang, M.-H., Albert, M., Harris, T., Rowe, J. W., & Seeman, T. E. (2002). Interleukin-6 and risk of cognitive decline: MacArthur studies of successful aging. *Neurology*, 59(3), 371-378.
- Weissenborn, K., Ennen, J. C., Schomerus, H., Rückert, N., & Hecker, H. (2001). Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *Journal of Hepatology*, 34(5), 768-773.
- Weissenborn, K., Scholz, M., Hinrichs, H., Wiltfang, J., Schmidt, F. W., & Künkel, H. (1990). Neurophysiological assessment of early hepatic encephalopathy. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 75(4), 289-295. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(90\)90107-U](https://doi.org/10.1016/0013-4694(90)90107-U)
- Weissenborn, Karin. (2014). Chapter 45 - Portosystemic encephalopathy. En J. Biller & J. M. Ferro (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 120, pp. 661-674). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4087-0.00045-0>
- Weissenborn, Karin, Bokemeyer, M., Krause, J., Ennen, J., & Ahl, B. (2005). Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease. *AIDS (London, England)*, 19 Suppl 3, S93-98.
- Weissenborn, Karin, Giewekemeyer, K., Heidenreich, S., Bokemeyer, M., Berding, G., & Ahl, B. (2005). Attention, memory, and cognitive function in hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 20(4), 359-367. <https://doi.org/10.1007/s11011-005-7919-z>
- Weissenborn, Karin, Heidenreich, S., Giewekemeyer, K., Rückert, N., & Hecker, H. (2003). Memory function in early hepatic encephalopathy. *Journal of Hepatology*, 39(3), 320-325.
- Wicking, M., Nees, F., & Steiger, F. (2014). Neuropsychological Measures of Hippocampal Function. *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*, 34, 60-70. <https://doi.org/10.1159/000356425>
- Wilson, T. W., Kurz, M. J., & Arpin, D. J. (2014). Functional specialization within the supplementary motor area: A fNIRS study of bimanual coordination. *NeuroImage*, 85, 445-450. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.04.112>
- Winkler, I. (2007). Interpreting the Mismatch Negativity. *Journal of Psychophysiology*, 21(3-4), 147-163. <https://doi.org/10.1027/0269-8803.21.34.147>
- Yaffe, K., Lindquist, K., Penninx, B. W., Simonsick, E. M., Pahor, M., Kritchevsky, S., ... Harris, T. (2003). Inflammatory markers and cognition in well-functioning African-American and white elders. *Neurology*, 61(1), 76-80.



- Yamagata, K., Andreasson, K. I., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., & Worley, P. F. (1993). Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*, 11(2), 371-386.
- Yang, L., Zhang, Y., Wang, L., Fan, F., Zhu, L., Li, Z., ... Chen, Y. (2010). Amelioration of high fat diet induced liver lipogenesis and hepatic steatosis by interleukin-22. *Journal of Hepatology*, 53(2), 339-347. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.03.004>
- Yang, S. S., Chu, N. S., & Wu, C. H. (1993). Disappearance of N20 and P25 components of somatosensory evoked potential: an ominous sign in severe acute hepatitis. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, 92(1), 46-49.
- Yang, S.-S., Chu, N.-S., & Liaw, Y.-F. (1985). Somatosensory evoked potentials in hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, 89(3), 625-630. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(85\)90460-3](https://doi.org/10.1016/0016-5085(85)90460-3)
- Yang, S.-S., Chu, N.-S., & Liaw, Y.-F. (1986). Brainstem auditory evoked potentials in hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 6(6), 1352-1355. <https://doi.org/10.1002/hep.1840060622>
- Yang, S.-S., Wu, C.-H., Chiang, T.-R., & Chen, D.-S. (1998). Somatosensory evoked potentials in subclinical portosystemic encephalopathy: A comparison with psychometric tests. *Hepatology*, 27(2), 357-361. <https://doi.org/10.1002/hep.510270207>
- Yeh, S.-H., & Chen, P.-J. (2010). Gender disparity of hepatocellular carcinoma: the roles of sex hormones. *Oncology*, 78 Suppl 1, 172-179. <https://doi.org/10.1159/000315247>
- Yen, C. L., & Liaw, Y. F. (1990). Somatosensory evoked potentials and number connection test in the detection of subclinical hepatic encephalopathy. *Hepato-Gastroenterology*, 37(3), 332-334.
