

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Centro de Investigación Príncipe Felipe

Doctorado en Neurociencias



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Mecanismos moleculares del deterioro
cognitivo en encefalopatía hepática mínima.
Papel de la neuroinflamación en la alteración
de la neurotransmisión.

Tesis doctoral

Autor: Lucas Taoro González

Directores:

Vicente Felipo

Andrea Cabrera Pastor

Tutora académica:

Carmina Montoliu

Julio de 2018



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Valencia, 19 de julio de 2018

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

ANDREA CABRERA PASTOR, Doctora en Bioquímica y Biología Molecular, Investigadora del Laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigación Príncipe Felipe,

CARMINA MONTOLIU FÉLIX, investigadora de la FIHCV-INCLIVA y profesora del departamento de Patología de la Universidad de Valencia,

MANIFIESTAN: que el licenciado en Biología LUCAS TAORO GONZÁLEZ ha realizado, bajo su supervisión, en el laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigación Príncipe Felipe, el trabajo “MECANISMOS MOLECULARES DEL DETERIORO COGNITIVO EN ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA. PAPEL DE LA NEUROINFLAMACIÓN EN LA ALTERACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN” y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

El Director
Dr. Vicente Felipo

La Directora
Dra. Andrea Cabrera Pastor

La Tutora
Dra. Carmina Montoliu

AGRADECIMIENTOS

Si bien es mi nombre el que aparece como autor de esta tesis, lo cierto es que sería injusto atribuirme todo el mérito, pues son muchas las personas sin cuyo trabajo, ayuda, apoyo o simplemente presencia, no hubiera podido llevar este barco a buen puerto. Por eso quiero empezar por ellos.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis. Al Doctor Vicente Felipo, por acogerme en su laboratorio y darme la oportunidad de aprender tanto durante estos años. Y a la Doctora Andrea Cabrera, por todo lo que me ha enseñado y lo que hemos ido aprendiendo juntos, por ser un referente para mí, así como todo un ejemplo de trabajo duro, constancia y superación.

También quiero agradecer a mis compañeros del Laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigación Príncipe Felipe todo lo que me han aportado durante estos años que he compartido con ellos, a nivel profesional y también humano. Tanto a los que ya no están como a los que continúan: a Paqui y Mari Carmen, por hacer tan bien su labor de maestras y enseñarme la importancia de los detalles en el laboratorio; a Vite, Ana y Sherry, por ser mis post-docs de referencia, siempre dispuestos a disertar durante horas sobre la ciencia y sobre la vida; a Michele, por todo lo aprendido y también por lo reído; a Belén, Alba y Tiziano, por compartir conmigo como predocs este camino tortuoso; a las nuevas incorporaciones: Yaiza, María, Paola, Paula...por haber puesto también su granito de arena en mi etapa final. A los estudiantes de prácticas que han trabajado conmigo durante estos años: Ricardo, David, Noelia, Esperanza, Ferrán, Fernando... y los alumnos a los que he tenido la oportunidad de dar clase, por descubrirme lo enriquecedor de aprender enseñando. A Marta, piedra angular del laboratorio, sin la cual yo, al igual que el resto, habría ido tan perdido en tantas ocasiones, gracias por estar siempre ahí, aun cuando tu labor pasa injustamente desapercibida a veces. A mi querida Mar, compañera de experimentos y de confianzas, por todo lo que me has enseñado y ayudado, dentro y fuera del laboratorio. Y, finalmente, a mi compañera de fatigas, congresos, y burocracia, sin la cual nunca habría llegado sano y salvo a la pantalla final de este videojuego... Raquel, GRACIAS.

Quiero dar las gracias también a la gente de los otros laboratorios en los que he estado durante mi tesis. *I also would like to say thank you to the people from others laboratories where I have been during my PhD. On one hand to Dr Zafar Bashir and Dra Clea Warburton, from the MRC Centre for Synaptic Plasticity in Bristol (UK), as well as the members of their laboratories during my stay there: Paul, Gareth, Marie, Kat, Ola, Jasmine, Kerry, Jess... and specially Ellen, because of their kindness, patience and dedications to teach me and make me to enjoy and love the great city of Bristol.*

AGRADECIMIENTOS

Y, por otro lado, al Doctor Vicent Teruel, del Laboratorio de Circuitos Neuronales de la Universidad de Valencia. Necesitaría más espacio para darle las gracias como se merece, pero a fin de no aburrir al lector aún antes de entrar en materia, diré simplemente que, además de todo lo que he aprendido sobre neurociencia, análisis de señales, electrofisiología, MatLab y un largo etcétera, le debo haber reafirmado en mí la vocación docente y el convencimiento de que merece la pena trabajar por el cambio desde dentro. Quiero agradecer también a los miembros de su laboratorio la acogida que me brindaron y todo lo aprendido: a Joana, María, Danae, Esteban, Hanna y Alicia.

No quiero olvidarme tampoco de dar las gracias a todas aquellas personas que han contribuido a mi formación previa, y, de alguna forma, me han empujado y dado las herramientas para llegar hasta aquí. A mis profesores y compañeros del Máster en Neurociencias de la Universidad de Valencia, especialmente Isabel, Carlos y Rosa. A mis tutores, como alumno interno en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Sevilla, Álvaro, y como becario de colaboración en la Universidad de La Laguna, Mario, con quienes di mis primeros pasos en las neurociencias. A mis profesoras, también de la Universidad de la Laguna, Aixa, Covadonga y Margarita, por todo lo que me enseñaron durante la carrera y por su consejo e interés permanente desde entonces. Y a mis amigos y compañeros biólogos de la promoción 2008-2013, especialmente a Walter, Manu, Esther, Henoc, Ángel y Bea.

A un nivel más personal, quiero dar las gracias a mis amigas de Tenerife, Almudena, Laura y Cristina, porque aún en la distancia han estado siempre ahí y los reencuentros han sido para mí una de las formas más eficaces de recargar las pilas para volver al trabajo. También a mis amigos de Valencia, especialmente Abi, Javi y Navarro, por tantos entrenamientos, torneos, cenas y conversaciones profundas.

También quiero tener un recuerdo especial para Víctor, mi compañero de viaje durante la mayor parte de estos años de tesis. Gracias por tu paciencia, tu comprensión, tu fe en mí y tu apoyo incondicional. Y a sus padres, Antonia y Andrés, y su hermana Paula, por acogerme desde el primer día como uno más de la familia y hacerme sentir un poco más como en casa.

Y, por último, pero no menos importante (y en este caso incluso más), quiero acabar expresando mi más profundo agradecimiento a mi familia. A mi tío Memel, que me impulsó a esforzarme al máximo desde pequeño y, con su ejemplo, me animó a abrazar la ciencia con ganas e ilusión, sé que le habría encantado compartir conmigo este momento. A mis padres, José Luis y Laly, a quienes les debo todo lo que soy, por ser ejemplo y testimonio de vida para mí desde que se levantan hasta que se acuestan. Y a mis hermanos, M^a Isabel y Diego, pues son dos pilares fundamentales sin los cuales no concibo mi vida. Nadie negaría que somos hermanos y a la vez somos diametralmente diferentes, pero formamos un gran equipo.

A mis padres y mis hermanos

“La ciencia puede descubrir lo que es cierto, pero no lo que es bueno, justo y humano.”

Dr. Marcus Jacobson

**INDICE Y
ABREVIATURAS**

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA CRÓNICA: ALTERACIONES COGNITIVAS ASOCIADAS. PAPEL DE LA HIPERAMONEMIA Y LA INFLAMACIÓN	3
1.1. Encefalopatía hepática crónica	3
1.1.1. Alteraciones cognitivas asociadas a encefalopatía hepática crónica.....	5
1.2. Metabolismo y toxicidad del amonio	8
1.2.1. Contribución de la hiperamonemia a la encefalopatía hepática crónica.....	12
1.3. Inflamación y neuroinflamación	13
1.3.1. Papel de la IL-1 β en la neuroinflamación.....	14
1.3.2. Contribución de la inflamación y la neuroinflamación a la encefalopatía hepática crónica.....	15
2. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA CRÓNICA EN MODELOS ANIMALES	17
2.1. Modelo de EH por anastomosis porta-cava (PCS, Porta-Caval Shunt)	17
2.2. Modelo de EH por Ligadura Biliar (BDL, Bile duct-ligation)	18
2.3. Modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático	18
3. MEMORIA Y APRENDIZAJE. PAPEL DEL LÓBULO TEMPORAL MEDIAL	19
3.1. Memoria de reconocimiento	20
3.2. Memoria y aprendizaje espacial	23
3.3. Memoria de trabajo espacial	24
4. MECANISMOS MOLECULARES DE LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE	25
4.1. Receptores ionotrópicos de glutamato	26
4.1.1. Receptores AMPA.....	26
4.1.2. Receptores NMDA.....	27
4.2. Receptores GABA_A	28
4.3. Mecanismos de plasticidad sináptica	30
4.3.1. Plasticidad sináptica en el hipocampo.....	31
4.3.2. LTP (potenciación a largo plazo).....	32
4.3.3. LTD (depresión a largo plazo).....	34
4.3.4. Neurontransmisión GABAérgica y plasticidad sináptica.....	36
5. EFECTOS DE LA NEUROINFLAMACIÓN SOBRE LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE. PAPEL DE LA IL-1β	37
5.1. Efectos de la neuroinflamación y la IL-1β sobre la plasticidad sináptica	37
5.2. Efectos de la neuroinflamación sobre la memoria de reconocimiento	39

5.3. Efectos de la neuroinflamación sobre el aprendizaje espacial: memoria de referencia y de trabajo.....	39
6. MODULACIÓN DE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA, LA MEMORIA Y LA NEURINFLAMACIÓN POR GMP CICLICO (GMPc). PAPEL EN ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA.....	40
7. ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN COGNITIVA Y LA PLASTICIDAD SINÁPTICA Y EN MODELOS ANIMALES DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA E HIPERAMONEMIA.....	43
7.1. Alteraciones cognitivas en modelos animales de encefalopatía hepática e hiperamonemia.....	43
7.2. Mecanismos moleculares de las alteraciones cognitivas en modelos animales de encefalopatía hepática e hiperamonemia.....	44

<u>OBJETIVOS.....</u>	<u>47</u>
-----------------------	-----------

<u>MATERIALES Y MÉTODOS.....</u>	<u>51</u>
----------------------------------	-----------

1. MODELO EXPERIMENTAL: hiperamonemia crónica sin fallo hepático.....	53
2. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO: implantación de mini-bombas osmóticas.....	53
3. TEST DE APRENDIZAJE Y MEMORIA.....	54
3.1. Memoria espacial y de trabajo: laberinto radial de 8 brazos.....	54
3.2. Memoria de reconocimiento: NOR y NOL.....	56
4. EXPERIMENTOS EX VIVO EN RODAJAS FRESCAS DE HIPOCAMPO.....	57
5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA INMUNOBLOT.....	58
6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR INMUNOBLOT.....	60
7. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	63
7.1. Análisis de las imágenes de inmunohistoquímica.....	64
7.1.1. Activación de la microglía (Iba1).....	64
7.1.2. Contenido de IL-1 β por inmunohistoquímica.....	65

<u>RESULTADOS.....</u>	<u>67</u>
------------------------	-----------

1. EFFECTOS DEL BLOQUEO IN VIVO DEL RECEPTOR DE IL-1 SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN, LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE RECEPTORES Y LAS ALTERACIONES COGNITIVAS EN RATAS HIPERAMONÉMICAS.....	69
1.1. La hiperamonemia altera tanto la memoria espacial de referencia como la de trabajo en el laberinto radial. El bloqueo in vivo del receptor de IL-1 restaura únicamente la memoria de trabajo.....	69

INDICE

1.2.	La hiperamonemia altera la memoria de reconocimiento de estímulos nuevos, ya sean objetos o localizaciones espaciales. El bloqueo del receptor de IL-1 mejora únicamente el reconocimiento de objetos nuevos.....	71
1.3.	La hiperamonemia induce activación de la microglía en el hipocampo y las cortezas perirrinial, postrrinial y prefrontal. El bloqueo del receptor de IL-1 reduce esta activación de la microglía en todas las áreas estudiadas excepto la corteza postrrinial.....	72
1.4.	La hiperamonemia aumenta el contenido de IL-1 β en hipocampo, corteza prefrontal y corteza perirrinial, pero no en corteza postrrinial.....	74
1.5.	La hiperamonemia altera la expresión en membrana de varias subunidades de los receptores NMDA, AMPA y GABA _A en el hipocampo. El bloqueo del receptor de IL-1 normaliza la expresión en membrana de las subunidades GluN2A del receptor NMDA, GluA1 del receptor AMPA y α 1 del receptor GABA _A	77
1.6.	La hiperamonemia disminuye la expresión en membrana de las subunidades de los receptores NMDA, AMPA y GABA _A en la corteza prefrontal. El bloqueo del receptor de IL-1 restaura todas estas alteraciones.....	79
2.	MECANISMOS MOLECULARES DE LAS ALTERACIONES INDUCIDAS POR LA IL-1β EN LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE RECEPTORES DE GLUTAMATO EN EL HIPOCAMPO DE RATAS HIPERAMONÉMICAS.....	83
2.1.	La hiperamonemia altera la expresión en membrana y la fosforilación de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA en hipocampo.....	84
2.2.	Las alteraciones en la expresión en membrana y fosforilación de GluA1 y GluA2 en el hipocampo de ratas hiperamonémicas están mediadas por una sobreactivación del receptor de IL-1.....	85
2.3.	Los efectos de la IL-1 β sobre GluA1 y GluA2 están mediados por la activación de la quinasa Src.....	85
2.4.	GluN2B y p38 median los efectos de IL-1 β y Src sobre GluA2 pero no sobre GluA1.....	87
2.5.	La MAP quinasa p38 altera la fosforilación y expresión en membrana de GluA2 inhibiendo a PKC ζ	89
2.6.	CaMKII y PKC δ median el efecto de IL-1 β y Src sobre la fosforilación y la expresión en membrana de GluA1.....	92
3.	MODULACIÓN POR GMPc EXTRACELULAR DE LA NEUROINFLAMACIÓN Y LAS ALTERACIONES INDUCIDAS POR LA HIPERAMONEMIA EN LA FOSFORILACIÓN Y LA	

EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE RECEPTORES DE GLUTAMATO EN EL HIPOCAMPO.....	97
3.1. El GMPc extracelular restaura las alteraciones en la fosforilación y la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.....	97
3.2. En el hipocampo de ratas hiperamonémicas, el GMPc extracelular restaura la fosforilación y la expresión en membrana de GluA2 disminuyendo la inhibición de PKCζ por p38 al normalizar la fosforilación y expresión en membrana de la subunidad GluN2B del receptor NMDA.....	97
3.3. El GMPc extracelular normaliza la fosforilación y expresión en membrana de GluN2B en el hipocampo de ratas hiperamonémicas reduciendo la fosforilación de Src al disminuir los niveles de IL-1β.....	100
3.4. El GMPc disminuye los niveles de IL-1β en el hipocampo de ratas hiperamonémicas modulando la activación de la microglía.....	100
3.5. El GMPc extracelular revierte las alteraciones en la fosforilación y la asociación a la membrana de la CaMKII.....	102
<u>DISCUSIÓN.....</u>	105
1. EFECTOS DEL BLOQUEO IN VIVO DEL RECEPTOR DE IL-1 SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN, LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE RECEPTORES Y LAS ALTERACIONES COGNITIVAS EN RATAS HIPERAMONÉMICAS.....	107
1.1. Efectos del tratamiento con IL-1Ra sobre las alteraciones cognitivas que presentan las ratas hiperamonémicas.....	107
1.2. Efectos del tratamiento con IL-1Ra sobre la neuroinflamación que presentan las ratas hiperamonémicas en hipocampo y corteza.....	108
1.3. Implicaciones funcionales de las alteraciones causadas por la hiperamonemia en la expresión en membrana de receptores en hipocampo y corteza prefrontal. Efectos del bloqueo del receptor de IL-1.....	112
1.3.1. Memoria de trabajo y de referencia espacial.....	113
1.3.2. Memoria de reconocimiento.....	116
2. MECANISMOS MOLECULARES DE LAS ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO EN EL HIPOCAMPO DE RATAS HIPERAMONÉMICAS.....	118

INDICE

3. MECANISMOS MOLECULARES DE LA MODULACION POR GMPc EXTRACELULAR DE LAS ALTERACIONES CAUSADAS POR LA HIPERAMONEMIA Y LA NEUROINFLAMACIÓN EN LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE RECEPTORES EN EL HIPOCAMPO.....	123
---	-----

<u>CONCLUSIONES</u>	129
---------------------------	-----

<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	133
---------------------------	-----

ABREVIATURAS

- ATP** 5'-trifosfato de adenosina
- AMPA** ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropiónico
- APS** Persulfato de amonio
- BCA** Ácido bicinconínico
- BCIP** Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
- BDL** Ligadura del conducto biliar
- BS3** Bis-sulfosuccinimidyl-suberate
- BSA** Albumina de suero bovino
- CA (1, 2 y 3)** Asta de Amón, capas 1, 2 y 3
- CaMKII** Proteína quinasa II dependiente de calmodulina
- DAB** Diaminobenzidina
- EEG** Electroencefalograma
- EGTA** Ácido etilenglicol-bis-N', N', N', N'-tetraacético
- EH** Encefalopatía Hepática
- EHM** Encefalopatía Hepática Mínima
- EHPVO** Obstrucción de la vena porta extra-hepática
- EPSP** Potencial excitatorio postsináptico
- GABA** Ácido Gamma-aminobutírico
- GABA_A** Receptor de GABA tipo A
- GC** Guanilato ciclasa
- GDH** Glutamato deshidrogenasa
- GMP** Guanosín 3', 5'- monofosfato
- GMPc** Guanosín 3', 5'- monofosfato cíclico
- Glu** Glutamato GTP Guanosín-5'-trifosfato
- GluA1** Subunidad 1 del receptor AMPA
- GluA2** Subunidad 2 del receptor AMPA
- GluN1** Subunidad 1 del receptor NMDA

ABREVIATURAS

- GluN2A** Subunidad 2A del receptor NMDA
- GluN2B** Subunidad 2B del receptor NMDA
- HA** BHiperamonemia
- IBA-1** Ionized calcium binding adaptor molecule-1
- IL-1 α** Interleucina 1 alfa
- IL-1 β** Interleucina 1 beta
- IL-1R** Receptor de interleucina 1
- IL-1Ra** Antagonista del receptor de IL-1
- IL-18** Interleucina 18
- IL-6** Interleucina 6
- LEC** Corteza entorrinal lateral
- LPS** Lipopolisacárido bacteriano
- LTD** Depresión a largo plazo (long term depression)
- LTM** Memoria a largo plazo
- LTP** Potenciación a largo plazo (long term potentiation)
- MEC** Corteza entorrinal medial
- MTL** Lóbulo temporal medial
- MWM** Laberinto acuático de Morris
- NBT** Nitroblue Tetrazolium
- NF- κ B** Factor nuclear kappa B
- NH₄⁺** Ión amonio
- NMDA** Ácido N-metil-D-aspartato
- NO** Óxido nítrico
- NOL** Novel object location
- NOR** Novel object recognition
- PBS** Tampón fosfato salino
- PCS** Anastomosis porta-cava (portacaval shunt)

ABREVIATURAS

- PDE** Fosfodiesterasa
- PER** Corteza perirrinal
- PFA** Paraformaldehído
- PFC** Corteza prefrontal
- PHES** Psicometric hepatic encephalopathy tests
- Pi** Fosfato inorgánico
- PKA** Proteín-quinasa A
- PKC** Proteín-quinasa C
- PKC δ** Isoforma delta de la proteín-quinasa C
- PKC ζ** Isoforma zeta de la proteín-quinasa C
- PKG** Proteína quinasa G
- POR** Corteza postrrinal
- PP1** Proteín-fosfatasa 1
- PP2A** Proteín-fosfatasa 2A
- PP2B** Proteín-fosfatasa 2B (Calcineurina)
- PrLC** Corteza prefrontal prelímbica
- PVDF** Polifluoruro de vinilideno
- Ras-GRF2** Ras-Guanine Nucleotide-Releasing Factor
- RM** Memoria especial de referencia
- SDS** Dodecilsulfatosódico
- SEM** Error estándar de la media
- Ser** Residuo de Serina
- SNC** Sistema nervioso central
- STM** Memoria a corto plazo
- TEMED** N', N', N', N'- Tetrametilenetilendiamina
- Thr** Residuo de treonina
- TNF- α** Factor de necrosis tumoral alfa

ABREVIATURAS

Tris Tris-(hidroximetil)-aminometano

Tyr Residuo de tirosina

WM Memoria de trabajo

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA CRÓNICA: ALTERACIONES COGNITIVAS ASOCIADAS. PAPEL DE LA HIPERAMONEMIA Y LA INFLAMACIÓN.

1.1. Encefalopatía hepática crónica

La encefalopatía hepática (EH) es un síndrome neuropsiquiátrico complejo, que se puede presentar en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas o agudas. Se caracteriza por una progresiva alteración de funciones cognitivas, motoras y del sueño como consecuencia del fallo hepático y puede progresar en diferentes estadios hasta el coma y la muerte. Los mecanismos que conducen a las alteraciones neurológicas en la EH todavía no están bien establecidos, pero comienzan a identificarse en modelos animales (De Flora *et al.*, 1996; Erceg *et al.*, 2005a; 2005b; Cauli *et al.*, 2006; 2007; 2009; Agusti *et al.*, 2011; Hernández-Rabaza *et al.*, 2015, 2016a, 2016b; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a) La EH clínica se clasifica en 3 tipos: A, B y C (Ferenci *et al.*, 2002)

- EH tipo A: EH aguda, suele ocurrir en el marco de un fallo hepático fulminante con necrosis masiva del hígado y una rápida progresión de los síntomas. Entre las causas cabe destacar las hepatitis virales agudas, intoxicación por paracetamol o por las reacciones idiosincrásicas a fármacos. Puede ser reversible o conducir a la muerte. El grado de mortalidad en la EH aguda es muy elevado y se debe frecuentemente a un aumento de la presión intracraneal como consecuencia de un edema cerebral.

- EH tipo B: EH crónica, por derivación porto-sistémica sin enfermedad hepatocelular intrínseca. Se han descrito muchos casos entre la población japonesa (Watanabe, 2000). Existen derivaciones porto-sistémicas espontáneas, como la causada por la obstrucción de la vena porta extra-hepática (EHPVO). Es una causa común de hipertensión portal en niños (Yachha *et al.*, 1996). Estos pacientes presentan flujo sanguíneo hepático reducido, concentraciones de amonio en sangre aumentadas, la relación glutamina/creatinina aumentada y en ocasiones anastomosis porta-cava espontánea. También puede originar EH tipo B la ausencia congénita de vena porta, aunque es poco frecuente. En este caso los pacientes presentan una malformación de forma que las venas mesentéricas drenan su sangre directamente a la circulación sistémica (Grazioli *et al.*, 2000). Normalmente se detecta cuando son niños y no porque presenten encefalopatía sino porque la función hepática está dañada. A medida que crecen y llegan a la edad adulta desarrollan encefalopatía y daño hepático y renal (Wojcicki *et al.*, 2004).

- EH tipo C: EH crónica, asociada a cirrosis hepática e hipertensión portal. Es la más frecuente. También genera derivaciones porto-sistémicas como consecuencia de enfermedades crónicas del hígado, generalmente cirrosis, con una apreciable derivación de la sangre portal a la circulación sistémica (Encefalopatía Porto-Sistémica, PSE). Se pueden producir episodios de EH clínica como consecuencia de determinados factores desencadenantes (hemorragia digestiva, alta ingesta de proteínas, estreñimiento, infección). Estos episodios de EH son habitualmente reversibles cuando el factor desencadenante es eliminado. La derivación porto-sistémica también se realiza en los hospitales para tratar problemas como la hemorragia digestiva secundaria a ruptura de várices esófago-gástricas, una complicación muy frecuente y severa de los pacientes con cirrosis hepática e hipertensión portal.

La EH es un factor predictivo de mortalidad en los pacientes cirróticos. Se estima que 3 años después del primer episodio de encefalopatía clínica la mortalidad es del 60-80%. Las encefalopatías hepáticas de tipo B y C pueden ser clínicamente evidentes (encefalopatía hepática clínica) o no (encefalopatía hepática mínima). La encefalopatía hepática clínica se clasifica en tres formas según el patrón temporal de su manifestación: ocasional, recurrente y persistente. 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. Y la EH persistente se caracteriza por alteraciones neuropsiquiátricas evidentes y continuas, aunque de duración variable en el tiempo y aparece sin una clara causa desencadenante.

Además de los 3 tipos de EH clínica mencionados, existe una forma temprana más leve denominada encefalopatía hepática mínima (EHM). Pacientes sin signos evidentes de EH clínica pueden presentar diversos déficits cognitivos (percepción visuo-espacial, atención, concentración) y motores que no son detectables en un examen neurológico rutinario, pero se ponen de manifiesto cuando se realizan test psicométricos o neurofisiológicos adecuados. Este tipo de EH se denominaba encefalopatía hepática subclínica o latente, términos que han sido reemplazados por encefalopatía hepática mínima (EHM) (Lockwood, 1993 y 2000; Schomerus y Hamster, 2001; Ferenci *et al.*, 2002; Amodio *et al.*, 2004; Romero-Gómez *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. Un 35-50% de los pacientes adultos con cirrosis hepática presentan EHM (Mínguez *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2008).

INTRODUCCIÓN

A niños con EHPVO se les realizó una batería de 9 test neuropsicológicos para medir la memoria, entendimiento verbal, aprendizaje de nombres y cifras, etc. El 41% de los niños presentó EHM (Yadav *et al.*, 2010).

Se ha descrito que el 50% de los pacientes cirróticos con EHM desarrollan EH evidente durante los siguientes 6 meses (Yen y Liaw, 1990). Con la finalidad de detectar y valorar la EHM se ha llegado a un consenso en el uso de pruebas psicométricas, seleccionando como test de referencia la batería PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score) (Weissenborn *et al.*, 2001).

1.1.1. Alteraciones cognitivas asociadas a encefalopatía hepática crónica

La encefalopatía hepática crónica se desarrolla lentamente y puede presentar distintos grados en la sintomatología. Los signos varían desde ligeros déficits de atención, cambios en la personalidad y enlentecimiento psicomotor en la EHM, a falta de atención y síntomas extrapiramidales como hipomimia (falta de expresión facial) y bradiquinesia en grado I de EH, desorientación y comportamiento extraño en grado II, acabando finalmente en estupor y coma en grados III y IV (Weissenborn *et al.*, 2005a).

Los síntomas más tempranos suelen ser alteraciones en el sueño y cambios en el comportamiento, que no son detectables durante el examen neurológico rutinario del individuo, pero disminuyen su calidad de vida (Slowik *et al.*, 2001). Se ha descrito irritabilidad, apatía, trastornos de la conducta, cambios en el apetito, mirada fija, amnesia, cambios en el temperamento y en la personalidad. Algunos pacientes pasan de la depresión a la euforia en pocos minutos. Otros pacientes presentan sólo depresión o euforia alternadas con un temperamento estable. Los síntomas paranoicos suelen ser comunes durante el estupor como resultado de las dificultades en la percepción y la interpretación. También pueden aparecer alucinaciones (Sherlock *et al.*, 1954).

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

En concreto en cuanto las alteraciones cognitivas, los síntomas iniciales son falta de concentración y de atención y disminución de la capacidad intelectual. Los pacientes con EH presentan un descenso continuo en la atención acompañado de un descenso en el estado de alerta desde el grado II al grado III finalizando en coma (Weissenborn *et al.*,

2005b). 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 hay que repetir la cuestión y las repuestas son lentas y a menudo carentes de sentido (Weissenborn *et al.*, 2005a).

Existe cierta controversia en cuanto a si existe o no deterioro en la memoria (Weissenborn *et al.*, 2003) en los pacientes con EH. 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.*, 2005a). En los test que dependen de la atención, como ocurre en muchos test de memoria, es difícil saber a qué alteración atribuir un error, a la atención o a la memoria. Existen test que permiten diferenciar entre atención y memoria. Uno de ellos es la retención de dígitos que mide la memoria a corto plazo, cuantificando el número de dígitos ordenados de forma seriada que un paciente puede recordar de forma correcta tras haberlos escuchado o leído. Otro test de memoria a corto plazo es la lista de palabras de Luria (Christensen, 1984). En estos dos test los pacientes con EH obtienen peores resultados que los sujetos control (Weissenborn *et al.*, 2005a). El test de memoria de fotografías o dibujos mide la memoria a largo plazo. Se muestran al paciente varias imágenes duplicadas y desordenadas y tiene que recordar donde estaban las imágenes duplicadas y emparejarlas. En este test también se han observado alteraciones en los pacientes con EH (Weissenborn *et al.*, 2005a).

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

Los pacientes con hepatitis crónica causada por el virus C también muestran alteraciones cognitivas en tareas que requieren atención, aprendizaje, velocidad psicomotora y flexibilidad mental, indicando que estos pacientes presentan alteraciones

INTRODUCCIÓN

psicomotoras similares a los de los pacientes con otras enfermedades crónicas del hígado como la cirrosis por consumo crónico de alcohol (Hilsabeck *et al.*, 2002).