- Yonkers, N. L., Sieg, S., Rodriguez, B., & Anthony, D. D. (2011). Reduced naive CD4 T cell numbers and impaired induction of CD27 in response to T cell receptor stimulation reflect a state of immune activation in chronic hepatitis C virus infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 203(5), 635-645. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq101>
- Z**afirir, O., Kircheis, G., Rood, H. A., Boers, F., Häussinger, D., & Zilles, K. (2004). Neural mechanism underlying impaired visual judgement in the dysmetabolic brain: an fMRI study. *NeuroImage*, 22(2), 541-552. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.01.038>
- Zandi, P. P., Anthony, J. C., Hayden, K. M., Mehta, K., Mayer, L., Breitner, J. C. S., & Cache County Study Investigators. (2002). Reduced incidence of AD with NSAID but not H2 receptor antagonists: the Cache County Study. *Neurology*, 59(6), 880-886.
- Zang, Y., Jiang, T., Lu, Y., He, Y., & Tian, L. (2004). Regional homogeneity approach to fMRI data analysis. *NeuroImage*, 22(1), 394-400. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2003.12.030>
- Zang, Y.-F., He, Y., Zhu, C.-Z., Cao, Q.-J., Sui, M.-Q., Liang, M., ... Wang, Y.-F. (2007). Altered baseline brain activity in children with ADHD revealed by resting-state functional MRI. *Brain & Development*, 29(2), 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2006.07.002>
- Zeidman, P., & Maguire, E. A. (2016). Anterior hippocampus: the anatomy of perception, imagination and episodic memory. *Nature Reviews. Neuroscience*, 17(3), 173-182. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.24>
- Zeneroli, M. L., Pinelli, G., Gollini, G., Penne, A., Messori, E., Zani, G., & Ventura, E. (1984). Visual evoked potential: a diagnostic tool for the assessment of hepatic encephalopathy. *Gut*, 25(3), 291-299.

- Zhang, G., Cheng, Y., Shen, W., Liu, B., Huang, L., & Xie, S. (2017). The short-term effect of liver transplantation on the low-frequency fluctuation of brain activity in cirrhotic patients with and without overt hepatic encephalopathy. *Brain Imaging and Behavior*, 11(6), 1849-1861. <https://doi.org/10.1007/s11682-016-9659-6>
- Zhang, L. J., Qi, R., Zhong, J., Ni, L., Zheng, G., Xu, J., & Lu, G. M. (2013). Disrupted functional connectivity of the anterior cingulate cortex in cirrhotic patients without overt hepatic encephalopathy: a resting state fMRI study. *PloS One*, 8(1), e53206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053206>
- Zhang, L. J., Wu, S., Ren, J., & Lu, G. M. (2014). Resting-state functional magnetic resonance imaging in hepatic encephalopathy: current status and perspectives. *Metabolic Brain Disease*, 29(3), 569-582. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9504-9>
- Zhang, L. J., Yang, G., Yin, J., Liu, Y., & Qi, J. (2007a). Abnormal default-mode network activation in cirrhotic patients: a functional magnetic resonance imaging study. *Acta Radiologica (Stockholm, Sweden: 1987)*, 48(7), 781-787. <https://doi.org/10.1080/02841850701422161>
- Zhang, L. J., Yang, G., Yin, J., Liu, Y., & Qi, J. (2007b). Neural mechanism of cognitive control impairment in patients with hepatic cirrhosis: a functional magnetic resonance imaging study. *Acta Radiologica*, 48(5), 577-587. <https://doi.org/10.1080/02841850701308378>
- Zhang, L. J., Zheng, G., Zhang, L., Zhong, J., Wu, S., Qi, R., ... Lu, G. (2012). Altered brain functional connectivity in patients with cirrhosis and minimal hepatic encephalopathy: a functional MR imaging study. *Radiology*, 265(2), 528-536. <https://doi.org/10.1148/radiol.12120185>
- Zhang, L., Qi, R., Wu, S., Zhong, J., Zhong, Y., Zhang, Z., ... Lu, G. (2012). Brain default-mode network abnormalities in hepatic encephalopathy: a resting-state functional MRI study. *Human Brain Mapping*, 33(6), 1384-1392. <https://doi.org/10.1002/hbm.21295>
- Zhang, S., & Li, C. R. (2012). Functional connectivity mapping of the human precuneus by resting state fMRI. *Neuroimage*, 59(4), 3548-3562. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.11.023>
- Zhong, W.-J., Zhou, Z.-M., Zhao, J.-N., Wu, W., & Guo, D.-J. (2016). Abnormal spontaneous brain activity in minimal hepatic encephalopathy: resting-state fMRI study. *Diagnostic and Interventional Radiology (Ankara, Turkey)*, 22(2), 196-200. <https://doi.org/10.5152/dir.2015.15208>
- Zhu, X.-Q., Chen, H.-J., Wang, Y., Cui, Y., & Teng, G.-J. (2012). Aberrant Resting-State Corticostriatal Functional Connectivity in Cirrhotic Patients with Hyperintense Globus Pallidus on T1-Weighted MR Imaging. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048886>