Como se ha mencionado anteriormente, en los pacientes con EHM las alteraciones cognitivas no son evidentes y sólo se pueden detectar realizando test 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 la batería denominada *Psychometric Hepatic Encephalopathy Score* (PHES) que consta de 5 test psicométricos:

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

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

Las alteraciones en la capacidad de atención, procesamiento de la información, coordinación motora, etc, tienen importantes consecuencias en la vida diaria de los pacientes (Dhiman y Chawla, 2009). Por ejemplo, la mayoría de los pacientes cirróticos con EHM tienen disminuida la capacidad de conducir vehículos (Schomerus *et al.*, 1981; Bajaj *et al.*, 2009). Los pacientes con EHM presentan alteraciones en funciones de la vida diaria como la interacción social, comportamiento emocional, dormir, trabajar o realizar labores domésticas (Groeneweg *et al.*, 1998; Prasad *et al.*, 2007). Además, se ha visto que los pacientes con EH presentan alteraciones en la memoria de trabajo (Ahluwalia *et al.*, 2014) que persisten aun cuando el síndrome ha revertido (Bajaj *et al.*, 2010) y parecen deberse a un mal funcionamiento de la corteza prefrontal (Liao *et al.*, 2012).

A continuación, se abordarán los mecanismos por los cuales se altera la función cognitiva y motora en EH crónica. Tradicionalmente, la hiperamonemia (niveles elevados de amonio en sangre) ha sido considerada el principal factor, ya que el amonio es uno de las toxinas que no se procesa correctamente cuando hay fallo hepático. Sin embargo, más recientemente se ha empezado a desvelar el papel de la inflamación en estos pacientes, y hoy en día se acepta que la sinergia entre hiperamonemia y neuroinflamación es el principal desencadenante de las alteraciones neuropsiquiátricas que presentan (Felipo, 2013).

1.2. Metabolismo y toxicidad del amonio

El amonio es un compuesto derivado del metabolismo de compuestos nitrogenados y se produce en todas las células del organismo como resultado de la degradación de aminoácidos, nucleótidos y otros compuestos nitrogenados. En solución acuosa el amoniaco (NH_3) se encuentra en equilibrio con el ion amonio (NH_4^+). A pH fisiológico la reacción está desplazada hacia la formación de NH_4^+ :



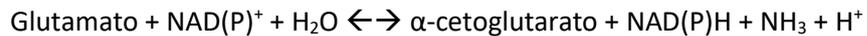
El NH_3 es un gas capaz de atravesar libremente las membranas celulares. Sin embargo, el ion NH_4^+ necesita transportadores para atravesarlas, como los que se han descrito en hígado y cerebro (Amlal y Soleimani, 1997; Ramirez *et al.*, 1999; Marcaggi y Coles, 2001; Weiner, 2004).

INTRODUCCIÓN

El amonio tiene un papel fundamental en la homeostasis del nitrógeno, participando en la síntesis de importantes compuestos para el organismo como la glutamina o el glutamato. No obstante, a concentraciones en sangre y cerebro elevadas, resulta tóxico produciendo alteraciones funcionales en el sistema nervioso central (Gerok y Haussinger, 1984; Felipo y Butterworth, 2002). Así pues, en condiciones fisiológicas, los niveles de amonio en sangre ($\approx 100 \mu\text{M}$ en humanos, $\approx 150 \mu\text{M}$ en rata) y en cerebro son estrictamente regulados por distintas reacciones que mantienen el equilibrio entre su formación y su eliminación.

En mamíferos, la formación de amonio está catalizada principalmente por las enzimas (i) glutamato deshidrogenasa, (ii) glutaminasa y (iii) enzimas del ciclo de los nucleótidos de purina:

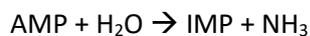
(i) La glutamato-deshidrogenasa se localiza principalmente en hígado y en cerebro. Cataliza la siguiente reacción:



(ii) La glutaminasa se localiza principalmente en hígado, riñón, intestino y cerebro. En cerebro es abundante en las terminaciones sinápticas de las neuronas glutamatérgicas, participando en el ciclo glutamato-glutamina (Figura 1) con la reacción:



(iii) Las enzimas del ciclo de los nucleótidos de purinas son especialmente abundantes en músculo y cerebro. Parecen ser responsables de la generación de una fracción importante del amonio cerebral (Schultz y Lowenstein, 1978):



En los animales ureotélicos, incluidos los seres humanos, el amonio es eliminado principalmente en el hígado, a través del ciclo de la urea (Figura 2). Mediante este ciclo el amonio se incorpora en urea, la cual se excreta por la orina. En otros órganos, como cerebro y músculo, que no poseen el ciclo de la urea, el amonio es detoxificado esencialmente por la glutamina-sintetasa.

Esta enzima tiene un papel muy importante en el sistema nervioso central, donde se localiza en los astrocitos (Martinez-Hernandez *et al.*, 1977; Norenberg y Martinez-Hernandez, 1979), participando en el ciclo glutamato-glutamina entre astrocitos y neuronas

(Figura 1). La glutamina-sintetasa incorpora el ion amonio al glutamato formando glutamina en una reacción que consume ATP.

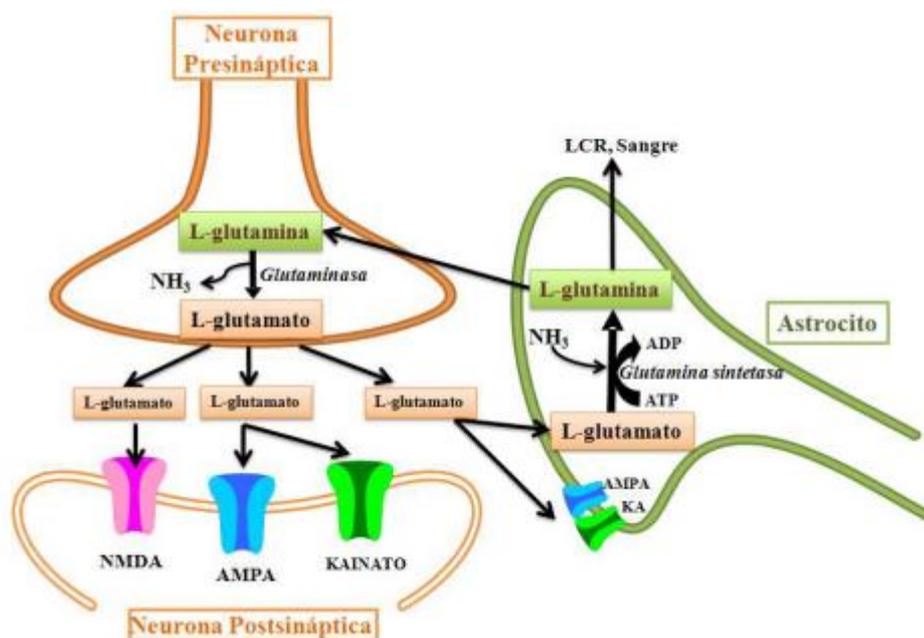
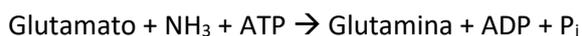


Figura 1. Ciclo glutamato-glutamina en sinapsis glutamatérgicas del cerebro. La neurona presináptica libera glutamato a la hendidura sináptica, que activa los correspondientes receptores (AMPA, NMDA y Kainato principalmente) en la neurona post-sináptica. El exceso de glutamato es recaptado rápidamente por transportadores situados tanto en las propias neuronas como en los astrocitos que rodean la sinapsis. En los astrocitos, la glutamina-sintetasa incorpora amonio al glutamato transformándolo en glutamina. Esta glutamina es liberada al medio extraelular y captada por neuronas, donde es transformada de nuevo por la glutaminasa en glutamato, que vuelve a incluirse en vesículas sinápticas para su liberación. *Imagen extraída de: Cabrera-Pastor, A. (2014) Modulación de la vía Glu-NO-GMPc y del aprendizaje por GMPc extracelular en cerebelo. Mecanismos moleculares implicados. Alteraciones en modelos animales de hiperamonemia y encefalopatía hepática (Tesis doctoral). Universidad de Valencia, Valencia.*



La glutamina formada se libera al torrente sanguíneo permitiendo el transporte del amonio en forma no tóxica desde el cerebro hasta el hígado, donde la glutamina es escindida por la glutaminasa, formando amonio que se eliminará a través del ciclo de la urea.

INTRODUCCIÓN

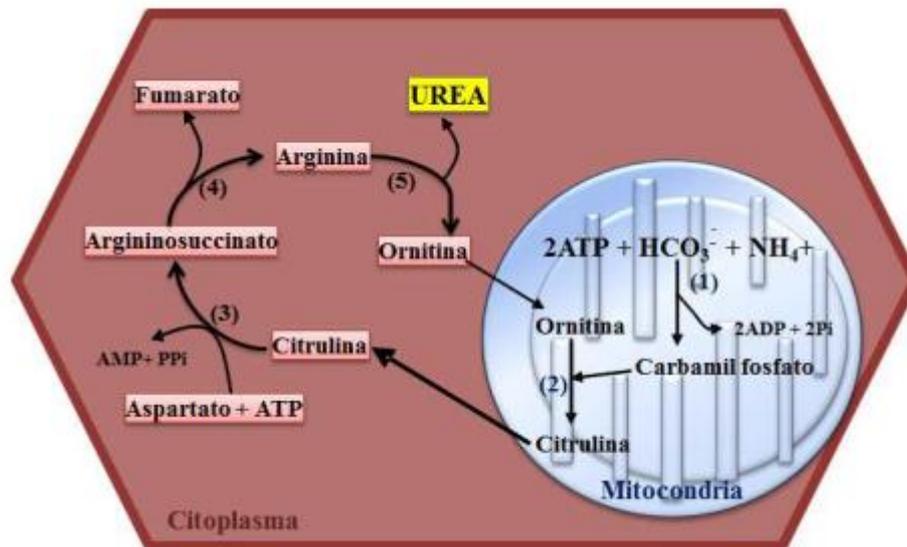


Figura 2. Ciclo de la urea en el hígado. En la mitocondria, el amonio es incorporado por la carbamil fosfato-sintetasa (1) al carbamil fosfato, que es combinado con ornitina por la ornitina-transcarbamilasa (2) para formar citrulina. Ya en el citoplasma, la argininosuccinato-sintetasa (3) combina la citrulina con el aspartato para formar argininosuccinato, que es descompuesto en fumarato y arginina por la argininosuccinasa (4). La arginasa (5) cataliza la ruptura de la arginina en ornitina y urea. La ornitina vuelve a la mitocondria para iniciar de nuevo el ciclo y la urea es liberada del hígado a la sangre y eliminada en la orina. *Imagen extraída de: Cabrera-Pastor, A. (2014) Modulación de la vía Glu-NO-GMPc y del aprendizaje por GMPc extracelular en cerebelo. Mecanismos moleculares implicados. Alteraciones en modelos animales de hiperamonemia y encefalopatía hepática (Tesis doctoral). Universidad de Valencia, Valencia.*

Cuando existe fallo hepático, la detoxificación del amonio no se lleva a cabo correctamente y se elevan sus niveles en sangre y cerebro. El estado de hiperamonemia en el organismo daña la función cerebral, produciendo buena parte de las alteraciones neurológicas presentes en el síndrome de encefalopatía hepática crónica (ver apartado 1.1.1). Los niveles elevados de amonio alteran la transmisión sináptica. Una de las razones es que el tamaño y la carga iónica del NH_4^+ en solución acuosa es muy similar al ion potasio (K^+), por lo que muchos enzimas y canales iónicos que utilizan K^+ pueden utilizar también NH_4^+ . Por ejemplo, el NH_4^+ puede sustituir al K^+ en la actividad de la ATPasa intercambiadora de Na^+/K^+ en neuronas (Moser, 1987). Esta enzima tiene un papel esencial en el mantenimiento y control del potencial de membrana en neuronas, y por tanto en la despolarización/repolarización de la membrana celular y en la transmisión sináptica. Alteraciones en la función de la ATPasa Na^+/K^+ juegan un papel importante en los efectos

patológicos de la hiperamonemia aguda a concentraciones altas de amonio (Kosenko *et al.*, 1994).

Por otro lado, el ciclo glutamato-glutamina entre astrocitos y neuronas (Figura 1) es el principal mecanismo por el que se recicla el neurotransmisor glutamato. Por tanto, este ciclo es esencial para mantener un correcto funcionamiento de la neurotransmisión glutamatérgica. El amonio tiene un papel importante en este ciclo y el aumento de amonio en hiperamonemia afecta su función en algunas circunstancias.

Finalmente, en la última década se ha descubierto que la hiperamonemia es capaz de inducir neuroinflamación en modelos animales (Rodrigo *et al.*, 2010), la cual contribuye también a alterar la neurotransmisión y la función cognitiva (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016). El tratamiento de la hiperamonemia con tratamientos que reducen la neuroinflamación consigue revertir buena parte de las alteraciones cognitivas (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016).

1.2.1. Contribución de la hiperamonemia a la encefalopatía hepática crónica

Existen evidencias tanto experimentales como clínicas que indican que la hiperamonemia es uno de los principales factores responsables de las alteraciones neurológicas presentes en la encefalopatía hepática:

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

INTRODUCCIÓN

hepático como alteraciones del ritmo circadiano, disminución en la capacidad de aprendizaje y alteraciones motoras.

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

6. La neuropatología que se manifiesta en la encefalopatía hepática coincide con la que se observa como consecuencia de la exposición del cerebro a niveles altos de amonio:

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

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

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

1.3. Inflamación y neuroinflamación

La inflamación es una respuesta biológica del organismo frente a un estímulo externo considerado patológico. Por lo tanto, es un mecanismo de defensa cuya función principal es eliminar el origen del daño, sin embargo, no siempre es una respuesta beneficiosa. En ciertas enfermedades, el sistema inmunológico puede atacar a sus propias células provocando respuestas inflamatorias dañinas y llevando al organismo a un estado de inflamación crónica.

El cerebro, por su delicado funcionamiento, está protegido de influencias externas por la barrera hematoencefálica (BHE), que también lo aísla en gran medida del sistema inmune. Cuando se produce una infección, las citocinas no pueden atravesar la BHE directamente, por lo que son incapaces de producir un efecto directo en el cerebro. No obstante, el sistema inmune es capaz de transmitir señales al cerebro para que produzca una respuesta durante los procesos inflamatorios. La respuesta inmunitaria del SNC se produce fundamentalmente por la activación de la microglía, considerada como los macrófagos residentes del SNC (Bentivoglio *et al.*, 2011).

La microglía es muy sensible a los cambios que suceden en su entorno, constituyendo la primera línea defensiva del cerebro frente a una agresión (Lehnardt, 2010). La microglía activada se acumula en las zonas dañadas y expresa genes relacionados con la inflamación, produciendo citocinas proinflamatorias, enzimas relacionadas con el estrés oxidativo y nitrosativo, moléculas de adhesión y radicales libres (González-Scarano y Baltuch 1999, Block *et al.*, 2007).

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

La neuroinflamación se ha revelado en los últimos años como un fenómeno capaz de alterar el correcto funcionamiento del cerebro en muchas y diversas situaciones fisiopatológicas. Hoy en día se la considera uno de los principales desencadenantes de déficits cognitivos en numerosas enfermedades crónicas (como cirrosis o diabetes), mentales (como la esquizofrenia) y neurodegenerativas (como el Alzheimer) así como con alteraciones cognitivas post-operatorias y envejecimiento (Bilbo *et al.*, 2012; Cherniack, 2012; Boyer *et al.*, 2013; Hovens *et al.*, 2014; Takeda *et al.*, 2014; Tenorio-Laranga *et al.*, 2015).

1.3.1. Papel de la IL-1 β en la neuroinflamación

La interleucina 1 beta (IL-1 β) tiene un papel central en la neuroinflamación y ha sido identificada como un desencadenante clave en diversas enfermedades en las que ésta juega un papel: esclerosis múltiple, enfermedades neurodegenerativas, traumatismo craneoencefálico, retinopatía diabética... (Mendiola y Cardona, 2018) y también en encefalopatía hepática (Hernández-Rabaza *et al.*, 2015, 2016; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a). Junto con la IL-1 α , desencadena diversos procesos proinflamatorios al unirse a su receptor IL-1R. Existe un antagonista endógeno, el antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1Ra), que al competir con ambas formas de IL-1 por su unión al receptor, tiene efectos antiinflamatorios y contrarresta gran parte de sus efectos (Irikura *et al.*, 2002; Dinarello, 2011; Klementiev *et al.*, 2014).

Mientras que la IL-1 α se expresa de manera constitutiva en múltiples tipos celulares, la IL-1 β se considera una interleucina inducible, es decir, se secreta cuando el sistema inmune detecta algún tipo de señal patológica (Mendiola y Cardona, 2018). En el sistema nervioso central, aunque la primera y principal liberación la lleva a cabo la

INTRODUCCIÓN

microglía, también es secretada por astrocitos, células endoteliales, neuronas y oligodendrocitos.

Aunque sus principales dianas son la propia microglía, los astrocitos y las células endoteliales (Shaftel *et al.*, 2008), las neuronas también expresan el receptor de IL-1 en su membrana y la IL-1 β desencadena, también en ellas, la activación de una serie de vías de señalización intracelulares que implican a múltiples quinasas, factores de transcripción, etc. En concreto, se ha visto que, en neuronas de hipocampo, la IL-1 β liberada por la microglía modifica la expresión en membrana del receptor NMDA de glutamato, alterando así la entrada de calcio en las neuronas (Viviani *et al.*, 2006). Dicha entrada de calcio es fundamental en procesos de plasticidad sináptica y, de hecho, se ha demostrado en numerosos estudios que la IL-1 β inhibe la potenciación a largo plazo (LTP) en hipocampo (Kelly *et al.*, 2003, 2013; Wang *et al.*, 2012) un proceso que, como se explicará más adelante (ver apartado 4.3.1) es clave en la memoria y el aprendizaje dependientes de hipocampo.

Finalmente, es importante destacar el papel de la IL-1 β en desencadenar la respuesta neuroinflamatoria, ya que, al ser activadas por dicha interleucina, las células gliales y endoteliales liberan toda una gama de factores proinflamatorios: citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, prostaglandinas, especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico, metaloproteasas... Cabe destacar la inducción de la liberación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la IL-6, así como de la ciclo-oxigenasa COX-2, en microglía y astrocitos. Estos mediadores desencadenan la propagación de la respuesta neuroinflamatoria (Shaftel *et al.*, 2008).

1.3.2. Contribución de la inflamación y la neuroinflamación a la encefalopatía hepática crónica.

Hoy en día se acepta que, si bien la hiperamonemia es un factor clave en la EH crónica, es la sinergia de ésta con la inflamación y la neuroinflamación lo que desencadena las principales alteraciones neuropsiquiátricas propias del síndrome.

Shawcross *et al.* (2004) demostraron que la inflamación agrava las alteraciones neurológicas producidas por la hiperamonemia en pacientes cirróticos. Administraron a pacientes cirróticos una solución de aminoácidos para inducir hiperamonemia, la cual provocó un deterioro de la función neuropsicológica (evaluada mediante test psicométricos) cuando los pacientes presentaban inflamación, pero no tras la resolución de la misma. Estos datos indican que la inflamación y la hiperamonemia tienen efectos sinérgicos en la inducción de las alteraciones neurológicas en EH.

En 2012, Felipo y colaboradores llevaron a cabo un estudio con pacientes de diferentes etiologías que presentaban distinto grado de hiperamonemia e inflamación. Concluyeron que, en pacientes con enfermedades hepáticas, el deterioro cognitivo puede aparecer antes de la progresión a cirrosis si los niveles de hiperamonemia e inflamación son los suficientemente elevados y que, en los pacientes estudiados, uno de estos factores por sí solo, no provoca deterioro cognitivo, es necesaria la combinación de ambos y un cierto nivel para provocar un deterioro en la cognición, incluso en pacientes sin enfermedad hepática.

Diversos estudios han relacionado la gravedad de la EH en pacientes con un aumento en los niveles plasmáticos de diversas citocinas. Existe una correlación entre los niveles séricos de TNF- α (citocina proinflamatoria) y la severidad de la EH en pacientes con fallo hepático crónico (Odeh *et al.*, 2004). Por otra parte, Montoliu *et al.* (2009) mostraron que la IL-6 e IL-18 están aumentadas en pacientes cirróticos con EHM comparadas con pacientes sin EHM y que los pacientes con niveles más altos de estas interleucinas presentaron un peor resultado en la batería de test psicométricos realizados en el estudio, sugiriendo que alteraciones relacionadas con la IL-6 e IL-18 podrían contribuir al deterioro cognitivo en la EHM.

En cuanto a la neuroinflamación en EH, los estudios se han iniciado recientemente, por lo que todavía existen pocos estudios en humanos. La presencia de inflamación, tanto periférica como central, se ha visto que contribuye a las anomalías neuro-comportamentales observadas en EH crónica (Jayakumar *et al.*, 2015).

Cagnin *et al.* (2006) utilizaron la tomografía de emisión de positrones (PET) en 5 pacientes cirróticos con EHM y observaron un aumento en la detección del ligando del receptor TSPO (*translocator protein*) en el cerebro de pacientes. Este receptor está presente en células gliales activadas y se ha relacionado con la desregulación en la síntesis de neuroesteroides observada en pacientes con EH, por lo que Cagnin *et al.* sugieren que en el cerebro de estos pacientes podría haber una mayor activación glial.

El principal cambio patológico en cerebro en EH crónica se caracterizaba por la presencia de astrocitos de Alzheimer tipo II (Solitare, 1972; Martin *et al.*, 1987) que se caracterizan por el ensanchamiento celular y la falta de citoplasma. Sin embargo, estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado otras alteraciones anatomopatológicas en cerebros de pacientes con fallo hepático crónico. En estos pacientes, aún antes de que alcancen el estado de cirrosis, se produce una infiltración de linfocitos T a nivel de las meninges del cerebelo, asociada con la activación de microglía y astrocitos. Esta

INTRODUCCIÓN

respuesta neuroinflamatoria desencadena neurodegeneración en el cerebelo, reduciendo el número de neuronas granulares y de Purkinje (Balzano *et al.*, 2018).

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

2. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA CRÓNICA EN MODELOS ANIMALES

Para poder avanzar en el estudio de los mecanismos que causan la EH y diseñar y ensayar posibles tratamientos terapéuticos es necesario utilizar modelos animales de EH. Los modelos animales de EH no sólo presentan hiperamonemia y neuroinflamación, sino que también reproducen muchas de las alteraciones cognitivas y motoras encontradas en pacientes.

2.1. Modelo de EH por anastomosis porta-cava (PCS, *Porta-Caval Shunt*)

Este tipo de cirugía se ha utilizado en ratas, conejos, perros y cerdos. La cirugía consiste en seccionar la vena porta, principal aporte sanguíneo al hígado y ensamblarla con la vena cava. De esta forma, la sangre que proviene del intestino no circula a través del hígado y la metabolización de sustancias tóxicas por el mismo se reduce notablemente. Entre estas sustancias se encuentra el amonio, cuyos niveles aumentan tras la anastomosis porta-cava, produciendo hiperamonemia.

Además de la hiperamonemia, las ratas PCS presentan alteraciones metabólicas en el cerebro, como el aumento de amonio y la disminución de la utilización de glucosa. También presentan alteraciones en ritmos circadianos (Bengtsson *et al.*, 1986; Steindl *et al.*, 1996) y en el sueño (Hernandez-Viadel *et al.*, 2003), alteraciones motoras como hipoquinesia (Rodrigo *et al.*, 2007) e incoordinación motora (Dadsetan *et al.*, 2016b; Agustí *et al.*, 2017) y alteraciones cognitivas como disminución de la memoria y la capacidad de aprendizaje (Elizondo *et al.*, 2007; Rodrigo y Felipe, 2007; Rougier *et al.*, 2007; Méndez *et al.*, 2008a; Hernández-Rabaza *et al.*, 2015; Dadsetan *et al.*, 2016a). Cauli *et al.*, (2007) mostraron que las ratas PCS también presentan neuroinflamación, con un aumento en los niveles de marcadores inflamatorios como la IL-6 o actividad de COX en el cerebro. Las ratas PCS presentan una capacidad reducida para aprender una tarea en un laberinto en Y debido a la alteración de la función de la vía glutamato-óxido nítrico (NO)-cGMP en cerebelo (Erceg *et al.*, 2005b). Cauli *et al.* (2007) demostraron también que el tratamiento crónico con ibuprofeno, un antiinflamatorio, reducía la neuroinflamación y restauraba la capacidad de aprender la tarea del laberinto en Y restaurando la función de la vía del glutamato-NO-GMPc en cerebelo in vivo. Estos resultados mostraron por primera vez que la neuroinflamación es un contribuyente esencial al deterioro cognitivo en EHM. Estudios más recientes han demostrado que, en las ratas PCS, se pueden contrarrestar las alteraciones en el

aprendizaje y la memoria espacial también mediante tratamientos que revierten la neuroinflamación (Hernández-Rabaza *et al.*, 2015) o la inflamación periférica (Dadsetan *et al.*, 2016).

2.2. Modelo de EH por Ligadura Biliar (BDL, *Bile duct-ligation*)

Este otro modelo quirúrgico de fallo hepático consiste en obstruir el conducto biliar mediante una o varias ligaduras, impidiendo totalmente el flujo de bilis al intestino. Las ratas BDL presentan las siguientes alteraciones: hiperamonemia (Rodrigo *et al.*, 2005), ictericia e hipertensión portal (Kountouras *et al.*, 1984), fibrosis que progresa a cirrosis, translocación bacteriana y disfunción del sistema inmune (Roughneen *et al.*, 1986; Greve *et al.*, 1990; Aronson *et al.*, 1993; Jover *et al.*, 2006). También presentan alteraciones cognitivas y motoras (De Flora *et al.*, 1996; Marchi y Raiteri, 1996).

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

Como ya se ha explicado anteriormente, la hiperamonemia es uno de los factores más importantes que contribuyen al deterioro cognitivo y a las alteraciones motoras en EH crónica. Para discernir que alteraciones son debidas a la hiperamonemia nuestro grupo desarrolló un modelo de hiperamonemia crónica “pura”, sin fallo hepático.

2.3. Modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático.

Este modelo se desarrolló a finales de los años 80 en nuestro laboratorio (Felipo *et al.*, 1988b; Azorín *et al.*, 1989). Consiste en administrar a las ratas una dieta que contiene acetato amónico (25% p/p), lo cual produce un estado de hiperamonemia crónica moderada en la que los niveles de amonio en sangre son aproximadamente el doble que en las ratas control.

El modelo de hiperamonemia sin fallo hepático reproduce muchas de las alteraciones presentes en la encefalopatía hepática y permite discernir qué alteraciones cerebrales y neurológicas son debidas a la hiperamonemia y cuales son debidas a otros factores asociados al fallo hepático. Este modelo es sencillo y permite mantener hiperamonemia sostenida durante largos periodos de tiempo sin alterar la función hepática. Ha permitido la realización

INTRODUCCIÓN

de estudios a largo plazo sobre la regulación del ciclo de la urea (Felipo *et al.*, 1988a; Grau *et al.*, 1992), alteración de los niveles de tubulina en cerebro (Felipo *et al.*, 1988b; Miñana *et al.*, 1988a; 1988b) y de los niveles de ATP y otros metabolitos en hígado y cerebro (Kosenko *et al.*, 1994).

Este modelo se ha empleado para estudiar el efecto de la hiperamonemia crónica sobre la función cognitiva (Aguilar *et al.*, 2000; Rodrigo *et al.*, 2010; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016aa y 2016b) y motora (Rodrigo *et al.*, 2010; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016b). También se ha utilizado para investigar los mecanismos responsables de las alteraciones cognitivas y motoras, incluyendo la función de vías de transducción de señales en cerebro in vivo (Hermenegildo *et al.*, 1998) y para evaluar la utilidad de distintos tratamientos terapéuticos para revertir el deterioro cognitivo y motor (De Flora *et al.*, 1996; Erceg *et al.*, 2005a; 2005b).

Rodrigo *et al.* (2010) demostraron por primera vez que la hiperamonemia es capaz por si sola de inducir neuroinflamación, sin que sea necesaria la existencia de fallo hepático. Las ratas hiperamonémicas tratadas con fármacos que reducen la neuroinflamación recuperan su función motora (Rodrigo *et al.*, 2010; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a) y cognitiva (Rodrigo *et al.*, 2010; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a y 2016b).

3. MEMORIA Y APRENDIZAJE. PAPEL DEL LÓBULO TEMPORAL MEDIAL.

El aprendizaje es el proceso de adquisición de conocimientos, habilidades o actitudes a través de la experiencia o la educación, lo que origina un cambio persistente, cuantificable y específico en el comportamiento de un individuo. La memoria incluye todos los procesos que permiten el registro, codificación, consolidación, almacenamiento y recuperación de la información (Kandel, 2000). Aprendizaje y memoria son dos procesos relacionados que podrían definirse como dos pasos subsiguientes en la adquisición y elaboración de la información proporcionada por el medio ambiente a través de los sentidos. Aprendizaje implica siempre una forma de adquisición de información y, por lo tanto, una modificación del estado de la memoria del sujeto (Kandel, 2000).

En función de su duración, la memoria se divide en dos subtipos: (i) memoria a corto plazo (STM, *short-term memory*) y (ii) memoria a largo plazo (LTM, *long-term memory*). La STM tiene una capacidad limitada y dura sólo un corto período de tiempo. En contraste, la LTM puede almacenar grandes cantidades de información con una duración potencialmente ilimitada.

La memoria también se puede clasificar, en función de la naturaleza de su contenido, en memoria declarativa (explícita) y memoria no declarativa (implícita). La memoria implícita o no declarativa incluye la adquisición de habilidades motoras y hábitos y está mediada principalmente por el neocórtex y el cerebelo (Salmon y Butters, 1995).

La memoria declarativa incluye conocer lugares, cosas, personas, hechos y el significado de estos hechos. Se subdivide en memoria episódica, que incluye eventos experimentados personalmente y depende de la capacidad para recordar el contexto temporal y espacial en que se produjo, y memoria semántica, la cual incluye el conocimiento de estos hechos con independencia del contexto en el que se aprendieron (Tulving, 1972).

Existen varias hipótesis acerca de la estructura de la memoria y de su ordenación, aunque, en general, existe una organización básica admitida. Cualquier tipo de aprendizaje y memoria depende de una red neuronal específica, sin embargo, en el sistema nervioso los circuitos están interconectados (Kandel, 2000).

Si bien la memoria episódica es un proceso cognitivo propio del ser humano, ocurre de manera similar en primates y, en otras especies, existen procesos equivalentes. Es el caso de la memoria de reconocimiento y la navegación espacial, que son estudiados en roedores como sistemas de memoria equivalentes anatómicamente y funcionalmente a la memoria declarativa humana (Vann y Albasser, 2011).

3.1. Memoria de reconocimiento.

En neuropsicología humana, la memoria declarativa se estudia frecuentemente mediante pruebas de memoria de reconocimiento. Estos test consisten en determinar si un estímulo en particular (un objeto, una palabra, un sitio...) ha sido percibido con anterioridad. Puesto que este tipo de cuestionarios se responden con un sí o un no, están menos contaminados por factores ejecutivos que otros test que implican la elaboración de una respuesta verbal o no verbal más compleja (Huijgen y Samson, 2015). Este tipo de experimentos se han adaptado a animales y se aplican desde hace décadas.

Las ratas, como otros roedores, presentan una tendencia innata a la exploración, se sienten atraídas por la novedad, y en esta exploración espontánea de lo nuevo se basan los test de memoria de reconocimiento más empleados en la literatura. Los animales exploran con mayor intensidad un estímulo nuevo frente a otro que ya ha sido presentado previamente, dedicándole aproximadamente el doble de tiempo (Eichenbaum *et al*, 2007). Tradicionalmente, este tipo de memoria se ha relacionado anatómicamente con estructuras del lóbulo temporal medial (MTL: *medial temporal lobe*).

Sin duda la estructura más estudiada del MTL es el hipocampo. Frente a la complejidad del neocortex, está formado únicamente por tres capas. La capa superior y la inferior contienen sustancia blanca formada sobre todo interneuronas y fibras nerviosas, mientras que es en la capa intermedia donde se encuentran las neuronas principales. En el asta de Amón (CA, *cornu*

INTRODUCCIÓN

ammonis) estas neuronas son piramidales, y forman las subregiones CA3, CA2 y CA1. En el giro dentado, en cambio, aparecen neuronas granulares (Van Strien *et al.*, 2009).

Rodeando al hipocampo se encuentran zonas de corteza cerebral estrechamente vinculadas con él que también forman parte del MTL, es la denominada región parahipocampal. Forman parte de esta región la corteza perirrinal (PER) y la corteza postrrinal (POR), equivalente a la corteza parahipocámpica en primates (Figura 3). Ambas envían información mediante proyecciones al hipocampo, pero, mientras que la POR envía información visual y visuo-espacial a través de la corteza entorrinal medial, la PER suministra información multimodal a través de la corteza entorrinal lateral (Van Strien *et al.*, 2009; Ramos, 2013).

Si bien la memoria de reconocimiento se ha relacionado desde hace décadas con el MTL, la contribución de sus distintas subregiones varía en función del tipo de estímulo presentado. Uno de los test de memoria de reconocimiento más sencillo y utilizado es el NOR (*Novel Object Recognition*), que consiste en distinguir un objeto nuevo de otro que ya es familiar para el animal. En cambio, en una variante de este test, lo que se evalúa es la capacidad del animal para distinguir un cambio en el contexto espacial en el que se sitúa un objeto conocido, es el llamado NOL (*Novel Object Location*) (ver procedimiento en el apartado 3.2 de Materiales y Métodos, página 56).

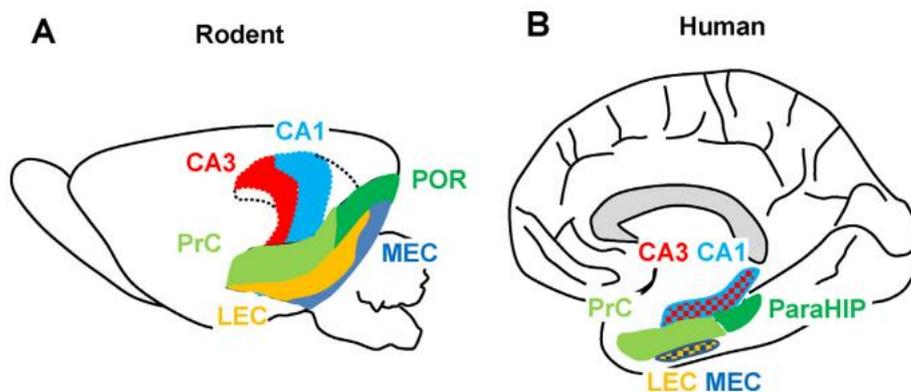


Figura 3. Anatomía del lóbulo temporal de roedores (A) y humanos (B). Se representan las regiones CA1 y CA3 del asta de Amón del hipocampo, la corteza perirrinal (PrC) y la entorrinal medial (MEC) y lateral (LEC). La corteza postrrinal en roedores (POR) equivale a la parahipocampal en humanos (ParaHIP). *Figura extraída de Sauvage, M. M., Nakamura, N. H. & Beer, Z. Mapping memory function in the medial temporal lobe with the immediate-early gene Arc. Behav. Brain Res. 254, 22–33 (2013).*

El hipocampo está implicado tanto en el NOR como en el NOL, si bien no con la misma intensidad. Cualquier lesión hipocámpal, por leve que sea, afecta de manera significativa y contundente a la ejecución del NOL (Mumby *et al.*, 2002; Barker y Warburton, 2011) mientras que su implicación en el NOR no está tan clara. Algunos estudios indican que el hipocampo no

INTRODUCCIÓN

interviene en la discriminación no espacial de objetos (Winters *et al.*, 2004; Barker y Warburton, 2011) y otros afirman que su implicación depende del grado de lesión (Broadbent *et al.*, 2004) o el tiempo de retención (Hammond *et al.*, 2004).

En cuanto al papel que juegan las áreas corticales del MTL en la memoria de reconocimiento, hay una disociación bastante clara entre PER y POR. La PER está implicada en el reconocimiento de objetos, esto es, el test NOR, tal y como han demostrado numerosos estudios (Mumby *et al.*, 2002; Winters *et al.*, 2004; Barker y Warburton, 2011). Por el contrario, la POR está implicada en el procesamiento de la memoria de reconocimiento con componente espacial esto es, el test NOL (Norman y Eacott, 2005).

Existe un modelo mayoritariamente aceptado para explicar la organización funcional del MTL respecto a la memoria de reconocimiento, apoyado además por las conexiones anatómicas entre las diferentes subregiones (Van Strien *et al.*, 2009). Según este modelo, la PER aporta información acerca de las características de los objetos, mientras que su contexto espacial es procesado a través de la POR. En el hipocampo confluyen ambas informaciones y allí se integran para formar la memoria de los objetos en su contexto espacial (Eichenbaum *et al.*, 2007) (Figura 4). Sin embargo, también hay autores críticos con este modelo, (como Sauvage *et al.*, 2013) que proponen la implicación de todas las subregiones en ambos tipos de información, espacial y no espacial.

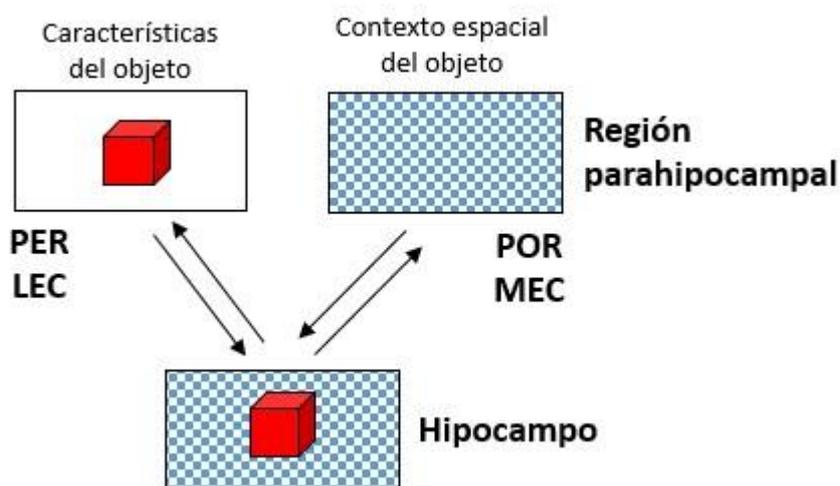


Figura 4. Modelo de procesamiento bimodal de la información en el lóbulo temporal medial. En el hipocampo confluyen la información sobre las características de los objetos y la relativa a su contexto espacial, pero ambas proceden de áreas diferentes de corteza de la región parahipocampal. La información sobre las características de los objetos proviene de la corteza perirrinal (PER), que la envía a través de la corteza entorrinal lateral (LEC), mientras que la información relativa al contexto espacial de los objetos procede de la corteza postririnal (POR) y pasa por la corteza entorrinal medial (MEC).

INTRODUCCIÓN

3.2. Memoria y aprendizaje espacial.

La capacidad para aprender recorridos y recordar lugares familiares es fundamental para la supervivencia en la mayoría de las especies animales, y así ha sido conservada a lo largo de la cadena evolutiva. Se incluyen dentro del aprendizaje espacial dos tipos de estrategias: la navegación egocéntrica, que emplea el movimiento y el cuerpo del propio individuo como puntos de referencia, y la navegación allocéntrica, que por el contrario se basa en referencias externas (Vorhees y Williams, 2014). Anatómicamente, la navegación egocéntrica depende sobre todo del estriado dorsal y áreas relacionadas, y en humanos coincide con ciertos tipos de memoria implícita. Por otra parte, la navegación allocéntrica implica sobre todo al hipocampo y las áreas corticales del MTL, regiones que en humanos también están implicadas en la memoria declarativa y semántica. En adelante se hará referencia siempre a este segundo tipo de aprendizaje espacial.

Existen diferentes tipos de test que permiten evaluar la capacidad de aprendizaje y la memoria espacial en roedores, uno de ellos es el laberinto radial de 8 brazos. La ejecución de la tarea requiere memoria espacial y es sensible, entre otros factores, al daño en el hipocampo y la POR. El animal, en sucesivos ensayos, debe explorar el ambiente que le rodea y aprender en qué brazos del laberinto está localizada la comida (ver procedimiento en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos, página 54). Se evalúan, en este caso, los errores de referencia espacial (cuántas veces entra en un brazo sin comida).

Hoy en día la posibilidad de adjudicar un proceso cognitivo complejo a la actividad de una única región cerebral ha sido mayoritariamente descartada, pues la enorme conectividad descubierta en el cerebro desaconseja este tipo de aproximaciones reduccionistas. No obstante, sí que se ha ido demostrando el papel imprescindible de determinadas áreas cerebrales en procesos cerebrales concretos. Y un ejemplo paradigmático es, sin duda, el papel que juega el hipocampo en procesos de memoria en general y de navegación espacial (memoria espacial allocéntrica) en particular.

Desde que fuera descubierto su papel crítico en la memoria (Scoville y Milner, 1957) numerosos estudios han profundizado en su funcionamiento hasta descubrir que en el hipocampo existen neuronas que responden cuando el animal se encuentra en un determinado lugar y no en otro (células de lugar) (O'keefe y Dostrovsky, 1971) y, finalmente, constituir la firme teoría de que en el hipocampo se forma un mapa cognitivo del entorno espacial externo destinado a codificar información relacionada con el mismo (O'Keefe y Nadel, 1978). Las lesiones en el hipocampo, accidentales en humanos (Burgess *et al.*, 2002) y experimentales en roedores (Morris *et al.*, 1982) han corroborado su papel fundamental en el aprendizaje y la memoria espacial.

Además del hipocampo, en 2000, Vann y colaboradores demostraron, mediante el análisis de genes de activación temprana en ratas, que las neuronas de la POR presentan actividad ante una tarea de aprendizaje espacial, mientras que dicha activación no se produce en la PER. En 2013, Ramos y colaboradores apoyaron estas observaciones al demostrar que la lesión de la POR disminuye la capacidad de aprendizaje espacial en ratas, mientras que la lesión de la PER la mantiene intacta.

Hay indicios, por tanto, de que la contribución de las aferencias que llegan a hipocampo desde la POR es más importante para el aprendizaje espacial que las que provienen de la PER. Y esto es un nexo de unión con la hipótesis bimodal de la memoria de reconocimiento, descrita en el apartado anterior, lo cual sugiere que la conexión entre POR e hipocampo procesa información espacial en general, con independencia del tipo de aprendizaje o memoria implicado (Vann *et al.*, 2011).

3.3. Memoria de trabajo espacial.

La memoria de trabajo puede definirse como un almacén a corto plazo para aquella información importante para la ejecución de una determinada tarea. Es, por tanto, equivalente a “memoria a corto plazo” en la mayoría de los casos (Baddeley, 2003). Sin embargo, aunque como concepto es útil, en realidad agrupa una serie de procesos cognitivos que pueden diferir bastante en función del tipo de información almacenada. Por ejemplo, la memoria de trabajo que regula respuestas motoras simples difiere bastante de la que se encarga de recordar olores y sabores o de la memoria de trabajo que almacena información visual sobre objetos o localizaciones espaciales (Kesner y Churchwell, 2011).

En lo que respecta a esta tesis, nos referiremos siempre a este último subtipo, la memoria de trabajo espacial. De los múltiples procedimientos existentes para analizarla en roedores, el laberinto radial es uno de ellos. Además de medir la memoria y el aprendizaje espacial (denominada también memoria de referencia espacial), este laberinto permite estudiar la memoria de trabajo espacial, contabilizando como errores las entradas del animal en un brazo del laberinto en el que ya ha entrado antes dentro de un mismo intento (ver procedimiento en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos, página 54) (Vorhees y Williams, 2014).

En cuanto al sustrato anatómico de la memoria de trabajo espacial, estudios en humanos, primates y roedores demostraron, en un primer momento, la implicación de la corteza prefrontal (PFC) (Fuster, 1997; Stuss y Alexander, 2000; Schoenbaum *et al.*, 2003). Sin embargo, hoy es mayoritariamente aceptada la hipótesis de que la interacción entre hipocampo y PFC es fundamental para este tipo subtipo de memoria de trabajo.

INTRODUCCIÓN

Durante la ejecución de tareas de memoria de trabajo espacial se produce una sincronización de la actividad de hipocampo y PFC (Siapas *et al.*, 2005; Hyman *et al.*, 2010). Y la desconexión experimental mediante lesión de las fibras que conectan ambas regiones producen alteraciones en dichas tareas (Churchwell y Kesner, 2011). En un estudio más reciente, Yoon *et al.* (2015) demostraron que la interacción entre hipocampo y PFC es imprescindible para la correcta ejecución de tareas de memoria de trabajo espacial y, por separado, ninguna de las dos regiones son suficientes hacerlo.

Dentro de la PFC de roedores existen diferentes subdivisiones anatómicas y funcionales. Así, mientras que la PFC lateral se relaciona con memoria de trabajo relacionada con olores/sabores y la PFC medial dorsal con respuestas motoras simples, es la PFC medial ventral la que ha sido implicada mayoritariamente en memoria de trabajo espacial (Kesner y Churchwell, 2011). Dentro de esta subregión, a su vez, se incluyen las cortezas prelímbica, infralímbica y orbital medial (Dalley *et al.*, 2004).

4. MECANISMOS MOLECULARES DE LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE

La memoria implica una retención de información cuya codificación, almacenamiento y recuperación depende de la coordinación de millones de neuronas y sinapsis a lo largo del todo el cerebro. La plasticidad sináptica, es decir, los cambios en la forma en que estas neuronas interaccionan entre sí, es un proceso fundamental destinado a generar nuevos recuerdos reforzando y/o debilitando determinadas sinapsis o circuitos. Así, por ejemplo, la potenciación y la depresión a largo plazo (LTP y LTD respectivamente) son mecanismos de plasticidad sináptica que permiten aumentar o disminuir un potencial post-sináptico de manera sostenida en el tiempo (Amtul y Rahman, 2015). Son dos de los mecanismos de plasticidad sináptica más conocidos y estudiados y profundizaré en ellos más adelante.

La inmensa mayoría de las neuronas del sistema nervioso central de los mamíferos se comunican mediante sinapsis químicas, es decir, generando potenciales de acción como consecuencia de los neurotransmisores recibidos de la neurona pre-sináptica y liberando neurotransmisores a su vez cuando el cambio de potencial eléctrico llega al terminal axónico (Purves *et al.*, 2014). A partir de ahora me referiré siempre a este tipo de sinapsis.

Según el efecto que tengan sobre la neurona post-sináptica, las sinapsis se clasifican en excitatorias e inhibitorias. El principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central es el glutamato, y las sinapsis glutamatérgicas constituyen probablemente el sistema de comunicación principal en cuanto a procesos relacionados con la función cognitiva. El contrapunto a este tipo de sinapsis son las sinapsis inhibitorias GABAérgicas, en las que el neurotransmisor es el ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Amtul y Rahman, 2015). Para que

estas sinapsis funcionen, en la membrana de la neurona post-sináptica deben estar presentes, en cantidad y funcionalidad adecuada, los receptores correspondientes, es decir, complejos proteicos capaces de activar vías de transducción de señales que acabarán modificando el potencial de membrana de la neurona post-sináptica ante la llegada, en este caso, de glutamato o GABA. En los procesos de plasticidad sináptica que abordaré, son especialmente importantes los receptores ionotrópicos, sobre todo los de glutamato, pero también los de GABA. Se trata de receptores de acción rápida (del orden de unos pocos milisegundos) porque son a la vez canales iónicos, es decir, ante la unión del neurotransmisor correspondiente permiten la entrada y salida de iones en la neurona post-sináptica, lo cual desencadenará la excitación o inhibición correspondiente (Purves *et al.*, 2014).

4.1. Receptores ionotrópicos de glutamato

A nivel molecular, estos receptores son proteínas transmembrana compuestas por cuatro subunidades que se disponen formando un canal iónico en medio. Aunque hoy en día se reconocen al menos cuatro subfamilias: AMPA, NMDA, kainato y δ , las más abundantes y relevantes en el tema que nos ocupa son las dos primeras. Reciben este nombre por sus dos agonistas exógenos: el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) y el N-metil-D-aspartato (NMDA). Normalmente en las sinapsis glutamatérgicas están presentes ambos tipos de receptores (Traynelis *et al.*, 2010; Purves *et al.*, 2014).

Los cationes que entran a través de estos receptores generan una despolarización en la neurona post-sináptica que, al incrementar el potencial de membrana acercándolo o sobrepasando el umbral, favorecen la formación de un potencial de acción (Purves *et al.*, 2014).

4.1.1. Receptores AMPA.

A los receptores AMPA se les atribuye la mayor parte la neurotransmisión excitatoria rápida en el sistema nervioso central. Están formados por cuatro subunidades (GluA1-4) que se combinan para formar homo o heterotetrámeros que permiten la entrada de sodio en la neurona post-sináptica ante la unión del glutamato, así como la salida de potasio. Es cierto, no obstante, que la subunidad GluA2 está presente en la inmensa mayoría de los receptores AMPA del cerebro ya que, al parecer, es importante para la inserción de éstos en las sinapsis (Palmer *et al.*, 2005). Además, es la presencia de GluA2 lo que hace que los receptores AMPA sean impermeables al calcio (Ca^{2+}), por lo que la mayoría lo son. Esta impermeabilidad al calcio es fundamental para mantener

INTRODUCCIÓN

una concentración basal baja de este ion en el citoplasma (Cull-Candy *et al.*, 2006; Hanley *et al.*, 2014).

Existen, no obstante, pequeñas subpoblaciones de receptores AMPA sin GluA2 y, por tanto, permeables al calcio, que desempeñan funciones muy concretas relacionadas con la señalización por calcio como segundo mensajero. Por ejemplo, los receptores AMPA permeables al calcio son necesarios para desencadenar inicialmente la LTP en hipocampo, pero no para mantenerla. Sin embargo, la entrada de demasiado calcio como consecuencia de la desregulación en la limitación espacial y temporal de la expresión de receptores AMPA sin GluA2 conlleva importantes problemas de disfunción sináptica y excitotoxicidad que se relacionan con diferentes patologías (Cull-Candy *et al.*, 2006; Hanley *et al.*, 2014).

4.1.2. Receptores NMDA.

Los receptores NMDA tienen hasta 7 subunidades diferentes (GluN1, GluN2A-D, GluN3A-B) que se combinan en heterotetrámeros. Para que éstos funcionen correctamente, tienen que estar formados por un homodímero GluN1 junto a otro homodímero GluN2 o un heterodímero GluN2-GluN3. Esta estequiometría es fundamental porque, para activarse, los receptores NMDA requieren de la unión de glutamato, cuyo sitio de unión está en las subunidades GluN2, pero también de glicina como coagonista, que se une a las subunidades GluN1 y GluN3 (Traynelis *et al.*, 2010). Además, la presencia de uno u otro subtipo de las subunidades GluN2 y GluN3, que cambian a lo largo del desarrollo y también en función del área cerebral, determina las propiedades del receptor NMDA y en muchos casos su papel en procesos de plasticidad sináptica (Cull-Candy *et al.*, 2001). Por ejemplo, mientras que la subunidad GluN2A se considera imprescindible en hipocampo para la LTP, la subunidad GluN2B se ha relacionado más con LTD (Fan *et al.*, 2014), más adelante explicaré porqué.

Una diferencia importante con los receptores AMPA, es que los NMDA tienen una alta permeabilidad para el calcio, además de para el sodio. Y esto es lo que los hace imprescindibles para procesos de plasticidad sináptica como la LTP o la LTD. El calcio que entra a través de los receptores NMDA actúa como segundo mensajero activando vías de señalización responsables de la potenciación o depresión a largo plazo de las sinapsis, como detallaré más adelante. En este sentido es clave el hecho de que los receptores NMDA se encuentran en la membrana formando parte de complejos multiproteicos de la densidad post-sináptica (de hasta más de 70 proteínas). Muchas de estas proteínas son sensibles al calcio y son la primera diana del que entra a través

de los receptores NMDA, actuando como quinasas o fosfatasa de otras proteínas (Fan *et al.*, 2014).

Otra propiedad importante de los receptores NMDA es su activación dependiente de voltaje. Además de la unión simultánea de glutamato y glicina, los receptores NMDA requieren cierto grado de despolarización en la membrana para su apertura, ya que en condiciones de reposo el canal iónico está bloqueado por el magnesio extracelular y sólo se desbloquea cuando la neurona se despolariza. Esto garantiza que los niveles citoplasmáticos de calcio no estén elevados de forma basal, lo cual es perjudicial como ya he comentado. Además, su cinética de cierre y apertura es más lenta que la de los AMPA (Cull-Candy *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2014).

4.2. Receptores GABA_A.

La mayoría de las sinapsis inhibitorias del cerebro emplean el GABA como neurotransmisor, y se estima que alrededor de un tercio del total de neuronas del sistema nervioso central son GABAérgicas. La mayoría son interneuronas y, por tanto, modulan la excitabilidad de circuitos locales dentro de una determinada región cerebral (Vithlani *et al.*, 2011).

Se han descrito tres tipos de receptores de GABA: A, B y C. Los receptores GABA_A y GABA_C son ionotrópicos y los GABA_B metabotrópicos, es decir, no son canales iónicos en sí mismos, sino que están acoplados a vías de señalización intracelular que finalmente provocan la apertura de canales en la membrana (Vithlani *et al.*, 2011). Los receptores GABA_B generan respuestas inhibitorias más lentas y prolongadas, pero la mayoría de las sinapsis inhibitorias del cerebro de mamíferos están mediadas por el receptor GABA_A, quedando el receptor GABA_C restringido a determinadas neuronas GABAérgicas de la retina (Bormann, 2000; Luscher *et al.*, 2011).

Los receptores GABA_A se expresan ubicuamente a lo largo del eje neural e intervienen prácticamente en todas las funciones cerebrales, incluida la plasticidad sináptica, hasta el punto de que alteraciones en su funcionamiento o expresión están detrás de patologías como la epilepsia, la ansiedad, la depresión o la esquizofrenia (Luscher *et al.*, 2011). De igual modo, su larga lista de agonistas moduladores los convierte en diana terapéutica para un gran número de fármacos, como anticonvulsivos, ansiolíticos, sedantes hipnóticos y anestésicos (Vithlani *et al.*, 2011). A nivel experimental se ha visto en ratones transgénicos que la disminución del número de receptores GABA_A post-sinápticos, aunque sea moderada, afecta de forma importante a su comportamiento (Luscher *et al.*, 2011).

A nivel estructural, el receptor GABA_A es una proteína transmembrana pentamérica formado por la combinación de cinco subunidades de una larga lista de 19 (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , μ , ρ 1-3). De todas las combinaciones posibles, al menos 11 tipos de receptor GABA_A estructural y,

INTRODUCCIÓN

por tanto, funcionalmente diferentes han sido identificados, si bien circunscritas en ocasiones a zonas muy concretas del cerebro. Sin embargo, a nivel sináptico, casi todas las combinaciones son del tipo 2α (1-3) + 2β (1-3) + γ (1-3), lo cual dota a los receptores GABA_A sinápticos de una afinidad por el GABA lo suficientemente baja como para garantizar su activación sólo ante concentraciones relativamente altas de GABA en la hendidura sináptica (Luscher *et al.*, 2011). Las combinaciones más frecuentes son, por este orden $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ y $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ (Vithlani *et al.*, 2011), siendo $\alpha 1$ la subunidad más abundante en neocórtex e hipocampo (Pirker *et al.*, 2000), dos áreas cerebrales cuya importancia en esta tesis ya ha sido justificada.

Las diferencias en la combinación de subunidades entre los receptores sinápticos y extrasinápticos dan lugar a propiedades diferentes. La inhibición mediada por los receptores GABA_A sinápticos es más rápida (fásica) que la que está mediada por los extrasinápticos (tónica), siendo en realidad estos últimos mayoritarios. Además, la presencia de determinadas subunidades en los receptores cambia propiedades de modulación, por ejemplo, haciéndolos insensibles a las benzodiazepinas si aparecen $\alpha 4$ o $\alpha 6$ (Luscher *et al.*, 2011; Vithlani *et al.*, 2011).

El canal formado por las cinco subunidades de los receptores GABA_A es permeable al ion cloruro, un anión que en condiciones normales está más concentrado en el medio extracelular que dentro de las neuronas. Como consecuencia de ello, cuando el GABA activa los receptores de GABA_A, entra cloruro en la neurona post-sináptica generando una hiperpolarización, es decir, disminuyendo el potencial de membrana por debajo del umbral e impidiendo la consecución de la despolarización necesaria para generar un potencial de acción (Purves *et al.*, 2014).

El sentido del flujo de cloruro, no obstante, depende del gradiente que se establezca entre el medio intra y extracelular, y no siempre se sitúa a favor de la entrada de cloruro en la neurona. De hecho, durante el desarrollo del sistema nervioso, el cloruro está más concentrado en el medio intracelular que en el extracelular y, como consecuencia de ello la activación de los receptores GABA_A implica la salida de cloruro y la despolarización de la neurona post-sináptica, por lo que el GABA se considera un neurotransmisor excitador durante esa etapa (Deidda *et al.*, 2014). En condiciones fisiológicas normales, este cambio que tiene lugar en el gradiente de cloro es un fenómeno fundamental para la correcta consecución de la madurez funcional y estructural de las neuronas (Luscher *et al.*, 2011).

4.3. Mecanismos de plasticidad sináptica.

Hoy en día se acepta que la plasticidad sináptica es el conjunto de mecanismos que constituyen las bases moleculares y celulares subyacentes a la memoria y el aprendizaje. Conceptualmente se refiere a que cada experiencia que vivimos, relacionada con pensamientos, sentimientos, sensaciones o incluso movimientos de nuestro cuerpo, tiene su origen en la activación simultánea de una determinada red de neuronas. Y, cada vez que dicha experiencia se repite, la red neuronal se refuerza, consolidándose en el tiempo (Amtul y Rahman, 2015).

A nivel celular, como ya he comentado, las sinapsis glutamatérgicas son fundamentales para la plasticidad sináptica responsable de procesos de memoria y aprendizaje. Tanto los receptores AMPA como los NMDA intervienen en el proceso, pero lo hacen de forma muy distinta.

Los receptores AMPA post-sinápticos son las “hormigas obreras” de las sinapsis glutamatérgicas, desde que reciben el glutamato se abren durante unos pocos milisegundos para permitir la entrada de sodio en la neurona post-sináptica (Lüscher y Malenka, 2015). Si el potencial excitador post-sináptico (EPSP) generado es suficiente para traspasar el umbral, se inducirá un potencial de acción que acabará por transmitir el impulso eléctrico a la siguiente neurona.

El funcionamiento de los receptores NMDA es más complejo, ya que actúan como un detector de coincidencias. Para que se activen los receptores NMDA, tienen que ocurrir simultáneamente dos procesos en la misma sinapsis: la liberación de glutamato por parte de la neurona pre-sináptica y una despolarización tal de la post-sináptica que permita liberar el magnesio que bloquea el canal de los receptores NMDA en reposo. Dicha despolarización ocurre mayoritariamente por la acción de los receptores AMPA, de manera que, si el glutamato liberado por la neurona pre-sináptica es suficiente para que la acción individual de los receptores AMPA despolarice la neurona post-sináptica hasta el punto de disociar el magnesio de los receptores NMDA, entonces éstos podrán ser activados por el glutamato que reciban. Por esta razón, los receptores NMDA se abren mucho después de los AMPA, pero, cuando lo hacen, también tardan más en cerrarse, permaneciendo abiertos durante varios cientos de milisegundos (Purves *et al.*, 2014; Lüscher y Malenka, 2015). Además, junto con el sodio, a través de los receptores NMDA entra una cantidad importante de calcio capaz de actuar como segundo mensajero que será fundamental en el proceso de plasticidad sináptica (ver apartado 4.3.2).

En los siguientes apartados abordaremos dos mecanismos concretos de plasticidad sináptica que ya se han nombrado superficialmente en apartados anteriores: la LTP y la LTD. Consisten,

INTRODUCCIÓN

respectivamente, en el aumento o la disminución sostenida en el tiempo de la intensidad de la respuesta post-sináptica en una sinapsis o un grupo de ellas.

4.3.1. Plasticidad sináptica en el hipocampo.

Antes de profundizar en los mecanismos concretos implicados en la LTP y la LTD y sus bases moleculares, conviene aclarar que, por un lado, no son ni mucho menos los únicos procesos de plasticidad sináptica que se dan en el cerebro de mamíferos; y, por otro que, si bien tienen lugar en diversas áreas cerebrales, han sido mayoritariamente estudiados en el hipocampo y, dada la importancia de esta área en la tesis que presento, también aquí se hará referencia siempre a plasticidad hipocampal. De hecho, ya en 1989, Morris demostró la importancia de la LTP hipocampal en el aprendizaje espacial.

La estructura del hipocampo permite una aproximación experimental que consiste en obtener de él rodajas vivas que pueden mantenerse en condiciones fisiológicas durante horas y en la cuales permanecen intactos gran parte de sus circuitos. En estas preparaciones, los axones de la vía perforante (más o menos preservados según el corte) alcanzan sobre todo las neuronas granulares del giro dentado. Estas neuronas emiten a su vez sus axones hacia las piramidales de CA3, formando las llamadas fibras musgosas. Y las neuronas piramidales de CA3 proyectan sus axones en las colaterales de Schaffer sobre las piramidales de CA1 (Purves *et al.*, 2014). Aunque también se estudia la conexión entre la vía perforante y el giro dentado, la mayoría de trabajos sobre plasticidad hipocampal analiza la potenciación de las sinapsis que se establecen entre los axones de las neuronas de CA3 y las dendritas de las neuronas de CA1 en el *stratum radiatum*, una estrecha capa de sustancia blanca situada bajo CA1. Para ello lo más habitual es colocar un electrodo de estimulación en la colateral de Schaffer y otro de registro en el *stratum radiatum*. Para analizar la respuesta de CA1 en su conjunto a la estimulación de CA3, en electrofisiología se pueden registrar potenciales de campo, es decir, actividad eléctrica de poblaciones, en lugar de hacer registros unitarios de neuronas individuales (Mosser *et al.*, 1995). Para ello, además de usar un electrodo de registro de mayor calibre, simplemente hay que tener en cuenta que la respuesta observada no reflejará los cambios iónicos que tienen lugar dentro de las neuronas, sino los que ocurren en el medio extracelular, y por tanto son justo los opuestos. De manera que, un EPSP, que implica la despolarización de las neuronas, al ser registrado extracelularmente (fEPSP) se reflejará como una disminución en el potencial eléctrico extracelular. A nivel molecular esto se explica porque los cationes que entran en las neuronas para generar el EPSP son cargas positivas que incrementan el potencial

intracelular, pero se pierden del medio extracelular y, por tanto, disminuyen el potencial extracelular.

Si las colaterales de Schaffer se estimulan eléctricamente a una frecuencia baja (1 o 2 veces por minuto), el tamaño de los fEPSP evocados permanece constante. Para inducir experimentalmente la LTP en este sistema se suelen emplear protocolos de estimulación de alta frecuencia (una o varias ráfagas de pulsos a 50-100 Hz durante un segundo). En contra de lo que expuse en el apartado anterior, en este caso no es necesario despolarizar previamente las neuronas post-sinápticas porque la estimulación de alta frecuencia genera tal sumación temporal de EPSP en las neuronas post-sinápticas que es suficiente para desbloquear el magnesio de los receptores NMDA. Por otro lado, si estimulamos con un protocolo de baja frecuencia (1-3 Hz durante 5-15min) conseguimos una modesta pero continua entrada de calcio a través de los receptores NMDA que dará lugar a la LTD (Lüscher y Malenka, 2015).

4.3.2. LTP (potenciación a largo plazo).

A nivel molecular, la forma más frecuente de LTP se produce cuando la neurona pre-sináptica libera suficiente glutamato para que se activen los receptores NMDA. Cuando esto ocurre, el calcio que entra en la neurona post-sináptica activa una serie de cascadas de señalización intracelulares que finalmente aumentarán la fuerza de la sinapsis. Es importante destacar que este aumento en la eficacia sináptica no tiene lugar porque aumente la cantidad de glutamato liberado por la neurona pre-sináptica, como cabría pensar, sino porque la post-sináptica se vuelve, de forma sostenida en el tiempo, más sensible al glutamato que recibe (Lüscher y Malenka, 2015).

Este aumento en la sensibilidad es posible porque el paso final de las vías de señalización implicadas en este proceso de potenciación es la inserción de nuevos receptores AMPA en la membrana post-sináptica. De esta forma se consigue que, ante la posterior llegada de glutamato, haya un mayor número de receptores AMPA dispuestos para despolarizar la neurona post-sináptica, con lo cual dicha despolarización será mayor: la sinapsis habrá sido potenciada (Lüscher y Malenka, 2015).

Si bien los mecanismos por los cuales se produce este aumento en la expresión en membrana de los receptores AMPA no han sido del todo esclarecidos, está demostrado el papel relevante que juegan determinadas quinasas, esto es, enzimas capaces de modificar post-traduccionalmente a otras proteínas añadiéndoles un grupo fosfato a algunos de sus residuos, es decir, fosforilándolas. En concreto, el calcio que entra a través de los receptores NMDA durante la LTP tiene como efectoras necesarias, al

INTRODUCCIÓN

menos, a tres quinasas: la proteín-quinasa II dependiente de calcio-cadmodulina (CAMKII), la proteína-quinasa A (PKA) y la proteín-quinasa C (PKC) (Amtul y Rahman, 2015).

La CAMKII aparece habitualmente asociada a proteínas de la densidad post-sináptica. De hecho, es una de las que forman parte de los complejos multiproteicos a los que se anclan los receptores NMDA. Esto permite que el calcio que entra a través del receptor, provoque su autofosforilación en el residuo Thr286, activándola de forma sostenida para fosforilar a otras proteínas, aun cuando la concentración de calcio vuelva a su nivel basal (Fan *et al.*, 2014). Además, una vez activada la CAMKII se une físicamente a la subunidad GluN2B del receptor NMDA, y dicha unión parece ser imprescindible para la LTP, aunque no se sabe muy bien porqué (Strack *et al.*, 2000). Puesto que la fosforilación del receptor NMDA por CAMKII no juega un papel relevante en la LTP, se piensa que la interacción GluN2B-CAMKII tiene más bien una función estructural, permitiendo situar físicamente a la CAMKII en la región de la sinapsis donde debe producirse la inserción de nuevos receptores AMPA (Fan *et al.*, 2014).

En cambio, la fosforilación de los receptores AMPA sí es fundamental para la LTP (Lee *et al.*, 2000, 2009). En este contexto, hay dos residuos de la subunidad GluA1 cuya fosforilación individual o combinada se ha demostrado fundamental para la consecución o la potenciación de la LTP: Ser831, por CAMKII y PKC, y Ser845, por PKA (Wang *et al.*, 2014).

La fosforilación por PKA de Ser845 en GluA1 aumenta la probabilidad de apertura del receptor AMPA y es fundamental para su inserción en la membrana durante la LTP (Esteban *et al.*, 2003), pero el caso de Ser831 no está tan claro. Algunos estudios indican que la fosforilación por CAMKII o PKC de este residuo, aunque contribuye a la LTP incrementando la conductancia del receptor, no sería imprescindible para el tráfico de GluA1 a la membrana (Lee *et al.*, 2006). Sin embargo, otros trabajos sí que indican que la fosforilación directa o indirecta de Ser831 por CAMKII aumenta la expresión en membrana de GluA1 (Qin *et al.*, 2005). Existen indicios de que podría tratarse de un proceso secuencial en el que ambas fosforilaciones son necesarias: primero la fosforilación por PKA de Ser845 actuaría como baliza señalando los receptores disponibles para su colocación en la membrana y luego la fosforilación por CAMKII de Ser831 y/o de otras proteínas asociadas provocaría su inserción en la membrana (Hayashi, 2000; Zhu, 2002; Esteban, 2003; Qin *et al.*, 2005) (Figura 5).

Otras proteínas importantes que actúan como sensores del calcio que entra a través de los receptores NMDA son Ras-GRF1 y Ras-GRF2 (*Ras-Guanine Nucleotide-Releasing*

Factor 1 y 2). Estas proteínas están asociadas, respectivamente, a las subunidades GluN2B y GluN2A del receptor NMDA, de manera que son de las primeras dianas en entrar en contacto con el calcio entrante. Lo curioso es que, una vez activadas por calcio, la vía de señalización que desencadenan una y otra es diferente. El calcio que entra a través de los receptores NMDA que contienen la subunidad GluN2A activa a Ras-GRF2, que a su vez moviliza a la GTPasa Ras y se sabe que esto contribuye a la LTP, presumiblemente a través de Erk (Li *et al.*, 2006) y PKA (Zhu, 2002; Qin, 2005), que como ya he comentado fosforilaría a GluA1 en la Ser845 favoreciendo su inserción en la membrana. Pero, por el contrario, cuando el receptor NMDA contiene GluN2B, el calcio activa preferencialmente a Ras-GRF1 y ésta a su vez a la GTPasa Rac que, a través de la MAP-quinasa p38, participa en la LTD (Li *et al.*, 2006). En el siguiente apartado profundizaré en la LTD y sus mecanismos subyacentes.

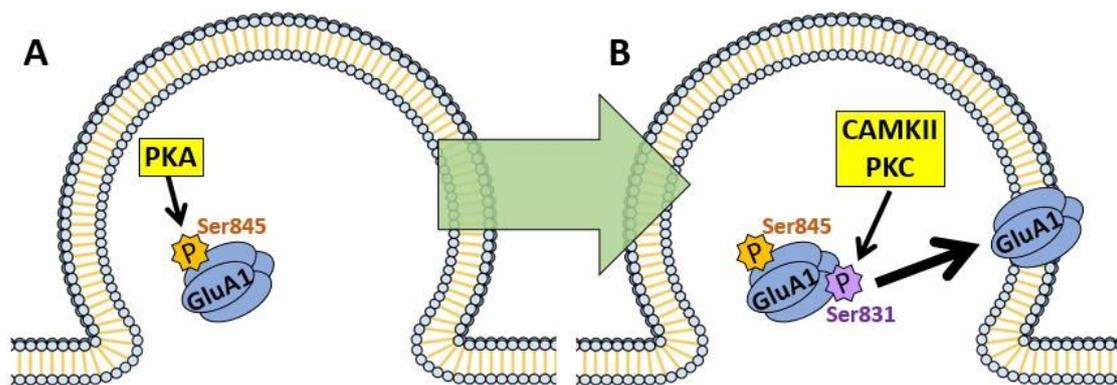


Figura 5. Modelo secuencial del tráfico de GluA1 a la membrana modulado por fosforilación. Según este modelo, tanto la fosforilación de la Ser845 por PKA como la de la Ser831 por CAMKII o PKC son necesarias para la inserción de la subunidad GluA1 de los receptores AMPA en la membrana. Sería un proceso secuencial por el cual, en primer lugar (A), la PKA fosforilaría la Ser845 señalando así los receptores disponibles para su inserción en membrana. A continuación, la fosforilación de la Ser831 por CAMKII o PKC (B) induciría su colocación en la membrana.

4.3.3. LTD (depresión a largo plazo).

Al contrario que la LTP, la LTD no requiere que la neurona post-sináptica esté despolarizada porque, en la práctica, no todos los receptores NMDA están bloqueados por magnesio en el potencial de reposo. El poco calcio que entra, de forma modesta pero continua, a través de aquéllos que no se encuentran bloqueados es suficiente para desencadenar la LTD. Por tanto, la clave está en la cantidad de calcio que entra en la

INTRODUCCIÓN

neurona post-sináptica: si ésta se encuentra despolarizada, entra una gran cantidad de calcio y se produce la LTP; mientras que si lo que entra es una cantidad de calcio modesta, debido al pequeño número de receptores NMDA que permanece desbloqueados aún en potencial de reposo, se genera la LTD (Lüscher y Malenka, 2015). Se ha propuesto que en ocasiones la LTD puede funcionar como un mecanismo de recuperación o reseteo para sinapsis que han sido potenciadas previamente. Si una sinapsis o un conjunto de ellas aumentan su eficacia mediante LTP hasta el punto de que ya no pueden potenciarse más, pierden la capacidad de almacenar nueva información. Por ello, y para que la LTP pueda volver a funcionar como mecanismo generador de memoria, dichas sinapsis son selectivamente debilitadas mediante LTD (Purves *et al.*, 2014).

Sea como fuere, en la LTD el resultado final es justo el opuesto al de la LTP: disminuye la respuesta post-sináptica ante posteriores liberaciones de glutamato por parte de la neurona pre-sináptica. Y el mecanismo más aceptado hasta la fecha es, también, el contrario al que induce la LTP: en la LTD se produce una internalización de receptores AMPA que, al desaparecer de la membrana, insensibilizan a la neurona post-sináptica ante posteriores liberaciones de glutamato (Lüscher y Malenka, 2015).

El calcio es, también para la LTD, el factor que desencadena las cascadas de señalización que, en este caso, disminuirán la expresión en membrana de los receptores AMPA. En lugar de quinasas, en este caso las principales efectoras son las enzimas capaces de desfosforilar residuos previamente fosforilados, es decir las fosfatasas. Una de las hipótesis con mayor peso en este sentido es la que implica a la calcineurina (PP2B), una fosfatasa dependiente de calcio-cadmodulina, cuya afinidad por calcio-cadmodulina es mucho mayor que la de la CAMKII. Esto explica de una manera elegante porqué cuando entra una gran cantidad de calcio se activa la CAMKII (LTP) mientras que cuando la cantidad de calcio es modesta se activa la calcineurina (LTD) (Lüscher y Malenka, 2015). Por supuesto, otras fosfatasas también han sido relacionadas con la LTD, como la proteína-fosfatasa 1 y la 2A (PP1 y PP2A). Y, además, se ha demostrado que durante la LTD tiene lugar la desfosforilación de GluA1 al menos en Ser845 (Lee *et al.*, 2000), lo cual explicaría la disminución de su expresión en membrana.

Sin embargo, el esquema global no es tan simple como para asignar en exclusiva la acción de las quinasas a la LTP y la de las fosfatasas a la LTD. De hecho, en la LTD también está implicada la disminución de la expresión en membrana de la subunidad GluA2, pero en este caso el proceso se invierte. Dicha subunidad tiene un sitio de fosforilación para PKC, Ser880, cuya fosforilación implica la disociación de GluA2 de una

proteína de anclaje a la membrana (GRIP), permitiendo así su endocitosis. Por tanto, en el caso de GluA2 la activación de una quinasa es lo que disminuye su expresión en membrana y favorece la LTD (Matsuda *et al.*, 1999; Seidenman *et al.*, 2003).

4.3.4. Neurontransmisión GABAérgica y plasticidad sináptica

Aunque el GABA no interviene directamente en procesos de plasticidad hipocampal como la LTP o la LTD dependientes del receptor NMDA, sí que los modula. En general, la mayoría de referencias al respecto indican que el GABA modula en sentido inhibitorio tanto la LTP como la LTD. Esto tiene bastante sentido, puesto que la liberación de GABA sobre la neurona post-sináptica generaría una hiperpolarización post-sináptica que contrarrestaría un posible EPSP mediado por los receptores AMPA y NMDA.

Por ejemplo, se sabe que el efecto negativo que tienen las benzodiazepinas sobre la memoria se basa en su papel como agonista de los receptores GABA_A, ya que es debido a que la activación de estos receptores inhibe parcialmente la LTP en hipocampo (Evans y Viola-McCabe, 1996). Otro agonista de los receptores GABA_A, el etanol, también parece modular la plasticidad sináptica en el hipocampo, en este caso disminuyendo la magnitud de la LTD en el hipocampo de ratas tras un tratamiento oral crónico con etanol (Thinschmidt *et al.*, 2003). Por el contrario, la inhibición de los receptores GABA_A con bicuculina aumenta la expresión de la LTD en el hipocampo de ratas adultas (Wagner y Alger, 1995).

Por otro lado, se han descrito diferencias importantes entre la LTP en el hipocampo dorsal y ventral. Según estos datos, en el hipocampo ventral la capacidad para inducir LTP es mucho menor. Pofantis y Papatheodoropoulos (2014) proponen que estas diferencias se deben a que en el hipocampo ventral hay una expresión mayor del receptor GABA_A con la subunidad $\alpha 5$, responsable de una mayor inhibición tónica extrasináptica. En cuanto a otras subunidades, se ha visto también que en modelos animales que, durante la adolescencia, se produce un aumento en la expresión de receptores GABA_A del tipo $\alpha 4\beta\delta$ en el hipocampo que inhiben la LTP y alteran al aprendizaje espacial (Smith *et al.*, 2013).

Otro estudio revela que una actividad GABAérgica anómala podría contribuir al déficit cognitivo asociado al envejecimiento. La expresión de uno de los transportadores de cloruro responsables del gradiente que hace posible que el GABA sea un neurotransmisor inhibitorio en adultos (KCC2) está disminuida en ratones de edad avanzada. Como consecuencia de ello, el GABA se vuelve excitador y se potencian sinapsis que no debería ser potenciadas, perdiéndose el carácter específico de la LTP, lo

INTRODUCCIÓN

cual podría generar graves problemas de memoria (Ferando *et al.*, 2016). Algo parecido ocurre ante la exposición perinatal a alcohol, que provoca un aumento de la LTD como consecuencia de una actividad GABAérgica excesivamente inhibitoria debido a un aumento en la expresión de KCC2 que no debería producirse durante el desarrollo (Silvestre de Ferron *et al.*, 2016).

No obstante, también hay algunos estudios que indican que la neurotransmisión GABAérgica inhibitoria es necesaria para la LTP. En un modelo animal de lesión cerebral por trauma se ha visto que la lesión provoca déficits de aprendizaje e inhibición de la LTP que podrían estar relacionados con la pérdida de interneuronas GABAérgicas en el hipocampo, así como una menor expresión en membrana de receptores GABA_A del tipo $\alpha 1\beta 2/3\gamma 2$ (Almeida-Suhett *et al.*, 2015), aunque no está claro que las alteraciones en la LTP y el aprendizaje se deban a la pérdida de interneuronas GABAérgicas y no a alteraciones en los receptores NMDA. Por otro lado, varias enfermedades neurológicas presentan alteraciones en la memoria asociada a un mal funcionamiento de los receptores GABA_A extrasinápticos que contienen la subunidad δ . Parece ser que dichos receptores son necesarios para que entre las fibras musgosas y CA3 se genere LTP adecuada (Whissell *et al.*, 2016).

5. EFECTOS DE LA NEUROINFLAMACIÓN SOBRE LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE. PAPEL DE LA IL-1 β .

Antes de abordar los efectos de la neuroinflamación, y en concreto de la IL-1 β , que se han descrito sobre distintos tipos de memoria, conviene resumir brevemente lo que se sabe acerca de cómo afecta la neuroinflamación a los mecanismos moleculares implicados en dichos procesos cognitivos, entre ellos los procesos de plasticidad sináptica explicados en el apartado anterior.

5.1. Efectos de la neuroinflamación y la IL-1 β sobre la plasticidad sináptica.

Numerosos estudios demuestran que la activación de la microglía afecta negativamente a la LTP en el hipocampo. No obstante, la microglía activada puede presentar un fenotipo proinflamatorio (M1) u otro antiinflamatorio (M2), caracterizados entre otras cosas por liberar citocinas pro y antiinflamatorias respectivamente. Y todas las pruebas indican que es el tipo M1 el que afecta negativamente a la LTP. De hecho, aquellos factores que son capaces de reconvertir la microglía M1 en M2 también incrementan o restauran la LTP (Lynch, 2015).

Por tanto, parece que, en concreto, la alteración de la LTP debida a la neuroinflamación se debe específicamente al aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias. Numerosos

estudios han demostrado, tanto en rodajas como mediante administración in vivo, que varias citocinas neuroinflamatorias disminuyen la LTP en el hipocampo, entre las cuales destacan TNF- α e IL-1 β (Lynch, 2015).

La inhibición de la LTP por IL-1 β ha sido demostrada en diversos modelos, desde la inyección de LPS (Kelly *et al.*, 2003) hasta los ratones transgénicos con Alzheimer (Kelly *et al.*, 2013). Sin embargo, es un efecto que depende de la dosis, ya que el bloqueo del receptor de IL-1 también disminuye la LTP en algunos casos (Goshen *et al.*, 2007). Al parecer, concentraciones fisiológicas de IL-1 β son necesarias para una correcta inducción de LTP en el hipocampo (Avital *et al.*, 2003).

En cuanto a los mecanismos por los cuales la IL-1 β afecta a la LTP, se ha descrito que podrían estar mediados por MAP-quinasas como la p38 (Kelly *et al.*, 2003). Sobre cómo se traduce la activación de estas quinasas en alteraciones de la plasticidad sináptica, un mecanismo plausible es la alteración en la expresión en membrana de los receptores NMDA, AMPA y/o GABA_A, todos ellos implicados directa o indirectamente en el proceso como ya he explicado. De hecho, la activación de p38 por IL-1 β en hipocampo media alteraciones en el aprendizaje espacial (Hernández-Rabaza *et al.*, 2015) como consecuencias de alteraciones en la LTP debidas a un aumento en la expresión en membrana de la subunidad $\alpha 5$ del receptor GABA_A (Wang *et al.*, 2012). Por otro lado, la activación de p38 por el calcio entrante a través de los receptores NMDA que contienen GluN2B disminuye la expresión en membrana de la subunidad GluA1 del receptor AMPA (Li *et al.*, 2006).

Hay diversos estudios que relacionan niveles elevados de IL-1 β con alteraciones en la expresión en membrana de receptores. Así, por ejemplo, el tratamiento intracerebral con LPS, que como ya hemos comentado aumenta los niveles de IL-1 β , disminuye la expresión en membrana de GluN1 y, por tanto, de los receptores NMDA en general, ya que esta subunidad es imprescindible para que estos receptores sean funcionales (Rosi *et al.*, 2004). En cambio, la IL-1 β aumenta la expresión en membrana de GluN2B (Viviani *et al.*, 2003) que como ya he comentado, se relaciona con una disminución en la expresión en membrana de receptores AMPA y con LTD (Fan *et al.*, 2014).

Por otro lado, también se sabe que la IL-1 β disminuye tanto la expresión en membrana de la subunidad GluA1 del receptor AMPA como su fosforilación en Ser831 (Lai *et al.*, 2006). Sobre los receptores GABA_A, la IL-1 β es capaz de aumentar la expresión en membrana de determinadas subunidades (Serantes *et al.*, 2006).

El TNF- α también tiene efectos sobre la expresión en membrana de receptores, reduciendo la expresión en membrana del receptor de GABA_A y aumentando la de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en hipocampo (Stellwagen *et al.*, 2005) pero no en corteza (He *et al.*, 2011).

INTRODUCCIÓN

5.2. Efectos de la neuroinflamación sobre la memoria de reconocimiento.

Existen diversos estudios en los que se han puesto de manifiesto los efectos de la neuroinflamación sobre la memoria de reconocimiento.

Se ha demostrado, por ejemplo, que en modelos de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer hay una mayor activación de la microglía en el hipocampo acompañada en muchos casos de un aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β . Ésta neuroinflamación se ha relacionado con una peor ejecución del NOR (Wang *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2015) y el NOL (Bassani *et al.*, 2017). Además, se ha demostrado que el tratamiento con un agente antiinflamatorio previene la activación de la microglía y el aumento de IL-1 β a la vez que restaura el déficit mostrado en el NOR en ratas inyectadas con beta amiloide (Nillert *et al.*, 2007) y ratones transgénicos APP/PS1 (Guo *et al.*, 2015). Resultados similares se han observado en un modelo de esquizofrenia (Liaury *et al.*, 2014).

La inyección de lipopolisacárido (LPS) bacteriano en roedores es un modelo experimental típico de inflamación y neuroinflamación. En estos animales también se han observado alteraciones en el NOR acompañadas de activación de la microglía y producción de citocinas proinflamatorias (sobre todo IL-1 β y TNF- α) en el hipocampo (Zarezadeh *et al.*, 2017) y la corteza perirrinal (Heisler y O'Connor, 2016). El tratamiento con antiinflamatorios también revierte, en este caso, la neuroinflamación a la vez que restaura la memoria de reconocimiento (Zarezadeh *et al.*, 2017).

5.3. Efectos de la neuroinflamación sobre el aprendizaje espacial: memoria de referencia y de trabajo.

En primer lugar, la alteración de la memoria de referencia espacial como consecuencia de la neuroinflamación ha sido descrita en numerosos estudios y varios modelos animales.

La inyección intracerebral de LPS en ratas, así como el tratamiento con beta-amiloide (como modelo de Alzheimer) o etanol, provocan alteraciones en el aprendizaje y la memoria espacial en uno de los test paradigmáticos de aprendizaje y memoria espacial: el laberinto acuático de Morris (MWM: *Morris Water Maze*) (Rosi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2018; Tiwari y Chopra, 2013). Estas alteraciones vienen acompañadas de activación de microglía en el hipocampo (Rosi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2018) y/o de aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias. Concretamente, la sobreexpresión de IL-1 β en hipocampo se ha relacionado con alteraciones en el aprendizaje espacial en el MWM (Li *et al.*, 2013; Tiwari y Chopra, 2013). Algunos de estos autores emplearon tratamientos que consiguen revertir la neuroinflamación

a la vez que normalizan el aprendizaje espacial en el MWM, demostrando que la neuroinflamación está mediando las alteraciones en el aprendizaje espacial en sus modelos.

El deterioro del aprendizaje espacial asociado al síndrome post-operatorio también ha sido relacionado con activación de microglía y aumento de IL-1 β en el hipocampo (Hovens *et al.*, 2017). Y la neuroinflamación en el hipocampo se ha demostrado también como el factor desencadenante de las alteraciones en el aprendizaje espacial causadas por la exposición perinatal a determinados pesticidas (Gómez-Giménez *et al.*, 2017).

Aunque el papel de la neuroinflamación circunscrita al hipocampo parece estar bastante claro, no hay en la literatura referencias explícitas a la importancia de otras áreas como la POR, por lo que es un punto que aún estaría por aclarar.

En segundo lugar, la memoria de trabajo espacial también se ve afectada por la neuroinflamación, y así se ha descrito en diversos trabajos.

El tratamiento sistémico con LPS induce alteraciones en la memoria de trabajo a través de la activación de microglía y el aumento en la expresión de IL-1 β y TNF- α en PFC e hipocampo (Sparkman *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2018). Además, el tratamiento antiinflamatorio en ratones tratados con LPS reduce la activación de microglía y la expresión de IL-1 β en PFC e hipocampo a la vez que normaliza la memoria de trabajo espacial en el laberinto radial (Das *et al.*, 2017).

6. MODULACIÓN DE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA, LA MEMORIA Y LA NEUROINFLAMACIÓN POR GMP CICLICO (GMPc). PAPEL EN ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA.

El guanósín monofosfato cíclico (GMPc) es sintetizado por la guanilato-ciclasa (GC), enzima que tiene una forma de membrana y otra citosólica, siendo el óxido nítrico (NO) el principal activador de esta última. Las fosfodiesterasas (PDE), por su parte, son las enzimas encargadas de degradar el GMPc (Domek-Lopacinska y Strosznajder, 2005). Parte del GMPc sintetizado se libera al medio extracelular a través de transportadores de la familia de proteínas resistentes a drogas (MRP) (Jedlitschky *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2003; Andric *et al.*, 2006).

En el cerebro, el GMPc lleva a cabo funciones muy diversas a nivel intracelular, de las cuales profundizaré sólo en aquellas de especial interés en el contexto de esta tesis. El GMPc regula el funcionamiento de distintos canales iónicos implicados en la homeostasis de sodio y calcio (Domek-Lopacinska y Strosznajder, 2005). También actúa como segundo mensajero modulando, en parte a través de la PKG, diferentes rutas de señalización implicadas en la LTP y la LTD (Domek-Lopacinska y Strosznajder, 2005). Se ha demostrado, en rodajas de hipocampo, que la activación del receptor NMDA aumenta el calcio, que al unirse a la calmodulina activa la NO-sintasa y la síntesis de NO, que activa a la GC aumentando el GMPc. El pico generado en

INTRODUCCIÓN

los niveles de GMPc activa a la PKG y ésta a la fosfodiesterasa 5 (PDE5) para inducir la degradación de GMPc. Cualquier alteración en todo este proceso implica alteraciones en la LTP (Monfort *et al.*, 2002a, 2002b y 2005).

Por otro lado, también se ha estudiado el posible papel del GMPc en el refuerzo de la LTP a través de la potenciación pre-sináptica. El NO actuaría como mensajero retrógrado que, al ser producido ante la entrada de calcio en el terminal post-sináptico, volvería al pre-sináptico desencadenando la síntesis de GMPc que, de alguna forma, potenciarían la sinapsis implicada (Hawkins *et al.*, 1998). Estudios más recientes han ido desvelando la posible implicación de una GC pre-sináptica activada por NO (Devan *et al.*, 2004) o que el mecanismo de potenciación en el terminal pre-sináptico podría deberse a la estimulación de la liberación de glutamato por la PKG, que fosforila algunas proteínas asociadas a vesículas sinápticas (Domek-Lopacinska y Strosznajder, 2005).

Además, también se ha propuesto un papel del GMPc en una fase más tardía de la potenciación post-sináptica modulando la síntesis proteica *de novo*. La PKG fosforila al factor de transcripción CREB, que es clave en la expresión de genes relacionados con la consolidación a largo plazo de la memoria y el aprendizaje (Bon y Garthwaite, 2003).

Por último, el GMPc modula la respuesta inmune en el sistema nervioso, es decir, la neuroinflamación. Lo hace al menos en parte a través de la microglía y los astrocitos, dos de los tipos celulares más importantes en dicho proceso. Sobre la microglía se ha visto un efecto interesante del GMPc, y es que es capaz de modificar el fenotipo de estas células de M1 (proinflamatorio) a M2 (anti-inflamatorio) a través de la activación de la proteína-quinasa G (PKG) (Borán *et al.*, 2008).

Si bien estos no son los únicos mecanismos implicados y puede haber muchos otros en juego, lo cierto es que en la literatura está sobradamente demostrado el efecto anti-inflamatorio del GMPc, especialmente mediante estudios con inhibidores de su degradación. Por ejemplo, el sildenafil, un inhibidor de la PDE5 con efectos neuroprotectores, mejora la cognición y la memoria, reduce la muerte neuronal en isquemia, reduce los daños en sustancia blanca y, además, tiene efectos antiinflamatorios. Por ejemplo, se ha visto que el tratamiento con sildenafil en ratones transgénicos modelo de Alzheimer APP/PS1, disminuye los niveles de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α e IL-6 a la vez que restaura la memoria de reconocimiento (Zhang *et al.*, 2013). De forma similar, el sildenafil restaura la memoria espacial perdida por inhibición experimental de la NOS (Devan *et al.*, 2007) y la navegación espacial y el miedo condicionado en un modelo transgénico de Alzheimer (Cuadrado-Tejedor *et al.*, 2011).

El GMPc está íntimamente relacionado con las alteraciones cognitivas inducidas por la hiperamonemia. Los pacientes cirróticos presentan alteraciones en los niveles de GMPc en plasma y linfocitos, así como en la GC, que se correlacionan con el grado de EH medido mediante test psicométricos. Por otro lado, la función de la vía receptor NMDA-NO-GMPc está disminuida en cerebelo en distintos modelos animales de EH, incluyendo el de hiperamonemia crónica sin fallo hepático, alterando procesos de plasticidad sináptica y diferentes tipos de aprendizaje que se revierten al restaurar la vía con inhibidores de la degradación de GMPc y anti-inflamatorios (Montoliu *et al.*, 2010), lo cual refuerza la hipótesis del papel del GMPc en la modulación de la neuroinflamación. Existen varios estudios recientes en este sentido. Hernández-Rabaza *et al.* (2015), por ejemplo, demostraron que el tratamiento con sildenafil en ratas PCS es capaz de restaurar el aprendizaje espacial disminuyendo la neuroinflamación y los niveles de IL-1 β .

Aunque los descritos hasta ahora son efectos desencadenados por el GMPc a nivel intracelular, también se han descrito funciones específicas importantes para el GMPc extracelular, especialmente en el contexto de la encefalopatía hepática.

En ratas hiperamonémicas, el tratamiento con GMPc extracelular revierte alteraciones en el aprendizaje espacial disminuyendo, en este caso, los niveles de TNF- α y la sobreactivación de microglía y astrocitos en el hipocampo (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a). El papel del GMPc extracelular ya había sido destacado por Erceg *et al.* (2005). Estos autores demostraron que la restauración de los niveles extracelulares de GMPc en cerebelo es fundamental para normalizar el aprendizaje de las ratas hiperamonémicas y PCS en el laberinto en Y. Además, el aumento del GMPc extracelular en el cerebelo de ratas hiperamonémicas normaliza los niveles de IL-1 β y la activación de la microglía, indicando que también en cerebelo el GMPc extracelular reduce de algún modo la neuroinflamación.

Puesto que el GMPc extracelular no es capaz de atravesar la membrana celular, debe existir algún tipo de diana que medie sus efectos intracelulares. Se ha visto que el GMPc extracelular modula el receptor de glicina, un canal de cloruro que, de forma equivalente a los receptores de GABA_A, genera potenciales inhibidores en las neuronas post-sinápticas. Se ha visto que, en neuronas piramidales del hipocampo, el GMPc extracelular acelera la desensitización del receptor de glicina, acelerando la vuelta del potencial post-sináptico a un nivel basal (Bukanova *et al.*, 2014). Cabrera-Pastor *et al.* (2016b) demostraron que la modulación del receptor de glicina por GMPc extracelular regula bifásicamente el aprendizaje en el laberinto en Y a través de la vía receptor NMDA-NO-GMPc. Otro posible candidato a diana del GMPc extracelular es el antiporter de sodio/protones en astrocitos, que es inhibido por GMPc en

INTRODUCCIÓN

cultivos, acidificando el medio. El pH modula múltiples funciones internas de los astrocitos, entre ellas la comunicación con las neuronas y la neuroinflamación (Touyz *et al.*, 1997).

7. ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN COGNITIVA Y LA PLASTICIDAD SINÁPTICA Y EN MODELOS ANIMALES DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA E HIPERAMONEMIA.

7.1. Alteraciones cognitivas en modelos animales de encefalopatía hepática e hiperamonemia.

Hay algunos estudios en los que se ha puesto a prueba la memoria de reconocimiento en modelos animales de encefalopatía hepática crónica. Se han descrito alteraciones en la ejecución del NOR y el NOL en modelos de hipertensión portal (García-Moreno *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2015) y al menos el NOR está alterado también en otros modelos como el de ligadura biliar (BDL) (García-Ayllón *et al.*, 2008; Leke *et al.*, 2013), colestasis (García-Moreno *et al.*, 2005) o el de fallo hepático inducido por inyección de tioacetamida (Kawai *et al.*, 2012). El tratamiento con lactulosa, un disacárido empleado en clínica para el tratamiento de la EH por sus efectos sobre el metabolismo del amonio en la flora intestinal, revierte las alteraciones en el NOR observadas en este último modelo de EH crónica.

Algunos de estos modelos presentan además hiperamonemia (García-Moreno *et al.*, 2005; García-Ayllón *et al.*, 2008; Kawai *et al.*, 2012; Leke *et al.*, 2013) y Kawai *et al.* demostraron en 2012 que la lactulosa disminuye la hiperamonemia a la vez que restaura el NOR. En el modelo de colestasis, García-Moreno *et al.* en 2005 propusieron incluso la hiperamonemia como el factor desencadenante del empeoramiento cognitivo a través de la producción de citocinas proinflamatorias. Sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado en profundidad el papel de la hiperamonemia en las alteraciones de la memoria de reconocimiento en encefalopatía hepática.

En cuanto al aprendizaje y la memoria espacial en modelos animales de EH, se han descrito alteraciones del aprendizaje espacial en el MWM en los modelos de anastomosis porta-cava (Monfort *et al.*, 2007; Méndez *et al.*, 2008a), fallo hepático por tioacetamida (Méndez *et al.*, 2008a; Singh y Trigun, 2014; Wu *et al.*, 2016) y anastomosis porta-cava (Hernández-Rabaza *et al.*, 2015) y, aunque más leve, también en hipertensión portal (Méndez *et al.*, 2008a). La hiperamonemia en sí misma es suficiente para desencadenar alteraciones en el aprendizaje espacial en el laberinto radial o el MWM (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a).

En lo que respecta a la memoria de trabajo espacial, se han visto alteraciones en el modelo de hipertensión portal (Méndez *et al.*, 2008a), fallo hepático inducido por tioacetamida (Méndez

et al., 2008a; Wu *et al.*, 2016) y por anastomosis porta-cava (Hernández-Rabaza *et al.*, 2015). Además, en el modelo de fallo hepático por tioacetamida se han relacionado las alteraciones en la memoria de trabajo con una disminución de la función de PFC e hipocampo (Méndez *et al.*, 2008b). Por otro lado, el modelo de hiperamonemia sin fallo hepático también es suficiente para alterar la memoria de trabajo espacial (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a).

7.2. Mecanismos moleculares de las alteraciones cognitivas en modelos animales de encefalopatía hepática e hiperamonemia.

Algunos estudios indican que la neuroinflamación en el hipocampo podría estar mediando las alteraciones en el aprendizaje espacial y la memoria de trabajo en modelos de fallo hepático (Hernández-Rabaza *et al.*, 2015; Dadsetan *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016) o incluso en hiperamonemia sin fallo hepático (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a). Los tratamientos capaces de reducir la activación de la microglía y el aumento de citocinas proinflamatorias en el hipocampo también consiguen normalizar el aprendizaje espacial y/o la memoria de trabajo espacial en estos modelos animales.

En base a lo comentado en apartados anteriores, parece plausible que el nexo entre la neuroinflamación inducida por fallo hepático o hiperamonemia y los déficits cognitivos sea la alteración en procesos de plasticidad sináptica. Efectivamente, la LTP está alterada en rodajas *ex vivo* del hipocampo de ratas con anastomosis porta-cava (PCS) (Monfort *et al.*, 2007) y también de ratas hiperamonémicas (Muñoz *et al.*, 2000). Como ya he comentado, la hiperamonemia induce alteraciones en la vía receptor NMDA-NO-GMPc que podrían, al menos en parte, explicar estas alteraciones en la LTP (Monfort *et al.*, 2005). La alteración en otros puntos clave de la inducción de LTP, como la activación de la CAMKII, la expresión en membrana de la subunidad GluA1 del receptor AMPA, o su fosforilación en Ser831, también han sido descritos en modelos animales de EH (Wen *et al.*, 2012).

Varios estudios recientes apuntan a que la alteración en la expresión en membrana de distintas subunidades de los receptores NMDA, AMPA y GABA_A podría ser el mecanismo por el cual la neuroinflamación que presentan las ratas PCS o hiperamonémicas, sobre todo por niveles elevados de IL-1 β y TNF- α , acabe alterando procesos de plasticidad sináptica como la LTP y, en consecuencia, la memoria y el aprendizaje asociados a dichos mecanismos (Hernández-Rabaza *et al.*, 2015, 2016a; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a). Prueba de lo anterior es que, en estos estudios, diversos tratamientos que se demuestran antiinflamatorios como el sulforafano (Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a) y el GMPc intracelular (Hernández-Rabaza *et al.*, 2015) y extracelular (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a) no sólo revierten alteraciones en el

INTRODUCCIÓN

aprendizaje espacial de ratas PCS e hiperamonémicas, sino que también normalizan la expresión en membrana de determinadas subunidades de los receptores NMDA, AMPA y GABA_A.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los modelos animales de hiperamonemia crónica presentan alteraciones cognitivas y motoras que reproducen las que presentan pacientes con encefalopatía hepática mínima (EHM).

La neuroinflamación inducida por la hiperamonemia juega un papel fundamental en el deterioro cognitivo que presentan las ratas hiperamonémicas, ya que distintos tratamientos que consiguen reducirla han resultado efectivos en restaurar la función cognitiva. En concreto, la activación de la microglía y el aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias en el hipocampo de estas ratas, alteran la memoria y el aprendizaje espacial. Estudios previos han relacionado específicamente algunas de estas alteraciones espaciales con el aumento de TNF α , pero la contribución concreta de la IL-1 β no se ha estudiado en profundidad. Tampoco se han estudiado los efectos de la neuroinflamación inducida por la hiperamonemia sobre otros tipos de memoria, como la de reconocimiento, ni la contribución de las áreas corticales que participan en su procesamiento.

Los mecanismos por los que la neuroinflamación causada por la hiperamonemia, y en concreto la IL-1 β , deteriora la función cognitiva incluyen alteraciones en la expresión en membrana de receptores de glutamato en el hipocampo, pero se desconocen los mecanismos moleculares por los que esto ocurre.

Por otra parte, la vía de síntesis del GMPc está alterada en hiperamonemia, y el tratamiento intracerebral con GMPc extracelular reduce la neuroinflamación y restaura la función cognitiva dependiente de cerebelo y también el aprendizaje espacial, que se relaciona tradicionalmente con el hipocampo. Se sabe que la modulación por GMPc extracelular de la expresión en membrana de receptores en el hipocampo juega un papel fundamental en la mejora del aprendizaje espacial, pero se desconocen los mecanismos moleculares implicados.

Puesto que la IL-1 β juega un papel fundamental en el deterioro cognitivo de las ratas hiperamonémicas, partimos de la hipótesis de que el tratamiento intracerebral con el antagonista de su receptor (IL-1Ra) debe restaurar aquellas alteraciones cognitivas causadas por el aumento de la IL-1 β , y no las que se deben a otros factores proinflamatorios. Además, la aplicación de IL-1Ra en rodajas ex vivo nos permitirá analizar los mecanismos moleculares implicados en la alteración de la expresión en membrana de receptores. Finalmente, también se aplicará un tratamiento ex vivo con GMPc extracelular a las rodajas para caracterizar los mecanismos por los cuales éste revierte las alteraciones en la expresión en membrana de receptores en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

Los objetivos principales de estas tesis son:

- 1) Caracterizar la contribución de la IL-1 β a la neuroinflamación de las ratas hiperamonémicas en hipocampo y distintas áreas de corteza, así como sus efectos sobre la expresión en membrana de receptores de glutamato y GABA y sobre diferentes tipos de memoria: espacial, de trabajo y de reconocimiento.
- 2) Analizar detalladamente los mecanismos moleculares por los que la IL-1 β altera la expresión en membrana de receptores AMPA y NMDA en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.
- 3) Caracterizar los mecanismos moleculares por los cuales el GMPc extracelular modula la expresión en membrana de receptores AMPA y NMDA en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

Para ello se han abordado los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar en ratas hiperamonémicas, mediante la infusión crónica intracerebral de IL-1Ra, el papel de la IL-1 β en:
 - 1.1. Las alteraciones en la memoria espacial, de trabajo y de reconocimiento.
 - 1.2. La activación de la microglía en hipocampo y distintas áreas corticales.
 - 1.3. Las alteraciones en la expresión en membrana de receptores AMPA, NMDA y GABA_A en hipocampo y corteza prefrontal.
2. Estudiar ex vivo, en rodajas frescas de hipocampo, los mecanismos por los cuales la IL-1 β altera la expresión en membrana de los receptores NMDA y AMPA en ratas hiperamonémicas.
3. Estudiar ex vivo, en rodajas frescas de hipocampo de ratas hiperamonémicas, los mecanismos por los cuales el GMPc extracelular modula la expresión en membrana de receptores AMPA y NMDA.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MODELO EXPERIMENTAL: hiperamonemia crónica sin fallo hepático.

En esta tesis se han empleado ratas macho de la cepa Wistar con hiperamonemia crónica inducida siguiendo un procedimiento desarrollado previamente por nuestro laboratorio (Felipo *et al.*, 1988a). Para ello se les suministró una dieta enriquecida en amonio (25% de acetato amónico) durante al menos 3 semanas, mientras que las ratas control fueron alimentadas con piensos comerciales convencionales. Las ratas hiperamonémicas presentan aumentos del 41, 35 y 70% en la concentración de amonio en cerebro, hígado y músculo respectivamente respecto a las ratas control; mientras que en sangre los niveles de amonio se duplican. Como consecuencia de esto, la excreción de amonio también se ve incrementada. Los niveles de urea en sangre (≈ 16 mM) y la eliminación de urea (25 mmoles al día) son aproximadamente el doble de los valores correspondientes a animales control.

2. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO: implantación de mini-bombas osmóticas

En los experimentos realizados *in vivo*, ratas control e hiperamonémicas (tras dos semanas de dieta enriquecida en amonio) fueron sometidas a una cirugía en la que se les implantó una mini-bomba osmótica con el fin de administrarles un tratamiento intracerebralmente, con el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) o su vehículo, atravesando la barrera hematoencefálica. Las mini-bombas osmóticas se rellenaron previamente con el contenido correspondiente según cuatro grupos experimentales:

- 1) **CV:** Ratas control a las que se implantaron mini-bombas osmóticas con vehículo (suero salino + BSA 0,1%).
- 2) **CI:** Ratas control a las que se implantaron mini-bombas osmóticas con IL-1Ra (55 $\mu\text{g/ml}$, R&D Systems cat# 1545-RA-025, Minneapolis, USA; diluido en suero salino + BSA 0,1%).
- 3) **HV:** Ratas hiperamonémicas a las que se implantaron mini-bombas osmóticas con vehículo.
- 4) **HI:** Ratas hiperamonémicas a las que se implantaron mini-bombas osmóticas conteniendo IL-1Ra.

Se utilizaron mini-bombas osmóticas con cánula para infusión cerebral ("ALZET". *Brain infusion KIT II 3-5mm. Mini-Osmotic pumps* modelo 2004. ALZA Corporation, Palo Alto, CA, USA). Estas mini-bombas se activan automáticamente al ser abiertas y liberan su contenido a razón de 0.25 $\mu\text{l/hora}$, vaciándose completamente a los 28 días.

Al inicio de la cirugía se anestesió la rata con isoflurano (5% en 100% de oxígeno para inducir la anestesia y 2% para mantenerla) y se afeitó el pelo de la cabeza del animal. Para colocar de manera precisa la cánula en el ventrículo cerebral, la cabeza del animal se colocó en un aparato estereotáxico. A continuación, se realizó una incisión sagital para exponer la superficie del cráneo y se taladró un pequeño agujero para la inserción de la cánula en las siguientes

coordinadas a partir de bregma: +0.9 mm en el eje anteroposterior, +1.3 mm en el eje mediolateral y 4.5 mm en el dorsoventral (Paxinos y Watson, 2007). Antes de colocar la cánula, empleando unas pinzas hemostáticas, se preparó un pequeño túnel subcutáneo en el área escapular de la espalda del animal, a partir de la incisión realizada a nivel del cuero cabelludo y hasta el área media. En este bolsillo se introdujo la mini-bomba osmótica conectada vía catéter a la cánula a implantar intraventricularmente a través del trépano realizado previamente. La mini-bomba osmótica se insertó en el bolsillo subcutáneo, el cual permite cierta movilidad, sin que el catéter estuviera muy tirante, para que el animal tenga movilidad sin peligro de que el catéter se desenganche de la cánula. Una vez introducida en el cerebro, la cánula se sujetó a la superficie del cráneo con un par de tornillo y cemento dental, y se suturó la piel con seda quirúrgica trenzada y puntos simples.

Tras la operación, se dejaron transcurrir tres o cuatro días para que los animales se recuperasen antes de empezar cualquier test de comportamiento. Pasados 28 días desde la implantación de las mini-bombas osmóticas se sacrificaron las ratas, empleándose el cerebro para análisis bioquímicos por inmunoblot o inmunohistoquímica. La funcionalidad de las bombas se verificó pesándolas antes de colocarlas y después del sacrificio.

3. TEST DE APRENDIZAJE Y MEMORIA.

Con las ratas pertenecientes a los cuatro grupos anteriores, se realizaron diferentes test con el fin de evaluar distintas habilidades cognitivas.

3.1. Memoria espacial y de trabajo: laberinto radial de 8 brazos

Este laberinto permite cuantificar el aprendizaje y la memoria espacial de las ratas, descomponiéndola además en dos procesos cognitivos diferenciables: memoria espacial de referencia y memoria espacial de trabajo.

Se lleva a cabo en un laberinto con un área central de unos 30 cm de diámetro en la cual confluyen ocho brazos equidistantes y de idéntico tamaño: 70 cm de longitud y 10 cm de anchura. El laberinto empleado es de plexiglás negro y está a una altura de 1 m sobre el suelo. Cada brazo tiene paredes laterales con una altura de 5 cm en el extremo distal y de 30 cm en el extremo más próximo al área central. Además, en el extremo distal de cada brazo hay un comedero empotrado en el suelo donde se coloca la comida empleada como recompensa (Figura 6). Con el fin de que presenten el nivel de motivación necesario para realizar la tarea, a las ratas se les reduce la ingesta de comida cuatro días antes de realizar el pre-test y se mantienen con esa dieta restrictiva durante toda la duración del

MATERIALES Y MÉTODOS

test. En cualquier caso, se controla el peso de los animales para que la pérdida de peso nunca sobrepase un 20%.

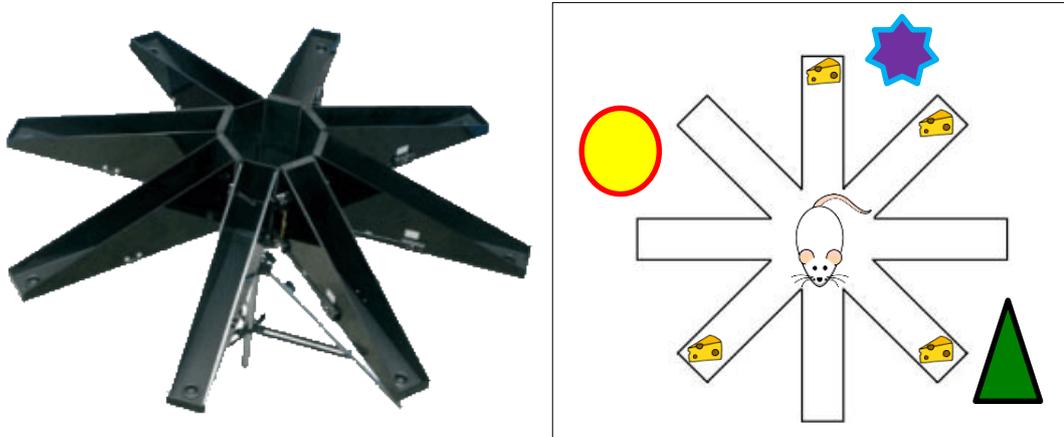


Figura 6. Laberinto radial de 8 brazos. A la izquierda, una imagen del laberinto empleado. A la izquierda, un esquema del test llevado a cabo. El animal se coloca en el centro del laberinto y a lo largo del test aprende a localizar y recordar los 4 brazos que contienen comida al final, usando como principales puntos de referencia las pistas visuo-espaciales dispuestas a su alrededor.

En primer lugar, se realiza el pre-test, destinado a que las ratas se habitúen tanto al investigador como al laberinto y a la recompensa. En la primera sesión del pre-test se colocan dos ratas en el laberinto durante 5 min con comida esparcida por todo el laberinto. En la segunda sesión del pre-test se coloca sólo una rata en el laberinto durante 5 minutos con comida únicamente dentro de todos los comederos (2 pellets). A continuación, se realiza el test durante 6 días con 5 ensayos al día. Se coloca la comida en 4 de los 8 comederos: en 2 brazos consecutivos (ejemplo: 1 y 2) y en otros 2 brazos no consecutivos (ejemplo: 4 y 6). El patrón de brazos con/sin comida es diferente para cada rata y se mantiene idéntico a lo largo de los 6 días. Se espera que la rata sea capaz de orientarse espacialmente, mediante las pistas visuales colocadas en la sala de experimentación, aprenda qué brazos contienen comida y se coma todos los *pellets* pero, en cualquier caso, el tiempo máximo de estancia en el laberinto es de 3 min. Durante el test se registran (i) los errores de referencia espacial, que se definen como el número de veces que entra el animal en un brazo sin comida; (ii) los errores de memoria de trabajo, el número de veces que entra en un brazo que ya ha visitado dentro de un mismo ensayo y (iii) el número de aciertos en cada ensayo, que corresponde al número de entradas en brazos con comida. Restando a este número de aciertos el número de errores de referencia se obtiene el índice de aprendizaje espacial.

3.2. Memoria de reconocimiento: NOR y NOL

La memoria de reconocimiento, en los roedores, se basa en la capacidad de recordar un estímulo que ya ha sido percibido con anterioridad, diferenciándolo de otro novedoso. En esta tesis se han analizado dos variantes de la memoria de reconocimiento: (i) reconocimiento de un objeto novedoso (*Novel Object Recognition*, NOR) y (ii) reconocimiento de una localización espacial novedosa (*Novel Object Location*, NOL).

En ambos casos, el test se realizó en una caja de madera (70x70x40 cm) pintada de negro, con el suelo cubierto de serrín, pistas visuo-espaciales en las paredes y una videocámara colocada encima para la grabación y posterior análisis del comportamiento de los animales. Los animales fueron habituados a este nuevo entorno durante 5 días, dejándolos que exploraran libremente la caja vacía durante 5 min cada día. Al sexto día, se llevó a cabo el NOL, que constó de una primera fase de muestra y una segunda fase de test. En la fase de muestra, sobre el serrín se colocaron dos objetos idénticos, contruidos por nosotros mismos a partir de pequeños bloques de madera pintada. La posición de los objetos se cambió entre unos animales y otros para descartar sesgos debidos a estímulos externos. Tras explorar libremente los objetos durante 3 min, el animal se devolvió a su caja para esperar en ella durante 2 h. A continuación, se llevó a cabo la fase de test, colocando uno de los objetos anteriormente explorados en un sitio diferente de la caja para permitir luego que el animal volviera a explorar libremente en ella durante 3 min (Figura 7 izquierda).



Figura 7. Test de memoria de reconocimiento (NOL y NOR). Se representa la configuración de los objetos a explorar por el animal en la fase de test del NOL (izquierda), en la que se ha cambiado la posición de uno de los objetos, y del NOR (derecha), en la que se ha sustituido uno de los objetos por otro diferente.

El séptimo día se llevó a cabo el test NOR. En este caso, de nuevo, hubo una primera fase de muestra y una segunda fase de test. En la fase de muestra, sobre el serrín se colocaron

MATERIALES Y MÉTODOS

dos objetos idénticos. La posición de los objetos se cambió entre unos animales y otros para descartar sesgos debidos a estímulos externos. Tras explorar libremente los objetos durante 3 min, el animal se devolvió a su caja para esperar en ella durante 6 h. A continuación, se llevó a cabo la fase de test, sustituyendo uno de los objetos anteriormente explorados por un nuevo objeto, diferente a los dos iniciales, para permitir luego que el animal volviera a explorar libremente en ella durante 3min (Figura 7 derecha). En el análisis posterior de los vídeos de los test se analizó el tiempo que los animales exploraban el estímulo nuevo (el objeto cambiado de sitio en el NOL y el nuevo objeto en el NOR) frente al estímulo ya conocido. De esta forma, se define el ratio de discriminación como el cociente entre la resta del tiempo de exploración del estímulo nuevo y el tiempo de exploración del estímulo conocido dividida por el tiempo total de exploración.

4. EXPERIMENTOS EX VIVO EN RODAJAS FRESCAS DE HIPOCAMPO

Algunos de los resultados presentados en esta tesis se han obtenido mediante experimentos *ex vivo* con rodajas frescas de hipocampo. Se trata de un modelo que, aun teniendo las limitaciones que implican el no trabajar con el animal vivo, se aproxima mucho más a la realidad que los cultivos celulares puesto que al mantener vivas las rodajas también se mantienen en funcionamiento circuitos enteros dentro de las mismas, así como las interacciones que se establecen entre distintos tipos y poblaciones celulares dentro del cerebro vivo. En esta tesis, ha sido la técnica de elección para estudiar mecanismos celulares y moleculares concretos.

En este tipo de experimentos se decapitaron ratas control e hiperamonémicas (tras 4-5 semanas de dieta enriquecida en amonio) y el cerebro se extrajo rápidamente colocándolo sobre una placa Petri enfriada en hielo. Se llevó a cabo entonces la disección de los hipocampos, haciendo un corte a lo largo de la línea media para separar ambos hemisferios cerebrales y extrayendo luego ambos hipocampos con la ayuda de unas espátulas. Los hipocampos se sumergieron inmediatamente en tampón Krebs (en mM: NaCl 119, KCl 2.5, KH_2PO_4 1, NaHCO_3 26.2, CaCl_2 2.5 y glucosa 11), enfriado en hielo y burbujeado con carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2) para mantener el tejido fresco y oxigenado y el metabolismo ralentizado para disminuir el riesgo de necrosis. A continuación, los hipocampos se colocaron longitudinalmente en un *chopper* manual y se obtuvieron rodajas de 400 μm de grosor (Figura 8). Dichas rodajas se transfirieron a los pocillos de un incubador termostataado, incubadas de forma continua con Krebs oxigenado a 37°C durante 20-30 min para su estabilización, es decir, para que el metabolismo celular volviera a su funcionamiento normal. Una vez estabilizadas las rodajas, se llevó a cabo el tratamiento de elección según los mecanismos moleculares que se

MATERIALES Y MÉTODOS

quisieran analizar. Los reactivos utilizados para los tratamientos, siempre disueltos en el Krebs de perfusión, fueron: el antagonista del receptor de interleucina 1: *IL-1Ra* (100 ng/ml, R&D Systems cat# 1545-RA-025, Minneapolis, USA); el inhibidor de la subunidad GluN2B de los receptores NMDA *ifenprodil* (100 μ M, Abcam cat# ab120111, Cambridge, MA, USA); el inhibidor de la MAP-quinasa p38 *SB239063* (20 μ M, Tocris cat# 1962, Bristol, UK); el inhibidor de la PKC δ *rottlerin* (10 μ M, Sigma cat# R5648, Darmstadt, Germany); el inhibidor de Src *PP2* (10 μ M, Sigma cat# P0042, Darmstadt, Germany) o GMPc (40 nM, Sigma cat# G6129, Darmstadt, Germany). Tras 30 min del tratamiento correspondiente, las rodajas se extrajeron del incubador y se procesaron para su posterior análisis mediante inmunohistoquímica o inmunoblot.

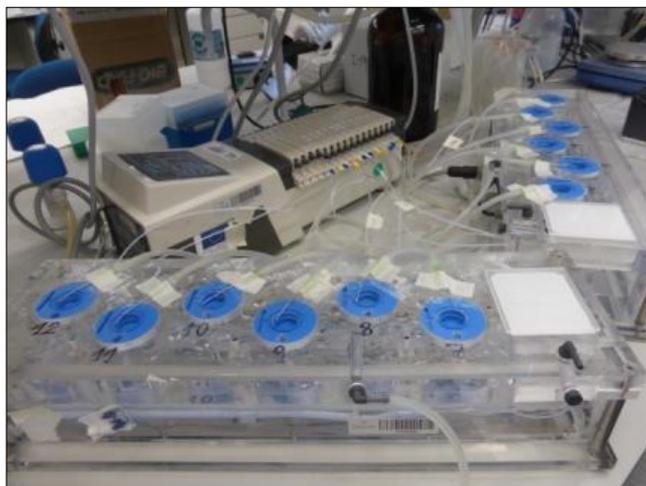


Figura 8. Incubador para rodajas frescas ex vivo. Las rodajas frescas se colocan en una serie de pocillos que están conectados tanto a una bomba de perfusión, que los va llenando del tampón Krebs con el tratamiento correspondiente, como a un sistema de vacío que retira el exceso de líquido para garantizar su renovación. El líquido con el que se incuban las rodajas está permanentemente oxigenado con carbógeno y su temperatura en los pocillos se mantiene a 37°C gracias a un termostato.

Las rodajas procesadas para inmunohistoquímica se sumergieron en en paraformaldehído (PFA) al 4% en suero salino pH=7.4 durante 24 h. A continuación, se cambió el PFA por tampón fosfato (PB) 0.1 M con azida sódica (0.01%, Sigma cat# S2002, Darmstadt, Germany) hasta su procesamiento para inmunohistoquímica (ver apartado 7 de Materiales y Métodos).

En cambio, las rodajas destinadas a ser analizadas mediante inmunoblot fueron sometidas a un procesamiento diferente en función de las proteínas que se querían analizar.

5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA INMUNOBLOT

Por un lado, algunas rodajas fueron seleccionadas aleatoriamente para analizar el estado de fosforilación de determinados residuos de proteínas concretas o bien la expresión general de

MATERIALES Y MÉTODOS

proteínas en el hipocampo. Estas rodajas, tras el tratamiento en el incubador, se colocaron rápidamente dentro de tubos con 200 μ l de tampón de fosforilación (Tris-HCl 66mM pH 7.4, SDS 1%, EGTA 1 mM, glicerol 10%, leupeptina 0.2 mg/ml, NaF 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM) en hielo y se homogeneizaron mediante sonicación durante 20 seg. A continuación, se tomó una alícuota de 3 μ l de cada muestra para determinar la concentración de proteínas totales (ver más abajo) y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis mediante inmunoblot, procurando siempre llevarlo a cabo al día siguiente o en los días posteriores para preservar el estado de fosforilación de las proteínas.

Por otro lado, otras rodajas se emplearon para analizar la expresión de determinadas proteínas en la superficie de las células del hipocampo, esto es, su expresión en membrana. Para ello, se siguió un protocolo de incubación con bis-sulfosuccinimidyl-suberate (BS3) (Pierce cat# 21580, Rockford, IL, USA), una molécula *cross-linker* que no es capaz de atravesar la membrana celular, pero se une a los residuos de lisina en los dominios extracelulares de las proteínas. Tras su tratamiento en el incubador, algunas rodajas se transfirieron a tubos con 200 μ l de Krebs, muestras (-), y otros con el mismo tratamiento previo a tubos con 200 μ l de BS3 2 mM en Krebs, muestras (+), y se incubaron en ambos casos durante 30 min a 4°C y en agitación. Una vez transcurrido este tiempo, la reacción de *cross-linking* se consideró acabada y se añadieron 200 μ l de glicina 100 mM en Krebs a todos los tubos, incubando durante 10 min más, para neutralizar el BS3 que hubiera podido quedar sin unirse a proteínas de membrana. De esta forma queda garantizado que sólo las proteínas de membrana permanecerán unidas al *cross-linker* y que los restos de BS3 que hayan podido quedar no se unirán a proteínas intracelulares cuando, a continuación, se homogenicen las muestras mediante sonicación durante 20seg en 200 μ l de tampón de fosforilación. A continuación, se tomó una alícuota de 3 μ l de cada muestra para determinar la concentración de proteínas totales y se almacenaron las muestras a -20°C para su posterior análisis mediante inmunoblot.

La determinación de la concentración proteica total de las muestras se llevó a cabo mediante el método colorimétrico del ácido bicinonónico (BCA Protein Assay Kit cat# 23225, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en una placa de 96 pocillos y realizando puntos dobles para cada muestra y una curva de calibrado con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA). El objetivo de esta determinación colorimétrica es cargar la misma cantidad de proteína total en el gel de electroforesis del inmunoblot (ver apartado 6 de Materiales y Métodos) para poder comparar luego el contenido de las proteínas seleccionadas en muestras diferentes.

6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR INMUNOBLOT

Para analizar el contenido de proteínas concretas en las muestras obtenidas se llevaron a cabo dos tipos de inmunoblots o *western-blots* según la procedencia de la muestra a analizar. Las muestras procedentes de protocolos de expresión en membrana van siempre por duplicado (con y sin BS3), por lo que para poder analizar un mayor número de muestras en cada *blot* se decidió cargarlas en unos geles de mayor tamaño que los empleados para las muestras de fosforilación o contenido proteico general. En cualquier caso, los protocolos son idénticos a excepción de las cantidades de reactivos empleadas y los tiempos de los diferentes pasos del protocolo.

En primer lugar, se lleva a cabo la separación de las proteínas de la muestra según sus masas moleculares mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Dichos geles constan de dos zonas con diferente concentración de acrilamida: la parte superior o *stacking*: 25% Tris 0.5 M + 0.4% SDS con pH=6.8 ajustado con HCl, 13% mezcla Acrilamida/Brisacrilamida (cat# A0385, Panreac), 1% APS (cat# 7727-54-0, Merck-Millipore) y 0.2% TEMED (T9281, Sigma), que concentra la muestra en una banda estrecha antes del inicio de su separación, y la parte inferior o *separating*: 25% Tris 1.5M + 0.4% SDS con pH=6.8 ajustado con HCl, 20% mezcla Acrilamida/Brisacrilamida, 0.33% APS y 0.07% TEMED, en la que las proteínas se separan según su peso molecular. La concentración de acrilamida del *separating*, que determina el diámetro de poro final del gel, se ajustó en función de la masa molecular de las proteínas que se querían analizar.

En los pocillos del gel se cargó el volumen correspondiente de cada muestra con el fin de que la cantidad total de proteína cargada fuera la misma en todos los casos. Dicha cantidad osciló en función de la abundancia relativa de las proteínas a analizar, la afinidad del anticuerpo utilizado y el área cerebral de procedencia de la muestra, situándose entre 30 y 75 μg de proteína total en los geles pequeños (10x8 cm) (para analizar fosforilación de residuos y contenido total de determinadas proteínas) y entre 50 y 200 μg en los geles grandes (20x18 cm) (para analizar expresión en membrana de receptores). Las muestras se diluyeron en tampón de carga 2X (65% Tris-HCl 0.5 M pH=6.8, 21% glicerol, 4% SDS, 10% 2-Mercaptoetanol, 0.02% azul de bromofenol).

La electroforesis se llevó a cabo introduciendo los geles en tampón *running* (Tris Base 25 mM, SDS 3.5 mM, Glicina 0.2 M) a una intensidad de la corriente de 25 mA por gel pequeño durante 1-1.5 h y de 10 mA por gel grande hasta el día siguiente (15-20 h).

El segundo paso del protocolo consiste en la transferencia de las proteínas separadas en el gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) en tampón de transferencia (Tris Base 25

MATERIALES Y MÉTODOS

mM, Glicina 0.19 M, 20% metanol) y con una corriente de 250 mA durante 2 h para los geles pequeños y 5 h para los geles grandes. A continuación, se bloquearon las membranas pequeñas con BSA al 5% en TBS-*Tween* (NaCl 150 mM, Tris Base 50 mM, 0.1%, Tween-20 pH 7.5) y las grandes con leche al 5% en TBS-*Tween* durante 45-60 min, con el fin de impedir uniones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana. Tras el bloqueo, las membranas se lavaron cinco veces con TBS-*Tween* durante 10 min.

El tercer paso del protocolo es la incubación con el anticuerpo primario que reconozca específicamente la proteína que queremos analizar. Para ello, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en BSA al 5% en TBS-*Tween* durante toda una noche a 4°C. En la Tabla 1 se presenta la relación de anticuerpos primarios empleados y sus correspondientes concentraciones.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, el cuarto paso del protocolo consiste en la incubación de las membranas con un anticuerpo secundario (conjugado con la enzima de revelado: fosfatasa alcalina) que se una al anticuerpo primario para amplificar su señal. Para ello se retiró el anticuerpo primario, se volvieron a lavar las membranas cinco veces con TBS-*Tween* durante 10 min y luego se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente, y en agitación en el caso de las membranas grandes. En la Tabla 2 se detallan los anticuerpos secundarios utilizados. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se prepararon para el quinto y último paso del protocolo, esto es, el revelado para hacer visibles las proteínas. Para ello, la membrana se lavó 4 veces durante 10 min con TBS-*Tween* y a continuación se hizo un quinto lavado con tampón sustrato (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris Base 100 mM pH=9.5). Por último, se reveló utilizando un método colorimétrico para la enzima fosfatasa alcalina con una mezcla de 0.66% de NBT (4-Nitro blue tetrazolium chloride) y 0.34% de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine) en tampón sustrato. El tiempo de revelado fue muy diferente según la proteína, pero en cualquier caso la reacción fue detenida siempre antes de la saturación de las bandas, sumergiendo rápidamente las membranas en agua destilada.

Una vez secas, las membranas se escanearon en un escáner Hewlett Packard Scanjet 5300C y la intensidad de las bandas fue cuantificada con el programa Alphamager 2200 (AlphaEaseFC 2200 for Windows, Cambridge, UK).

En el caso de las membranas pequeñas, junto a cada proteína se empleó la actina como control de carga, por lo que la cuantificación de la intensidad de banda se relativizó siempre a la intensidad de la banda de actina. Los valores se expresaron siempre como porcentaje respecto al valor de las muestras procedentes de ratas control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Relación de anticuerpos primarios empleados en inmunoblot.

Anticuerpo	Casa comercial / Referencia	Concentración
GluA1	Millipore / 04-855	1:1000
GluA2	Millipore / AB1768	1:2000
GluN1	BD Pharmingen / 556308	1:1000
GluN2A	Millipore / 04-901	1:1000
GluN2B	Millipore / 06-600	1:1000
GABA _A α 1	Abcam / ab32589	1:1000
pSer831-GluA1	Millipore / 04-823	1:1000
pTyr1472-GluN2B	Millipore / AB5403	1:1000
pSer880-GluA2	Abcam / ab52180	1:2000
pSer1303-GluN2B	Abcam / ab81271	1:1000
p-p38	Cell Signaling / 9211	1:500
p38	Cell Signaling / 9212	1:1000
pThr286-CAMKII	Thermo / MA1-047	1:500
CAMKII	Thermo / MA-048	1:1000
pTyr418-Src	Abcam / ab40660	1:1000
Src	Abcam / ab47405	1:1000
pThr560-PKC ζ	Abcam / ab59412	1:1000
PKC ζ	Santa Cruz / sc-17781	1:2000
IL-1 β	R&D Systems / AF-501-NA	1:500
Actina	Abcam / ab6276-100	1:4000

Relación de anticuerpos primarios empleados para analizar proteínas mediante inmunoblot. Se aporta casa comercial, referencia del catálogo y dilución empleada en cada caso.

En el caso de las membranas grandes, como se explicó anteriormente, se corrieron siempre las muestras por duplicado, por lo que para cada una de ellas se obtuvo una banda (-) sin BS3, que representa el contenido total de la proteína, y otra una banda (+) con BS3, que representa exclusivamente el contenido citosólico de la proteína, ya que el BS3 interacciona con las proteínas de membrana induciendo la formación de agregados de alto peso molecular que permanecen en el pocillo del gel de electroforesis impidiendo su migración. Por tanto, al cuantificar se restó la intensidad de la banda citosólica (+) a la de la banda total (-) y se obtuvo así una estimación de la cantidad de la proteína en membrana para esa muestra. Los valores se

MATERIALES Y MÉTODOS

expresaron siempre como porcentaje respecto al valor de las muestras procedentes de ratas control.

Tabla 2. Relación de anticuerpos secundarios empleados en inmunoblot

Anticuerpo	Casa comercial / Referencia	Concentración
Anti-IgG de conejo-fosfatasa alcalina	Sigma / A8025	1:4000
Anti-IgG de ratón-fosfatasa alcalina	Sigma / A3562	1:4000
Anti-IgG de cabra-fosfatasa alcalina	Sigma / A7650	1:4000

Relación de anticuerpos secundarios empleados para analizar proteínas mediante inmunoblot. Se aporta casa comercial, referencia del catálogo y dilución empleada en cada caso.

7. INMUNOHISTOQUÍMICA

Para los estudios de inmunohistoquímica, las ratas se anestesiaron por inyección intraperitoneal de pentobarbital 1 ml/kg y se perfundieron por vía intracardiaca con suero salino para eliminar la sangre. A continuación, para fijar los tejidos, se perfundieron 500 ml de PFA al 4% en tampón fosfato (PB) 0.1 M (Na_2HPO_4 75.4 mM; NaH_2PO_4 24.6 mM) (pH 7.4) a temperatura ambiente. A continuación, el cerebro se extrajo cuidadosamente y se mantuvo en PFA durante un periodo no superior a 24 horas, tras el cual se guardó en una solución de PB 0.1 M con azida sódica al 0.01%.

A continuación, tanto los cerebros enteros como algunas de las rodajas procedentes de experimentos ex vivo (ver apartado 4 de Materiales y Métodos) siguieron el mismo protocolo: se incluyeron en parafina y se cortaron secciones horizontales de 5 μm de grosor utilizando un micrótopo. Para desparafinar las muestras, se incubaron los cortes a 62°C durante 1 hora. A continuación, se llevó a cabo la recuperación antigénica (*FLEX TRS High*), debido a que durante el proceso de inclusión en parafina se forman enlaces covalentes con las proteínas (antígenos) que dificultarían la unión del anticuerpo primario. Mediante un tratamiento con calor (95°C), se consigue romper dichos enlaces para un reconocimiento efectivo de la proteína de interés por parte del anticuerpo primario. Para realizar la inmunohistoquímica se utilizó un equipo de tinción *Autostainer Link 48* (Dako Diagnósticos). En primer lugar, los cortes se lavaron con PB 0.1 M y se incubaron durante 5 min con *Endogenous Enzyme Block (FLEX peroxidase Block)* para bloquear la actividad peroxidasa endógena. A continuación, se lavaron los cortes con el mismo tampón y se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 3) diluido en solución de bloqueo.

Tabla 3. Relación de anticuerpos primarios empleados en inmunohistoquímica

Anticuerpo	Casa comercial / Referencia	Concentración	Tiempo (min)
IBA1	WAKO / 019-19741	1:300	30
IL-1 β	Abcam / Ab9722	1:100	30

Relación de anticuerpos primarios empleados en inmunohistoquímica. Se aporta casa comercial, referencia del catálogo, dilución empleada y tiempo de incubación en cada caso.

Para eliminar el anticuerpo primario residual que no quedó adherido al tejido, se lavaron de nuevo los cortes con el mismo tampón. Los anticuerpos secundarios empleados (listos para usar, DAKO) están conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), que reacciona con un sustrato colorimétrico, diaminobenzidina (DAB). Las rodajas se incubaron con el anticuerpo secundario durante 20 minutos. El anticuerpo secundario residual se retiró de las rodajas mediante varios lavados. Para el revelado se incubaron las rodajas durante 10 minutos con el DAB. A continuación, las rodajas se trataron con hematoxilina para conseguir una contra-tinción de los núcleos celulares. Finalmente, las muestras se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol: 70%, 96% y 100% durante 5, 5 y 10 minutos respectivamente. Tras la deshidratación, las rodajas se mantuvieron en xileno al menos durante 10 minutos y se montaron. Una vez secas las preparaciones, se escanearon en un escáner *Pannoramic 250 (Automatic Brightfield Scan)*. Las imágenes escaneadas fueron analizadas con el programa *Pannoramic Viewer*, que permite realizar fotos a distintos aumentos de las regiones de interés.

7.1. Análisis de las imágenes de inmunohistoquímica

Las imágenes obtenidas del escaneo de las muestras procesadas como se ha descrito anteriormente se analizaron mediante el programa de análisis de imagen *Image J (1.48v)*. El análisis, que se detalla a continuación, fue diferente según la proteína y el área cerebral analizadas, pero en cualquier caso equivalente tanto en muestras procedentes de cerebros enteros como de rodajas incubadas ex vivo.

7.1.1. Activación de la microglía (Iba1)

Para analizar la activación de la microglía se cuantificó el perímetro de las células marcadas con anticuerpo contra Iba1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*), una proteína que en el cerebro se expresa específicamente en la microglía. El perímetro es menor en el caso de la microglía activada, que adopta una forma más ameboide, pues disminuyen el tamaño y el número de ramificaciones. Además, en el caso de las inmunohistoquímicas realizadas sobre cortes incubados previamente ex

MATERIALES Y MÉTODOS

vivo, se analizó también el área de la microglía, que es igualmente una medida de su activación.

En los experimentos *in vivo* (cerebros procedentes de ratas con mini-bombas osmóticas) se cuantificaron fotos de un mínimo de 10 campos (56X) por animal para cada una de las regiones estudiadas, analizándose un total de 4 ratas por grupo. Por su parte, en los experimentos *ex vivo* (rodajas de hipocampo procedentes de incubación *ex vivo*), se cuantificaron al menos 10 campos (56x) por rodaja, analizándose al menos 5 rodajas por grupo. A continuación, en ambos casos, las imágenes fueron analizadas con el programa de análisis de imagen *Image J (1.48v)*.

Las imágenes se filtraron antes de cuantificarlas para eliminar ruido de fondo o marcas de otros planos de corte. Para ello se convirtieron las imágenes a un formato de 8 Bits y se aplicó la función *Autolocal threshold*. A continuación, se eligió el método de análisis que más se ajustaba a nuestra inmunohistoquímica, el método Bernsen. Luego, con el filtro de tamaño (3000 – 20000 píxeles), se eliminan las marcas correspondientes a ruido de fondo o a ramificaciones de microglía de otros planos. Para garantizar que todas las marcas que había generado el filtro correspondían únicamente a microglía, todas las fotos fueron revisadas y eliminadas todas aquellas señales que, estando dentro del intervalo de tamaño, correspondían a ruido de fondo u otro tipo de célula. Finalmente, los datos de perímetro y/o área obtenidos fueron convertidos a unidades de μm o μm^2 , puesto que el programa genera los datos en unidades de píxeles. Para el análisis estadístico, se promediaron las medias de los datos obtenidos para cada una de las fotos.

7.1.2. Contenido de IL-1 β por inmunohistoquímica.

Para el análisis del contenido de IL-1 β en cerebros procedentes de ratas con mini-bombas osmóticas implantadas, el tipo de análisis dependió de la región cerebral estudiada, pero siempre con el programa *Image J (1.48v)*.

En el hipocampo, la tinción para IL-1 β muestra expresión sobre todo en las neuronas principales del giro dentado y el asta de Ammon. Debido a la gran densidad celular existente en estas regiones, resulta poco preciso cuantificar número de células marcadas y, por ello, se cuantificó la intensidad de gris del área marcada. Se analizaron fotos de al menos 6 campos (40X) por rata, analizándose 4 animales por grupo. La intensidad de gris de la marca fue cuantificada usando la función *ROI manager* del *Image J (1.48v)*. La región CA1 fue seleccionada manualmente, cuantificando los

MATERIALES Y MÉTODOS

valores medios de intensidad de gris y expresando lo resultados como porcentaje del grupo control tratado con vehículo.

En las distintas áreas de corteza: perirrinal, postrrinal y prefrontal prelímbica, se cuantificaron al menos 10 campos (40X) por animal y por área, analizándose 4 animales por grupo. Se cuantificó manualmente el número total de células que eran positivas para IL-1 β y los resultados se expresaron como el número de células por unidad de superficie (mm²). Finalmente, para el análisis estadístico, se tomó el valor de células por mm² de todas las fotos sacadas a cada área y animal.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. EFECTOS DEL BLOQUEO IN VIVO DEL RECEPTOR DE IL-1 SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN, LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE RECEPTORES Y LAS ALTERACIONES COGNITIVAS EN RATAS HIPERAMONÉMICAS.

La neuroinflamación inducida por la hiperamonemia no es un proceso homogéneo, sino que distintas citocinas inducen diferentes tipos de alteraciones cognitivas en ratas hiperamonémicas (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a). Por ello, y con el fin de esclarecer en detalle el papel concreto de la IL-1 β en este proceso, se realizaron experimentos *in vivo* de administración crónica del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) en ratas hiperamonémicas. Se analizó la función cognitiva utilizando test que evalúan distintos tipos de memoria, así como los niveles de IL-1 β , la activación de la microglía y la expresión en membrana de distintas subunidades de los receptores AMPA, NMDA y GABA_A en distintas áreas cerebrales.

1.1. La hiperamonemia altera tanto la memoria espacial de referencia como la de trabajo en el laberinto radial. El bloqueo in vivo del receptor de IL-1 restaura únicamente la memoria de trabajo.

En el laberinto radial de 8 brazos realizamos un test que permite analizar la memoria y el aprendizaje espacial de las ratas. En concreto, cuantificamos tres parámetros. El primero es la memoria espacial de referencia, que se mide contando como errores de memoria de referencia las entradas del animal en brazos que no contienen comida. El segundo, relacionado con el anterior, es el índice de aprendizaje espacial, que se extrae simplemente de restar estos errores al número total de aciertos, es decir, de entradas en brazos con comida. Y el tercer parámetro es la memoria espacial de trabajo, que medimos contando como errores de memoria de trabajo las entradas en brazos que ya han sido explorados por el animal en un mismo ensayo.

Las ratas hiperamonémicas cometen un mayor número de errores de memoria de trabajo que las controles (36 \pm 3 y 22 \pm 2 errores respectivamente, $p < 0.001$). El tratamiento intracerebral crónico con el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) normaliza la memoria de trabajo de las ratas hiperamonémicas, reduciendo el número de errores a 24 \pm 3 ($p < 0.05$); pero aumenta el número de errores en las ratas control (33 \pm 2, $p < 0.0001$) (Fig. 9A).

En cuanto a la memoria de referencia, el número errores es también mayor en las ratas hiperamonémicas que en las control (70 \pm 3 y 60 \pm 2 respectivamente, $p < 0.05$) y no disminuye con el tratamiento con IL-1Ra (73 \pm 4, $p < 0.05$). Además, el tratamiento aumenta los errores de referencia en las ratas control (73 \pm 3, $p < 0.05$) (Fig. 9B).

RESULTADOS

Como se muestra en la figura 9C, todos los grupos experimentales aumentaron su índice de aprendizaje a lo largo de los 6 días que duró el test. Sin embargo, el índice de aprendizaje de las ratas hiperamonémicas se mantuvo por debajo del de las control, especialmente a partir del tercer día, e independientemente de si fueron tratadas con IL-1Ra o con el vehículo. El análisis estadístico muestra un efecto global significativo de la hiperamonemia.

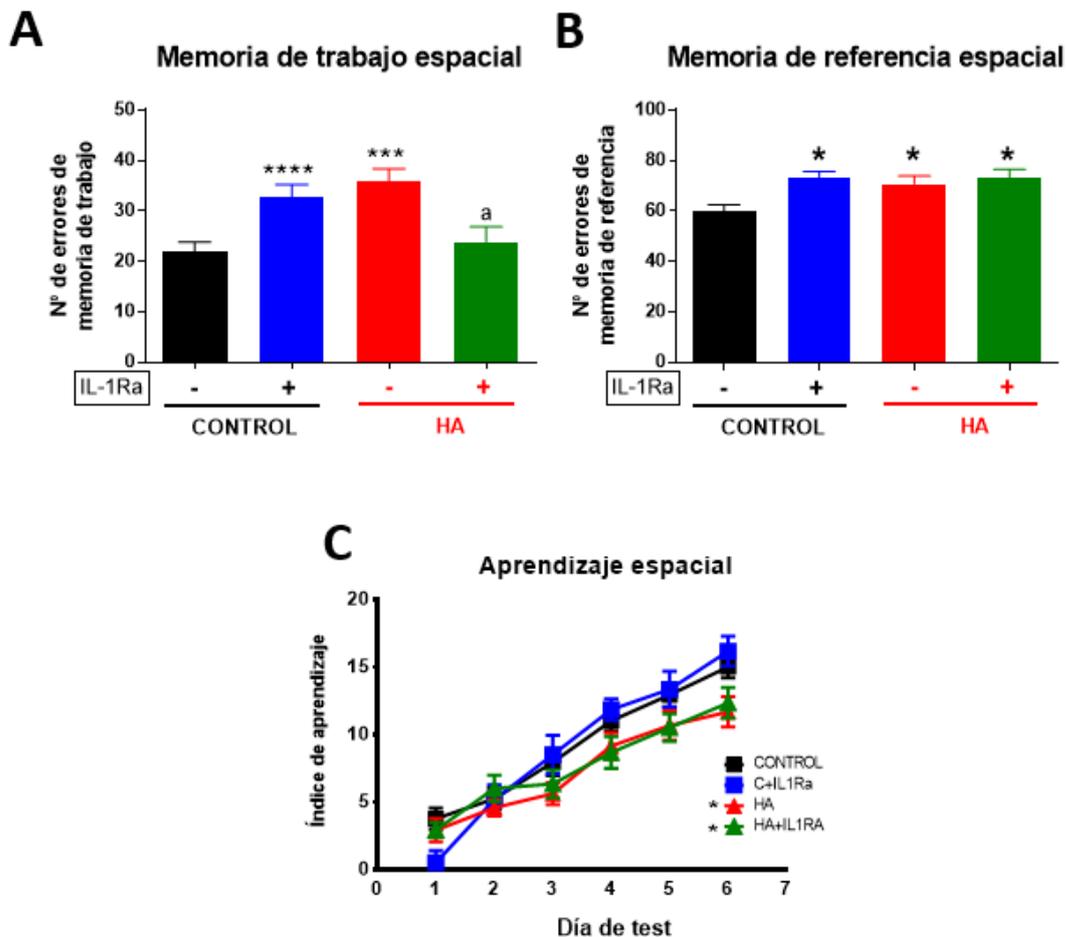


Figura 9. La hiperamonemia altera el aprendizaje espacial, la memoria de referencia y la memoria de trabajo en el laberinto radial. El bloqueo crónico del receptor de IL-1 restaura únicamente la memoria de trabajo. Se evaluó, en ratas hiperamonémicas tratadas con el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) o con su vehículo, la memoria de trabajo (A), de referencia (B) y el aprendizaje espacial (C) en el laberinto radial de ocho brazos. Los valores son la media \pm SEM (error estándar de la media) de 15-16 ratas por grupo en A, B, C; habiéndose analizado el número de errores de memoria de trabajo (entradas a un brazo ya visitado en un mismo intento) (A), el número de errores de memoria de referencia (entradas a un brazo sin comida) (B), el índice de aprendizaje espacial (C). En A y B los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Sidak. Los valores significativamente diferentes de las ratas control tratadas con el vehículo se indican con un asterisco y los diferentes de las ratas hiperamonémicas tratadas con el vehículo se indican con "a" (* p <0.05, *** p <0.001, **** p <0.0001, ^a p <0.05, ^{aa} p <0.01). En C los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías de medidas repetidas y un test post hoc de Bonferroni. $F(5, 275) = 97,1$ para el efecto del grupo experimental, p <0,0001; $F(3, 55) = 1,779$ para el efecto del entrenamiento, $p=0,1619$; $F(15, 275) = 1,086$ para la interacción grupo-entrenamiento, $p=0,3694$; y $F(55, 275) = 4,551$ para la variación entre animales, p <0,0001. No se encontraron efectos significativos entre grupos en el post hoc test de Bonferroni.

RESULTADOS

1.2. La hiperamonemia altera la memoria de reconocimiento de estímulos nuevos, ya sean objetos o localizaciones espaciales. El bloqueo del receptor de IL-1 mejora únicamente el reconocimiento de objetos nuevos.

Otro tipo de memoria es la de reconocimiento, que consiste en la capacidad para diferenciar un estímulo novedoso de otro familiar que ya se ha percibido con anterioridad. Para evaluar la memoria de reconocimiento en ratas nos basamos en la tendencia innata a la exploración y la atracción por estímulos novedosos que presentan las ratas y roedores en general. Dicho instinto las impulsa explorar durante más tiempo un estímulo novedoso que otro que ya conocen.

Analizamos, por un lado, la capacidad para diferenciar un objeto nuevo de otro presentado con anterioridad (*Novel Object Recognition*, NOR), definiéndose el ratio de discriminación como el cociente entre la resta del tiempo de exploración del objeto nuevo y el del objeto conocido dividida por el tiempo total de exploración. Y, por otro lado, analizamos también la capacidad para identificar el cambio de localización espacial de un objeto (*Novel Object Location*, NOL), siendo el ratio de discriminación el cociente entre la resta del tiempo de exploración del objeto que cambia de posición y el del objeto que permanece en su posición inicial dividida por el tiempo total de exploración.

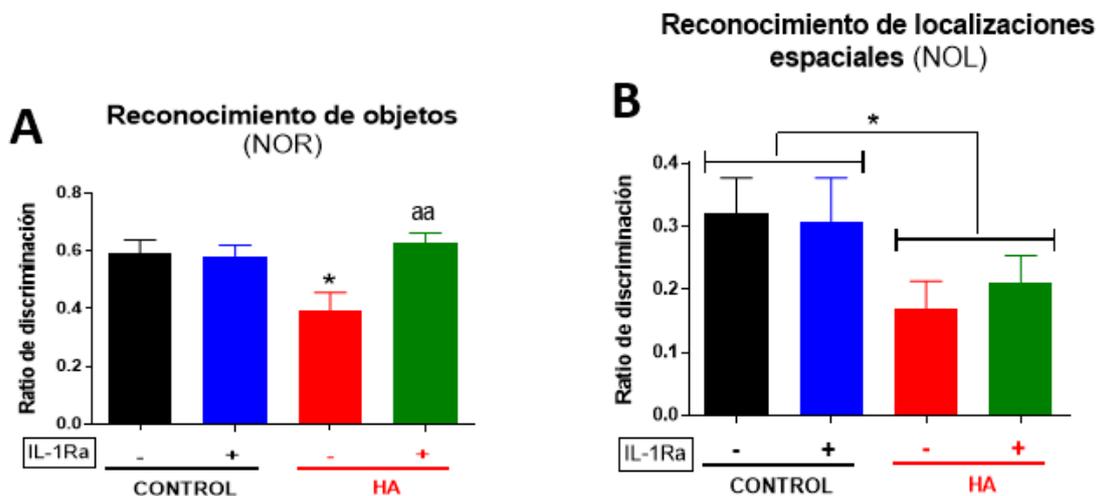


Figura 10. La hiperamonemia altera tanto la memoria de reconocimiento de objetos como de localizaciones espaciales, pero el bloqueo del receptor de IL-1 restaura únicamente el reconocimiento de objetos. Se evaluó, en ratas hiperamonémicas tratadas con el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) o con su vehículo, la memoria de reconocimiento de objetos (NOR) (A) y localizaciones espaciales (NOL) (B). Los valores son la media \pm SEM de 6-8 ratas por grupo en A y B; habiéndose analizado el ratio de discriminación del NOR a 6h durante la fase de test (A) y el ratio de discriminación del NOL a 2h durante la fase de test (B). Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Sidak. Los valores significativamente diferentes de las ratas control tratadas con el vehículo se indican con un asterisco y los diferentes de las ratas hiperamonémicas tratadas con el vehículo se indican con "a" (* p <0.05, *** p <0.001, **** p <0.0001, ^a p <0.05, ^{aa} p <0.01).

En el NOR, las ratas hiperamonémicas obtienen ratios de discriminación más bajos que las controles (0.39 ± 0.06 y 0.59 ± 0.04 respectivamente, $p<0.05$). El tratamiento crónico con IL-1Ra restaura la capacidad de las ratas hiperamonémicas para distinguir el objeto nuevo, equiparando su ratio de discriminación al de las ratas control (0.63 ± 0.03 , $p<0.01$) (Fig. 10A).

En cuanto al NOL, como se muestra en la figura 10B, la hiperamonemia disminuye el ratio de discriminación con independencia de si las ratas son tratadas con IL-1Ra o con el vehículo. Por tanto, en el NOL hay un efecto global de la hiperamonemia que no se revierte bloqueando el receptor de IL-1.

1.3. La hiperamonemia induce activación de la microglía en el hipocampo y las cortezas perirrinal, postrrinal y prefrontal. El bloqueo del receptor de IL-1 reduce esta activación de la microglía en todas las áreas estudiadas excepto la corteza postrrinal.

Las células microgliales son los macrófagos residentes del sistema nervioso central y son uno de los tipos celulares más importantes en la neuroinflamación (Bentivoglio *et al.*, 2011). En su estado de reposo presentan numerosas prolongaciones y ramificaciones que, cuando se activan, tienen a desaparecer proporcionándoles una forma ameboide. Por ello, con frecuencia se emplea el perímetro como medida de la activación de la microglía, ya que, al activarse y adoptar una forma menos ramificada, éste disminuye.

Por ello, en esta tesis se analizó la activación de la microglía mediante inmunohistoquímica, midiendo el perímetro de las células marcadas con un anticuerpo contra IBA-1 (*Ionized calcium-Binding Adapter molecule 1*), una proteína específica en cerebro de este tipo celular (Fig. 11).

Los resultados muestran que la hiperamonemia induce activación de la microglía, reduciendo su perímetro en hipocampo (344 ± 13 μm respecto a 491 ± 30 μm en ratas control, $p<0.0001$), corteza prefrontal (178 ± 3 μm respecto a 209 ± 5 μm en ratas control, $p<0.001$), corteza perirrinal (115 ± 4 μm respecto a 198 ± 11 μm en ratas control, $p<0.0001$) y corteza postrrinal (167 ± 6 μm respecto a 195 ± 7 en ratas control, $p<0.05$) (Fig. 12 A-D).

RESULTADOS

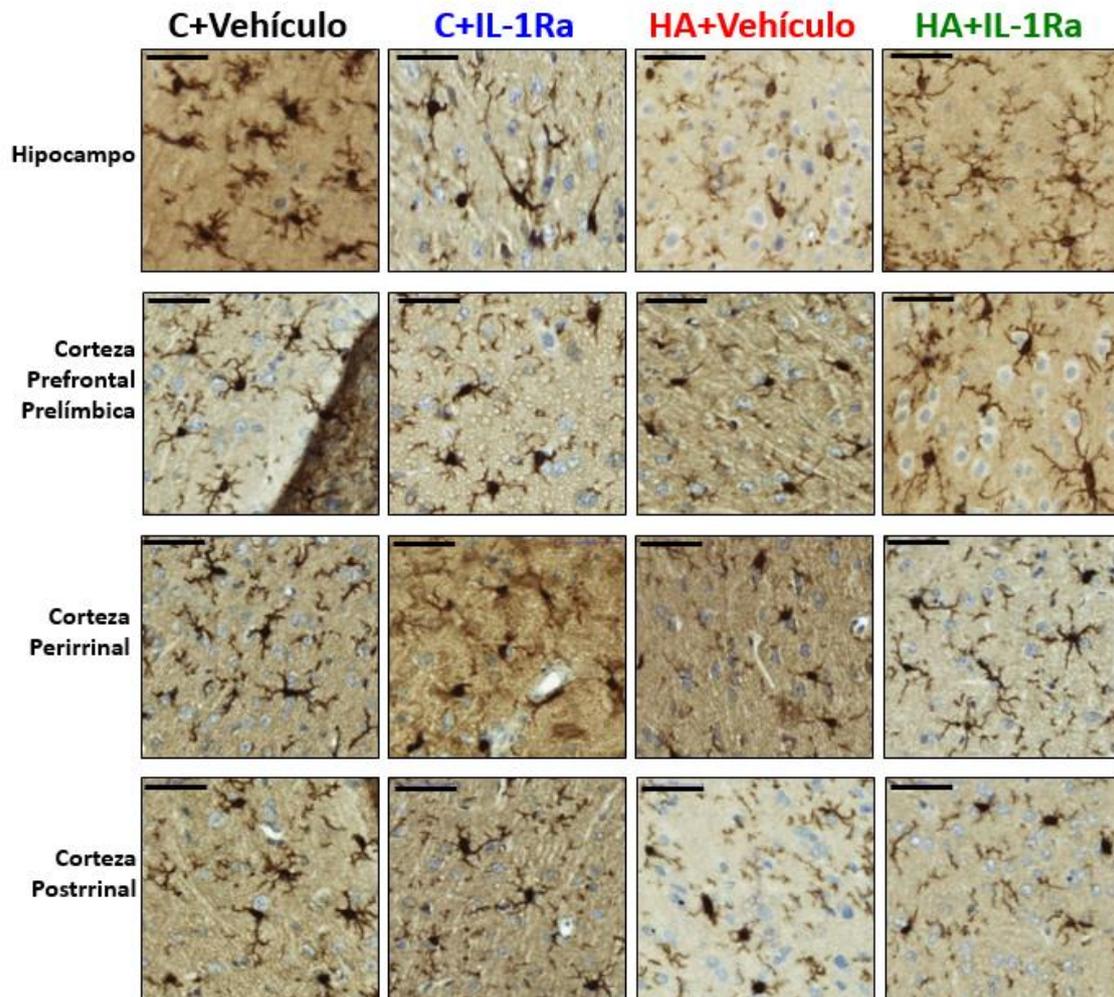


Figura 11. La hiperamonemia induce activación de la microglía en el hipocampo y las cortezas prefrontal prelímbica, perirrinal y postrrinal. El tratamiento con IL-1Ra revierte dicha activación en la mayoría, pero no en todas las áreas analizadas. Se llevaron a cabo, siguiendo el proceso descrito en Materiales y Métodos, inmunohistoquímicas contra Iba1 para marcar la microglía con DAB en cortes de cerebros de ratas controles (C) e hiperamonémicas (HA) tratadas con IL-1Ra o con su vehículo. Se muestran imágenes representativas de las mismas, donde la escala mostrada es de 50µm de longitud. En las ratas hiperamonémicas, la morfología de la microglía es más ameboide, lo cual indica activación. El tratamiento con IL-1Ra reduce dicha activación en todas las áreas analizadas excepto en corteza postrrinal.

El tratamiento crónico con IL-1Ra consigue revertir la activación de la microglía inducida por la hiperamonemia, aumentando su perímetro en hipocampo ($449 \pm 35 \mu\text{m}$, $p < 0.05$), corteza prefrontal ($197 \pm 6 \mu\text{m}$, $p < 0.05$) y corteza perirrinal ($202 \pm 8 \mu\text{m}$, $p < 0.0001$) (Fig. 12 A-C), pero no en corteza postrrinal ($159 \pm 9 \mu\text{m}$, $p < 0.01$) (Fig. 12D).

En las ratas control tratadas con IL-1Ra disminuye el perímetro de la microglía respecto a las tratadas con el vehículo en el hipocampo ($331 \pm 16 \mu\text{m}$, $p < 0.001$) y la corteza prefrontal ($190 \pm 6 \mu\text{m}$, $p < 0.05$) (Fig. 12 A-B), pero no en la corteza perirrinal ni postrrinal (Fig. 12 C-D).

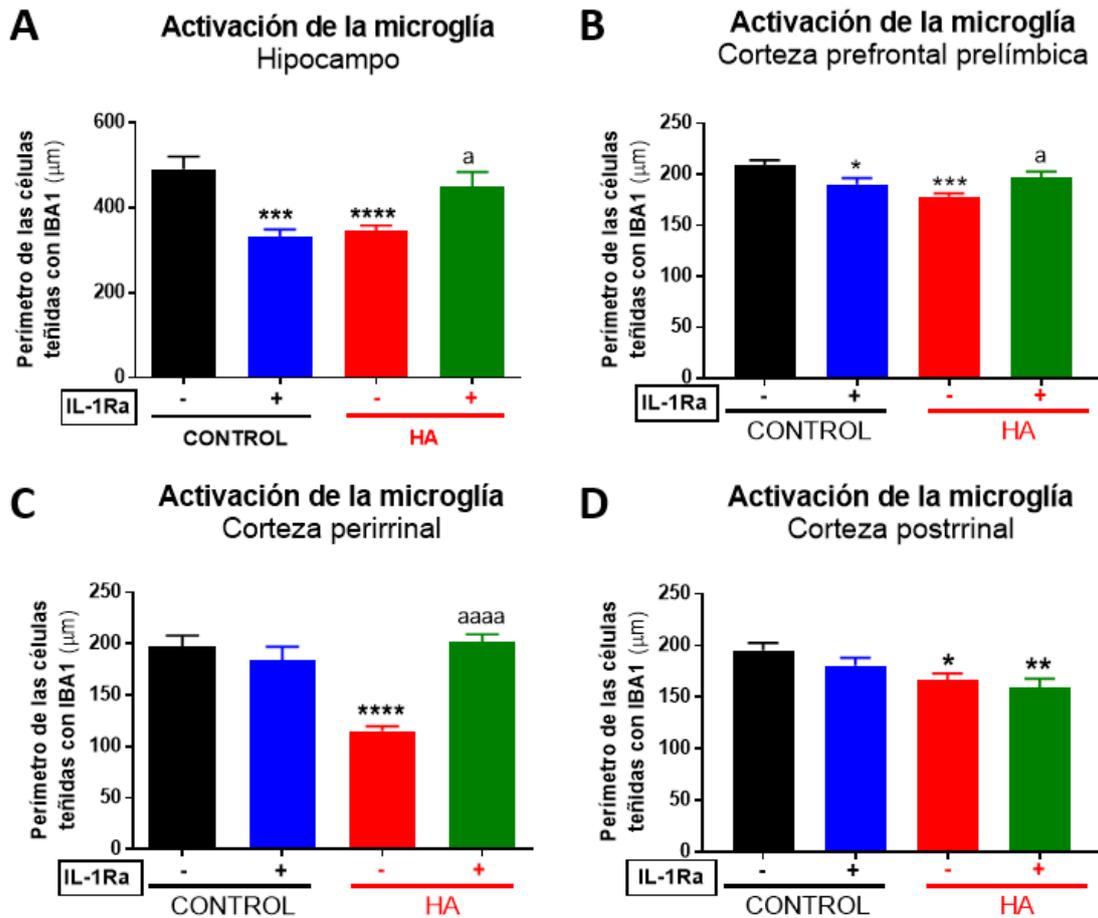


Figura 12. El bloqueo del receptor de IL-1 revierte la activación de la microglía en el hipocampo y las cortezas prefrontal y perirrinal de las ratas hiperamonémicas, pero no en la corteza postrrinal. Analizada mediante la medida del perímetro celular, se observa activación de la microglía en el hipocampo (A), la corteza prefrontal prelímbica (B), la corteza perirrinal (C) y la corteza postrrinal (D) de las ratas hiperamonémicas. El tratamiento con IL-1Ra revierte dicha activación en el hipocampo y las cortezas prefrontal y perirrinal, pero no en la corteza postrrinal. La activación de la microglía fue estudiada mediante inmunohistoquímica contra Iba-1 (Figura 8) en ratas control e hiperamonémicas tratadas con IL-1Ra o con su vehículo. Para analizar la activación de la microglía, se midió su perímetro (µm) usando el programa *Image J* como se describe en Materiales y Métodos. Los valores son la media ± SEM del perímetro de toda la microglía presente en al menos 10 campos (56x) por rata y área, siendo analizadas 4 ratas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Sidak. Los valores significativamente diferentes de las ratas control tratadas con el vehículo se indican con un asterisco y los diferentes de las ratas hiperamonémicas tratadas con el vehículo se indican con “a” (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, ^ap<0.05, ^{aaaa}p<0.0001).

1.4. La hiperamonemia aumenta el contenido de IL-1β en hipocampo, corteza prefrontal y corteza perirrinal, pero no en corteza postrrinal.

La IL-1β es una de las principales citocinas proinflamatorias liberada en los procesos neuroinflamatorios (Mendiola y Cardona, 2018) y su importancia en la neuroinflamación y las alteraciones cognitivas inducidas por la hiperamonemia ya ha sido demostrada en trabajos anteriores (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a).

RESULTADOS

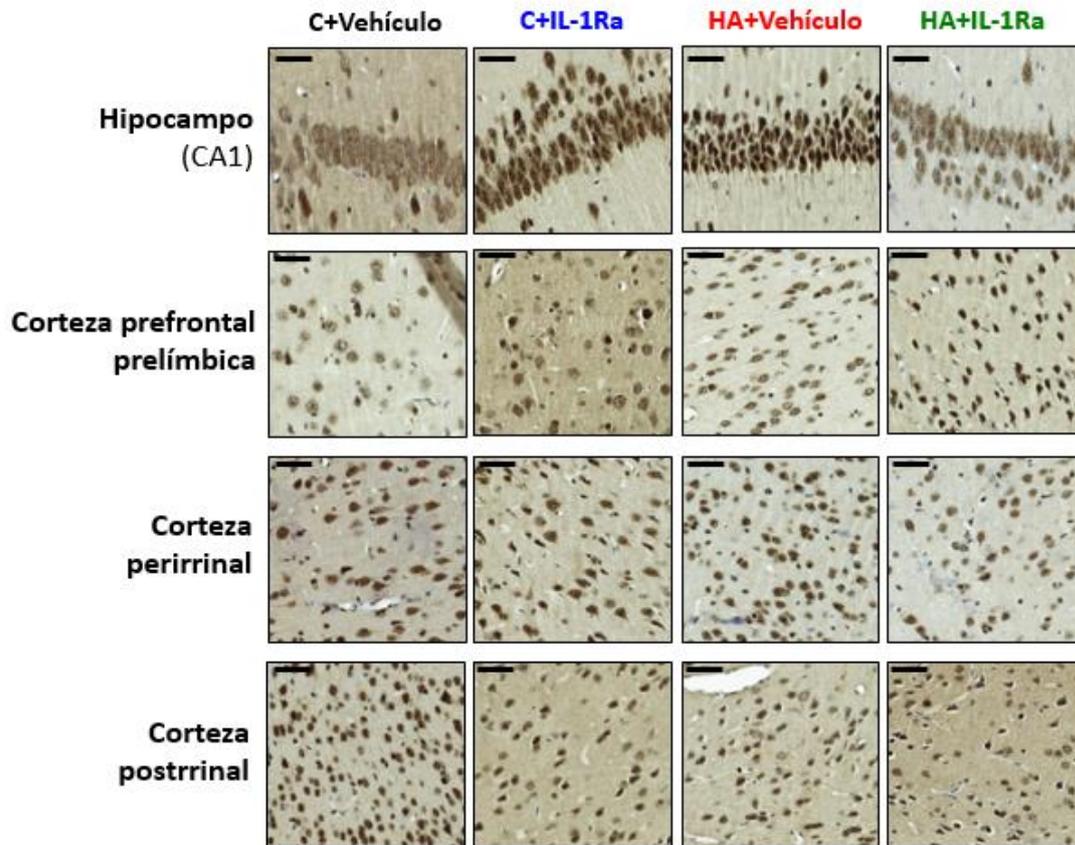


Figura 13. La hiperamonemia aumenta la intensidad de gris de la tinción para IL-1 β en la región CA1 del hipocampo y el número de células positivas para IL-1 β en la corteza prefrontal prelámbica y la corteza perirrinal, pero no en la postrrinal. El tratamiento con IL-1Ra normaliza la intensidad de gris de la tinción para IL-1 β en CA1 y el número de células positivas para IL-1 β en la corteza perirrinal. Se llevaron a cabo, siguiendo el proceso descrito en Materiales y Métodos, inmunohistoquímicas contra IL-1 β con DAB en cortes de cerebros de ratas controles (C) e hiperamonémicas (HA) tratadas con IL-1Ra o con su vehículo. Se muestran imágenes representativas de las mismas, donde la escala mostrada es de 50 μ m de longitud

El contenido total de IL-1 β , cuantificado mediante inmunoblot, está aumentado en homogenados de hipocampo de ratas hiperamonémicas ($141\pm 9\%$ de las ratas control, $p < 0.01$) y bloqueo del receptor de IL-1 mediante el tratamiento con IL-1Ra lo normaliza (97 ± 12 de las ratas control, $p < 0.01$) (Fig. 14A).

En el hipocampo, la inmunohistoquímica para IL-1 β muestra una expresión muy prominente en las neuronas principales de CA1. Debido a la gran densidad celular existente en esa zona, resulta poco preciso contar el número de células, por lo que la expresión de IL-1 β se analizó midiendo la intensidad de gris de la tinción (Fig. 13 CA1). La hiperamonemia aumenta esta intensidad de gris de la tinción para IL-1 β en las células de CA1 ($107\pm 2\%$ de las ratas control, $p < 0.0001$) (Fig. 14B).

Por otro lado, en la corteza cerebral la IL-1 β muestra una expresión más dispersa, quizás debido a que la densidad neuronal es menor (Fig. 13), por lo que en corteza prefrontal prelámbica, perirrinal y postrrinal se cuantificó el número de células

RESULTADOS

positivas. La hiperamonemia aumenta el número de células positivas para IL-1 β en corteza prefrontal prelámbica (1317 \pm 15 células/mm² respecto a 1229 \pm 24 células/mm² en ratas control, $p < 0.01$) y corteza perirrinal (1554 \pm 53 células/mm² respecto a 1346 \pm 28 células/mm² en ratas control, $p < 0.01$) pero no en corteza postrrinal (1428 \pm 25 células/mm² respecto a 1506 \pm 32 células/mm² en ratas control, $p > 0.05$) (Fig. 14 B-D).

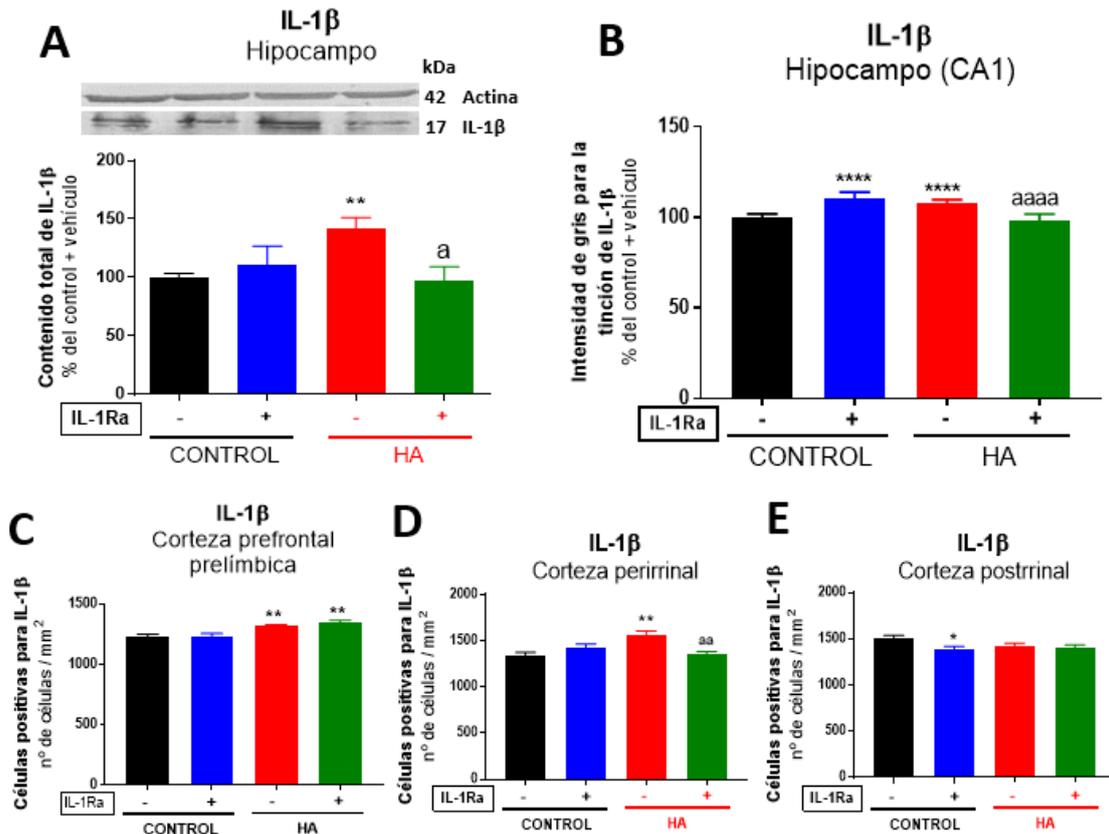


Figura 14. La hiperamonemia aumenta el contenido de IL-1 β en el hipocampo, la corteza prefrontal y la corteza perirrinal, pero no en la postrrinal. La hiperamonemia aumenta el contenido total de IL-1 β , analizado por inmunoblot, en el hipocampo (A), de lo cual se muestran imágenes de bandas representativas. También aumenta la intensidad de gris de la tinción para IL-1 β , analizada por inmunohistoquímica, en la región CA1 del hipocampo (B). Además, también aumenta el número de células positivas para IL-1 β en la corteza prefrontal prelámbica (C) y corteza perirrinal (D) pero no en la postrrinal (E). El tratamiento con IL-1Ra en ratas hiperamonémicas revierte el aumento tanto del contenido total y la intensidad de gris de la tinción para IL-1 β en el hipocampo como del número de células positivas para IL-1 β en la corteza perirrinal (A, B, D). En A los valores son el porcentaje que representa la media \pm SEM de la intensidad de la banda de IL-1 β , en homogenados de hipocampo, de cada grupo respecto a las ratas control tratadas con vehículo. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Bonferroni. En B los valores son el porcentaje que representa la media \pm SEM de la intensidad de gris del marcaje para IL-1 β en CA1 de cada grupo respecto a las ratas control tratadas con vehículo. Se cuantificaron al menos 6 campos (40x) por rata, examinándose muestras de 4 ratas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Tukey. En C, D y E los valores son la media \pm SEM del número de células positivas para IL-1 β por milímetro cuadrado en al menos 10 campos (40x) por área y rata, examinándose muestras de 4 ratas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Sidak. Los valores significativamente diferentes de las ratas control tratadas con el vehículo se indican con un asterisco y los diferentes de las ratas hiperamonémicas tratadas con el vehículo se indican con "a" (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, ^a $p < 0.05$, ^{aa} $p < 0.01$, ^{aaaa} $p < 0.0001$).

RESULTADOS

El tratamiento con IL-1Ra en ratas hiperamonémicas normaliza tanto la intensidad de gris de la tinción para IL-1 β en CA1 (98 \pm 3% de las ratas control, $p < 0.0001$) (Fig. 14B) como el número de células positivas en corteza perirrinial (1351 \pm 33 células/mm², $p < 0.01$) (Fig. 14C), pero no afecta a la corteza prefrontal prelímbica (1349 \pm 18 células/mm², $p > 0.01$) ni a la corteza postrrinial (1408 \pm 29 células/mm², $p > 0.05$) (Fig. 14 D, E).

En las ratas control, el tratamiento con IL-1Ra aumenta la intensidad de gris de la tinción para IL-1 β en CA1 (111 \pm 3% de las ratas control tratadas con vehículo, $p < 0.0001$) y reduce el número de células positivas en corteza postrrinial (1387 \pm 32 células/mm², $p < 0.05$) (Fig. 14 B, E), pero no afecta a la corteza perirrinial (Fig. 14 D).

1.5. La hiperamonemia altera la expresión en membrana de varias subunidades de los receptores NMDA, AMPA y GABA_A en el hipocampo. El bloqueo del receptor de IL-1 normaliza la expresión en membrana de las subunidades GluN2A del receptor NMDA, GluA1 del receptor AMPA y $\alpha 1$ del receptor GABA_A.

Estudios previos han demostrado que los mecanismos por los cuales la neuroinflamación inducida por la hiperamonemia deteriora la función cognitiva incluyen la alteración en la expresión en membrana de receptores de glutamato y GABA (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a). Por ello, y para concretar el papel de la IL-1 β en dichas alteraciones, se analizó la expresión en membrana de estos receptores mediante el tratamiento de rodajas de hipocampo con el *crosslinker* BS3 y su posterior estudio por inmunoblot.

La hiperamonemia reduce la expresión en membrana de las subunidades GluN1 y GluN2A del receptor NMDA en el hipocampo (50 \pm 9%, $p < 0.01$, y 69 \pm 5%, $p < 0.05$, de las ratas control respectivamente) mientras que aumenta la de GluN2B (132 \pm 10% de las ratas control, $p < 0.05$) (Fig. 15A, B, C). El bloqueo del receptor de IL-1 en ratas hiperamonémicas mediante el tratamiento con IL-1Ra restaura la expresión en membrana de GluN2A (116 \pm 11% de las ratas control, $p < 0.001$) pero no normaliza las de GluN1 ni GluN2B, que permanecen en un 62 \pm 9% ($p < 0.05$) and 137 \pm 11% ($p < 0.05$) de las ratas control respectivamente. El tratamiento con IL-1Ra en las ratas control aumenta la expresión en membrana de GluN2B (136 \pm 9%, $p < 0.05$) pero no afecta a las de GluN1 ni GluN2A (Fig. 15A, B, C).

RESULTADOS

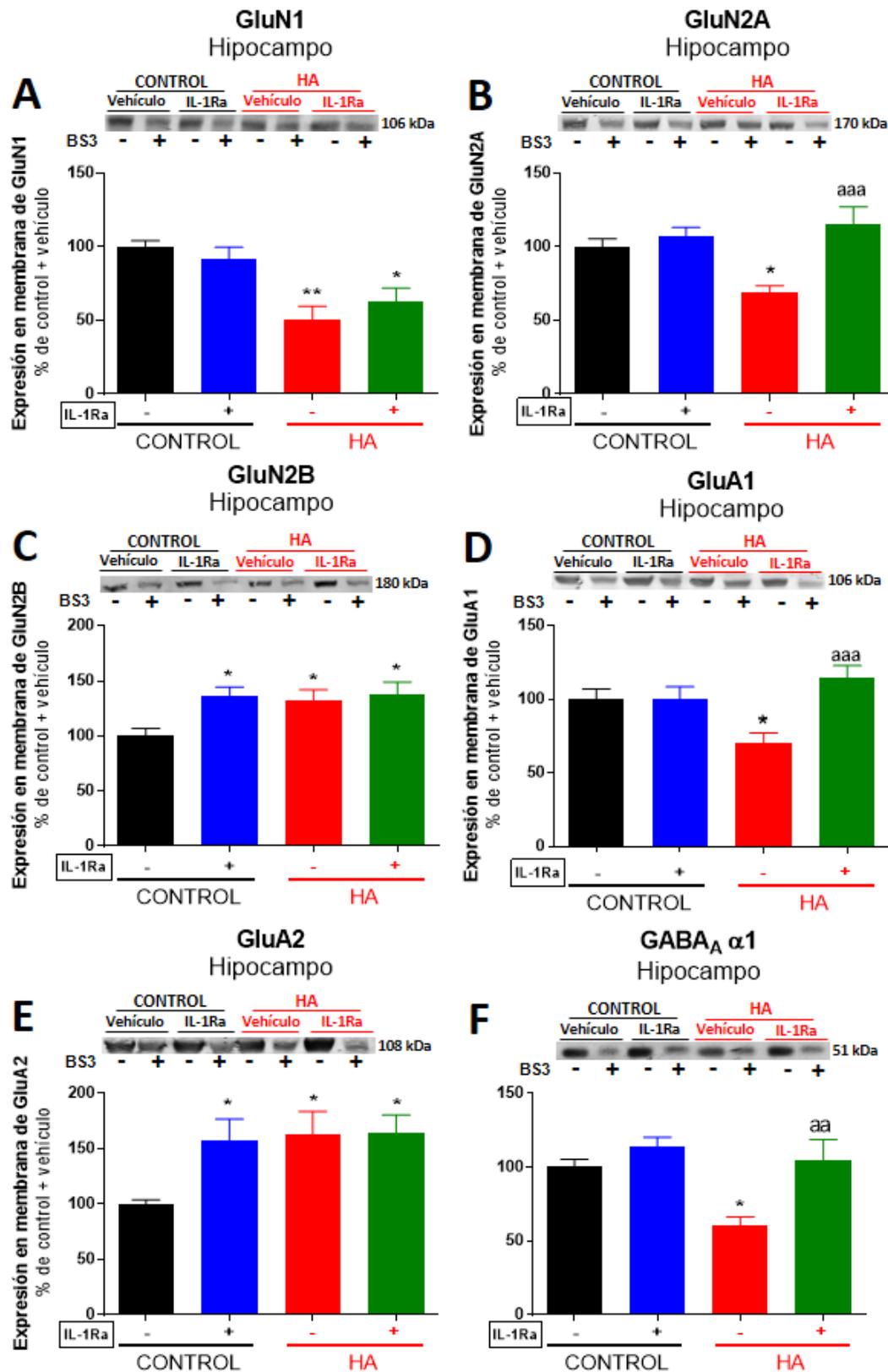


Figura 15. La hiperamonemia disminuye la expresión en membrana de las subunidades GluN1, GluN2A, GluA1 y GABA_A α1 en el hipocampo, mientras que aumenta la de GluN2B y GluA2. El tratamiento con IL-1Ra restaura la expresión en membrana de GluN1, GluN2A, GluA1 y GABA_A α1 en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. Se analizó la expresión en membrana de las subunidades GluN1 (A), GluN2A (B) y GluN2B (C) del receptor NMDA, GluA1 (D) y GluA2 (E) del receptor AMPA y α1 del receptor GABA_A (F) mediante el *crosslinker* BS3, tal y como se describe en Materiales y Métodos, en

RESULTADOS

el hipocampo de ratas control e hiperamonémicas tratadas con IL-1Ra o con su vehículo. Las muestras incubadas en ausencia o presencia de BS3 se sometieron a inmunoblot empleando los anticuerpos contra las subunidades correspondientes. Se muestran imágenes representativas de las bandas, en las que las muestras no tratadas con BS3 (-) representan la cantidad total de proteína en el homogenado y las muestras tratadas con BS3 (+) representan el contenido citosólico de la proteína. Se cuantificó la intensidad de cada banda y se obtuvo la expresión en membrana como la resta de la banda sin BS3 menos la banda con BS3. Los valores se expresan como el porcentaje que representa la media \pm SEM de la intensidad de banda de 11-26 ratas por grupo respecto a las ratas control tratadas con vehículo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes de las ratas control tratadas con el vehículo se indican con un asterisco y los diferentes de las ratas hiperamonémicas tratadas con el vehículo se indican con "a" (* p <0.05, ** p <0.01, ^a p <0.05, ^{aa} p <0.01, ^{aaa} p <0.001).

En cuanto al receptor AMPA, la expresión en membrana de la subunidad GluA1 está disminuida en el hipocampo de las ratas hiperamonémicas ($70\pm 6\%$, p <0.05, de las ratas control), mientras que la de GluA2 está aumentada ($163\pm 21\%$, p <0.05, de las ratas control) (Fig. 15D, E). El tratamiento con IL-1Ra en las ratas hiperamonémicas restaura la expresión en membrana de GluA1 ($113\pm 7\%$ de las ratas control, p <0.001), pero no normaliza la de GluA2, que permanece en un $164\pm 16\%$ (p <0.05) de las ratas control (Fig. 15D, E). En el hipocampo de las ratas control, el tratamiento con IL-1Ra aumenta la expresión en membrana de GluA2 ($156\pm 19\%$ de las control tratadas con el vehículo, p <0.05) pero no afecta a la de GluA1 (Fig. 15D, E).

Finalmente, la hiperamonemia disminuye la expresión en membrana de la subunidad $\alpha 1$ del receptor de GABA_A en el hipocampo ($60\pm 6\%$ de las ratas control, p <0.05), y ésta se normaliza con el tratamiento con IL-1Ra hasta un $105\pm 14\%$ de las control (Fig. 15F).

1.6. La hiperamonemia disminuye la expresión en membrana de las subunidades de los receptores NMDA, AMPA y GABA_A en la corteza prefrontal. El bloqueo del receptor de IL-1 restaura todas estas alteraciones.

La expresión en membrana de receptores se analizó también en rodajas de corteza prefrontal, dada la contribución de esta región a la memoria de trabajo espacial.

El tratamiento crónico con IL-1Ra para bloquear el receptor de IL-1 en las ratas hiperamonémicas restaura la expresión en membrana en corteza prefrontal de las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B del receptor NMDA (devolviéndolas respectivamente a $107\pm 11\%$, $101\pm 12\%$ y $93\pm 8\%$ de las ratas control) así como de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA y $\alpha 1$ del receptor GABA_A (respectivamente a $95\pm 10\%$, $78\pm 6\%$ y $106\pm 10\%$ de las ratas control) (Fig. 16A-F).

RESULTADOS

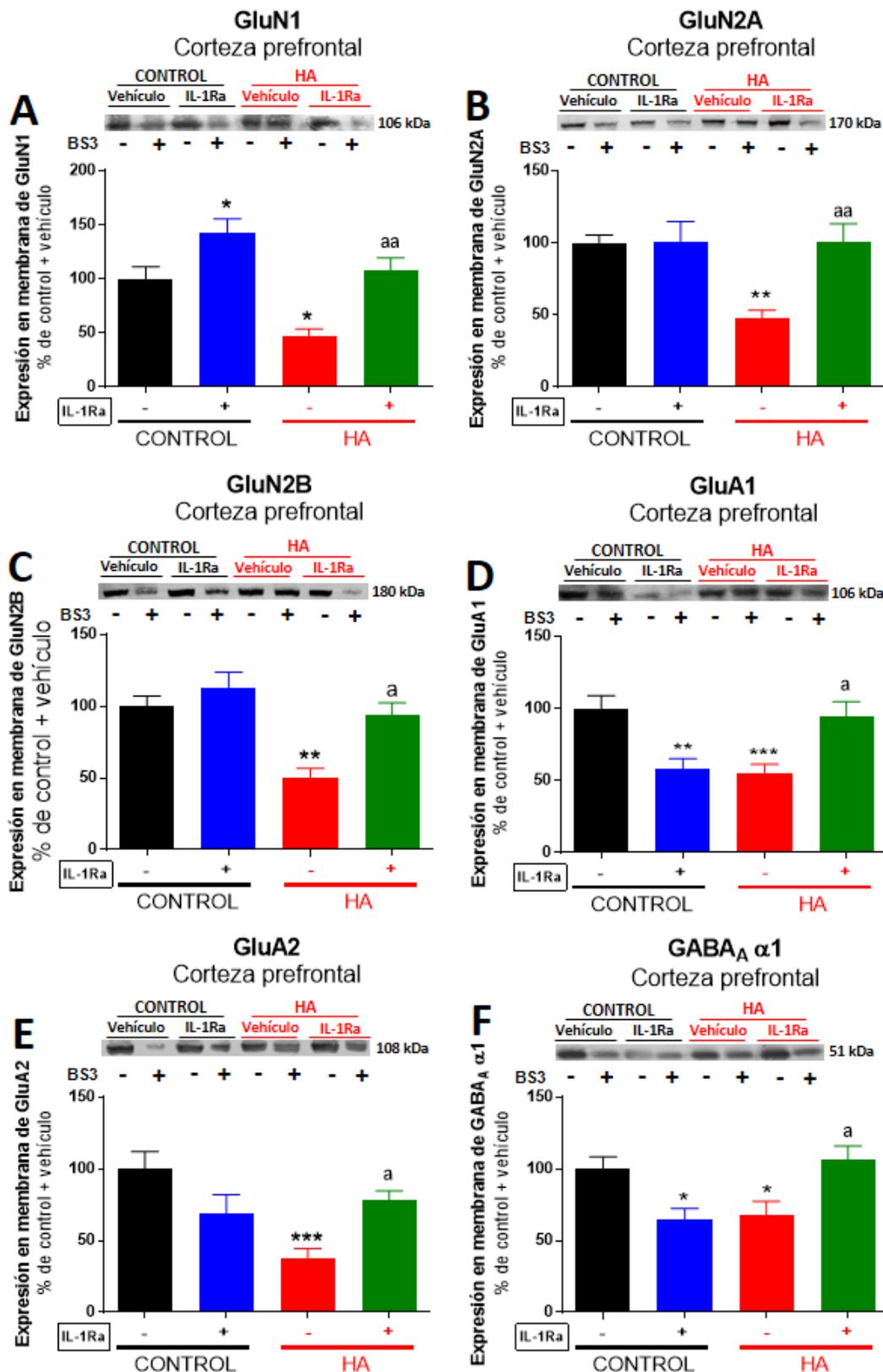


Figura 16. La hiperamonemia disminuye la expresión en membrana de las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B del receptor NMDA, GluA1 y GluA2 del receptor AMPA y $\alpha 1$ del receptor GABA_A en la corteza prefrontal. El bloqueo del receptor de IL-1 restaura la expresión en membrana de todas las subunidades analizadas en la corteza prefrontal de ratas hiperamonémicas. Se analizó la expresión en membrana de las subunidades GluN1 (A), GluN2A (B) y GluN2B (C) del receptor NMDA, GluA1 (D) y GluA2 (E) del receptor AMPA y $\alpha 1$ del receptor GABA_A (F) mediante el *crosslinker* BS3, tal y como se describe en Materiales y Métodos, en la corteza prefrontal de ratas control e hiperamonémicas tratadas

RESULTADOS

con IL-1Ra o con su vehículo. Los valores se expresan como el porcentaje que representa la media \pm SEM de la intensidad de banda de 14-24 ratas por grupo respecto a las ratas control tratadas con vehículo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes de las ratas control tratadas con el vehículo se indican con un asterisco y los diferentes de las ratas hiperamonémicas tratadas con el vehículo se indican con "a" (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, ^a p <0.05, ^{aa} p <0.01).

En las ratas control, el tratamiento con IL-1Ra aumenta la expresión en membrana en corteza prefrontal de la subunidad GluN1 del receptor NMDA ($142\pm 13\%$ de las ratas control tratadas con el vehículo, p <0.05) pero no afecta a las de GluN2A ni GluN2B (Fig. 16 A-C). En cuanto al receptor AMPA, el tratamiento con IL-1Ra disminuye la expresión en membrana de GluA1 en las ratas control ($58\pm 7\%$, p <0.01) pero no afecta a la de GluA2 (Fig. 16 D, E). Finalmente, la expresión en membrana de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A disminuye por el tratamiento con IL-1Ra en ratas control ($65\pm 8\%$, p <0.05) (Fig. 16 F).

Los resultados expuestos en este apartado en cuanto al afecto de la hiperamonemia y el tratamiento con IL-1Ra se resumen de manera esquemática en la figura 17. En las ratas hiperamonémicas, la IL-1 β altera la memoria de trabajo y de reconocimiento de objetos aumentando la activación de la microglía en hipocampo, corteza perirrinal y corteza prefrontal. También altera la expresión en membrana de receptores en hipocampo y corteza prefrontal. Todas estas alteraciones revierten en las ratas hiperamonémicas cuando bloqueamos el receptor de IL-1.

En cambio, el deterioro de la memoria de referencia espacial y el reconocimiento de localizaciones espaciales en hiperamonemia, no estaría mediado por la IL-1 β , dado que ésta no está aumentada en corteza postrrinal y el tratamiento crónico con IL-1Ra no revierte la activación de la microglía en esa región ni el deterioro en este tipo de memoria.

Por otra parte, en las ratas control, el tratamiento con IL-1Ra induce activación de la microglía en hipocampo y PrLC, a la vez que altera tanto la memoria de trabajo espacial como la de referencia y la expresión en membrana de algunos receptores. En concreto, aumenta la expresión en membrana de GluN2B y GluA2 en hipocampo, mientras que en corteza prefrontal aumenta la de GluN1, pero disminuye las de GluA1 y GABA_A $\alpha 1$ (Fig. 18).

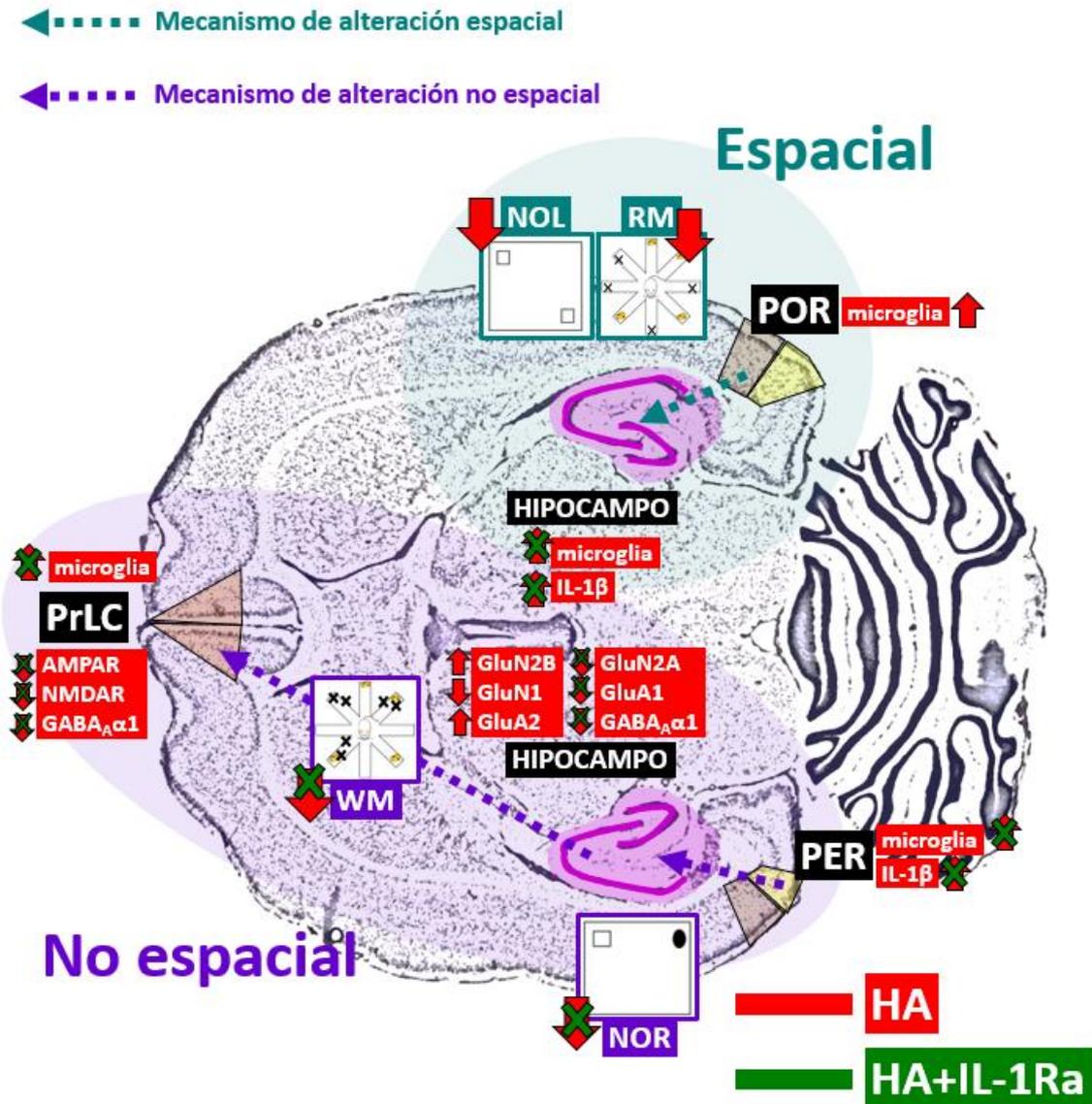


Figura 17. La hiperamonemia desencadena un mecanismo neuroinflamatorio inducido por la IL-1 β que afecta a la memoria de trabajo y la memoria de reconocimiento de objetos y otro proceso, independiente de IL-1 β , que altera la memoria de referencia espacial y de reconocimiento de localizaciones espaciales. El esquema resume los resultados presentados en el apartado 1. La hiperamonemia desencadena dos mecanismos neuroinflamatorios diferentes (en rojo) que alteran de manera independiente la memoria con componente espacial y la que no lo tiene. Por un lado, el aumento de IL-1 β en hipocampo y corteza perirral (PER) induce una activación de la microglía en estas dos regiones, así como en corteza prefrontal prelámbica (PrLC). Esta neuroinflamación altera la expresión en membrana de los receptores NMDA, AMPA y GABA α 1 en hipocampo y corteza prefrontal, alterando la memoria de reconocimiento de objetos (NOR) y la memoria de trabajo (WM). El tratamiento con IL-1Ra (en verde) revierte la activación de la microglía en hipocampo, PER y PrLC y restaura el NOR y la WM.

Por otro lado, la hiperamonemia induce también un mecanismo neuroinflamatorio independiente de IL-1 β que sería el responsable de la activación de la microglía en la corteza postririnal (POR), alterando el procesamiento espacial en la memoria de referencia (RM) y la de reconocimiento de localizaciones espaciales (NOL). El tratamiento con IL-1Ra no consigue revertir la activación de la microglía en POR ni las alteraciones en la RM y el NOL.

RESULTADOS

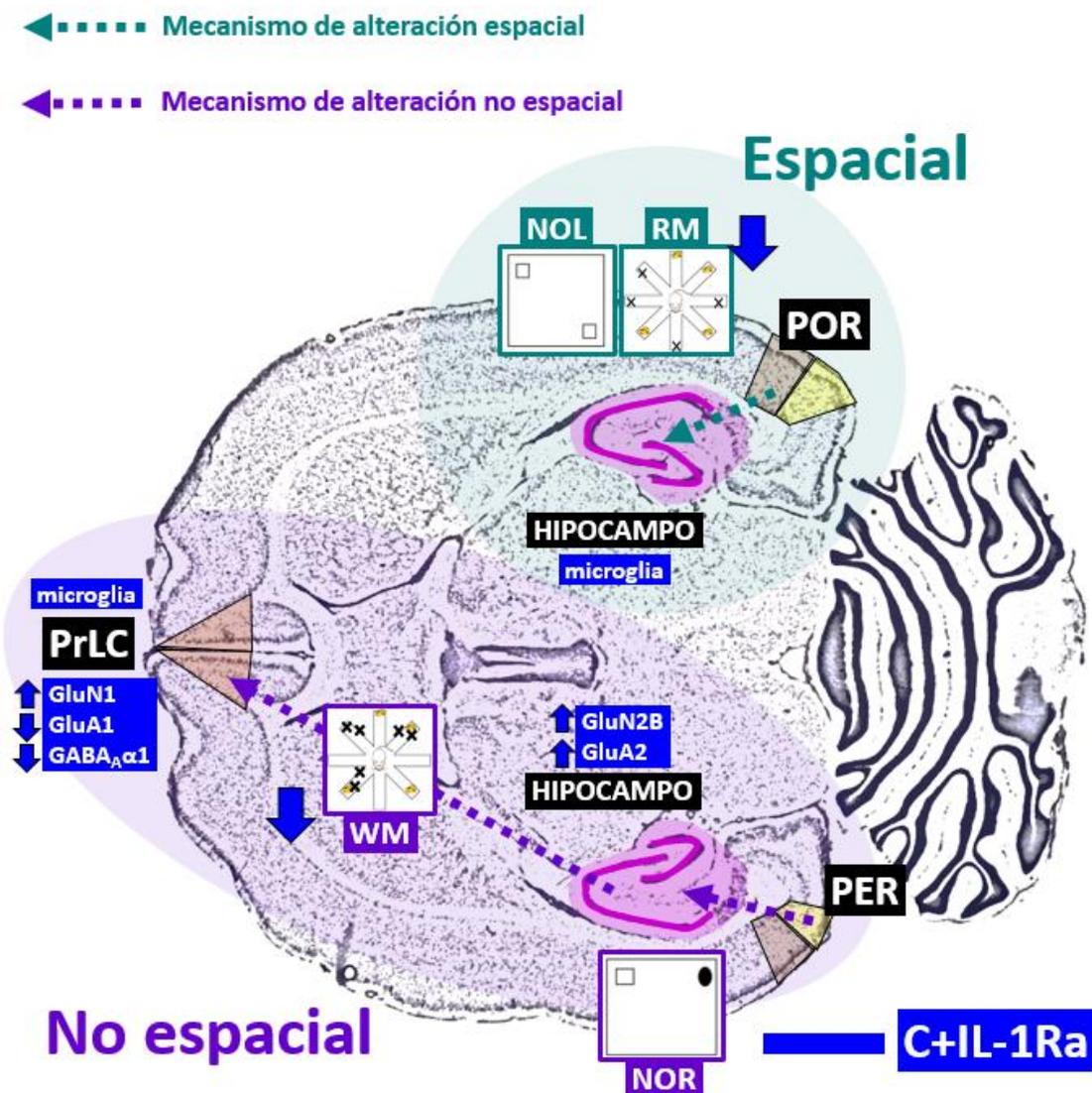


Figura 18. Efectos del tratamiento con IL-1Ra sobre la activación de la microglía, la expresión en membrana de receptores y la memoria espacial de referencia y de trabajo en ratas control.

2. MECANISMOS MOLECULARES DE LAS ALTERACIONES INDUCIDAS POR LA IL-1 β EN LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE RECEPTORES DE GLUTAMATO EN EL HIPOCAMPO DE RATAS HIPERAMONÉMICAS.

Los resultados anteriores, unidos a estudios previos, demuestran que la IL-1 β juega un papel fundamental en algunas de las alteraciones cognitivas causadas por la neuroinflamación en ratas hiperamonémicas. Las alteraciones en la expresión en membrana de receptores de glutamato y GABA inducidas por la IL-1 β podrían contribuir al deterioro de la función cognitiva. Para esclarecer los mecanismos moleculares por los que la IL-1 β altera la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA en el hipocampo de las ratas hiperamonémicas, empleamos un abordaje basado en experimentos *ex vivo* con rodajas frescas de hipocampo y análisis de proteínas por inmunoblot (ver Materiales y Métodos).

2.1. La hiperamonemia altera la expresión en membrana y la fosforilación de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA en hipocampo.

Los resultados *ex vivo* muestran que, en rodajas de hipocampo de ratas hiperamonémicas, la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA está alterada en sentido contrario.

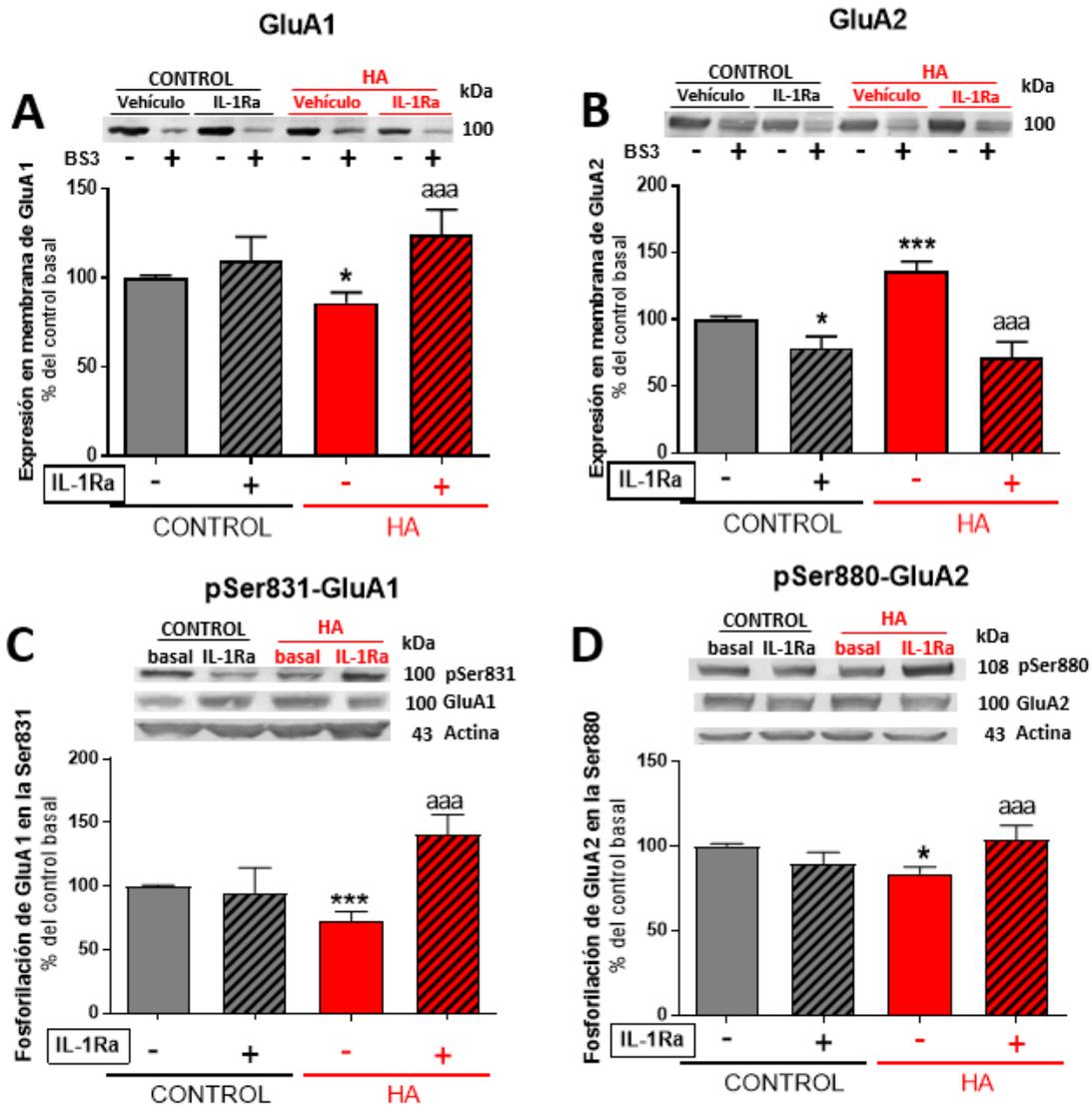


Figura 19. El tratamiento *ex vivo* con IL-1Ra restaura tanto la fosforilación como la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron en presencia o ausencia de IL-1Ra y se analizó mediante inmunoblot, tal y como se describen en Materiales y Métodos, la expresión en membrana de las subunidades GluA1 (A) y GluA2 (B) del receptor AMPA, así como su fosforilación en la Ser831 (C) y la Ser880 (D) respectivamente. Los valores se expresan como el porcentaje que representa la media \pm SEM de la intensidad de banda de 24, 34, 31 y 18 ratas por grupo (en A, B, C y D respectivamente) respecto a las rodajas de ratas control incubadas con tampón Krebs. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Bonferroni. Los valores significativamente diferentes de las rodajas de ratas control tratadas con Krebs se indican con un asterisco y los diferentes de las rodajas de ratas hiperamonémicas tratadas con Krebs se indican con "a" (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{aaa} $p < 0.001$).

RESULTADOS

La expresión en membrana de GluA1 está disminuida ($p < 0.05$) a un $86 \pm 6\%$ del valor de las ratas control (Fig. 19A); mientras que por el contrario la de GluA2 está aumentada en un $136 \pm 7\%$ ($p < 0.001$) (Fig. 16B). Estas alteraciones son similares a las observadas en el hipocampo de ratas hiperamonémicas in vivo (Fig. 15).

La expresión en membrana de GluA1 y GluA2 se modula por cambios en el grado de fosforilación de determinados residuos de estas subunidades. Comprobamos que la fosforilación del residuo Ser831 de GluA1 está disminuida en las ratas hiperamonémicas a un $73 \pm 7\%$ de las control ($p < 0.001$) (Fig. 19C); y la fosforilación del residuo Ser880 de GluA2 también está disminuida, en este caso a un $84 \pm 4\%$ del grado de fosforilación que presenta en las ratas control ($p < 0.05$) (Fig. 19D). Estos cambios podrían explicar las alteraciones en su expresión en membrana (ver Discusión).

2.2. Las alteraciones en la expresión en membrana y fosforilación de GluA1 y GluA2 en el hipocampo de ratas hiperamonémicas están mediadas por una sobreactivación del receptor de IL-1.

Para esclarecer el papel de la IL-1 β en las alteraciones de la expresión en membrana de los receptores AMPA, incubamos las rodajas frescas de hipocampo con IL-1Ra. El tratamiento de las rodajas de hipocampo de ratas hiperamonémicas con IL-1Ra normaliza la expresión en membrana de GluA1 aumentándola hasta un $124 \pm 7\%$ respecto a las ratas control ($p < 0.001$) (Fig. 19A), lo cual va acompañado de un aumento del $140 \pm 16\%$ ($p < 0.001$) en su fosforilación en la Ser831 (Fig. 19C). Por otra parte, el tratamiento con IL-1Ra reduce la expresión en membrana de GluA2 en el hipocampo de ratas hiperamonémicas hasta un $72 \pm 11\%$ ($p < 0.001$) (Fig. 19B) a la vez que normaliza su fosforilación en la Ser880 hasta un $114 \pm 7\%$ ($p < 0.001$) respecto a las ratas control (Fig. 19D).

2.3. Los efectos de la IL-1 β sobre GluA1 y GluA2 están mediados por la activación de la quinasa Src.

A continuación, profundizamos en los mecanismos intracelulares que, tras la activación del receptor de IL-1, conducirían a las alteraciones en la fosforilación y expresión en membrana de GluA1 y GluA2 en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

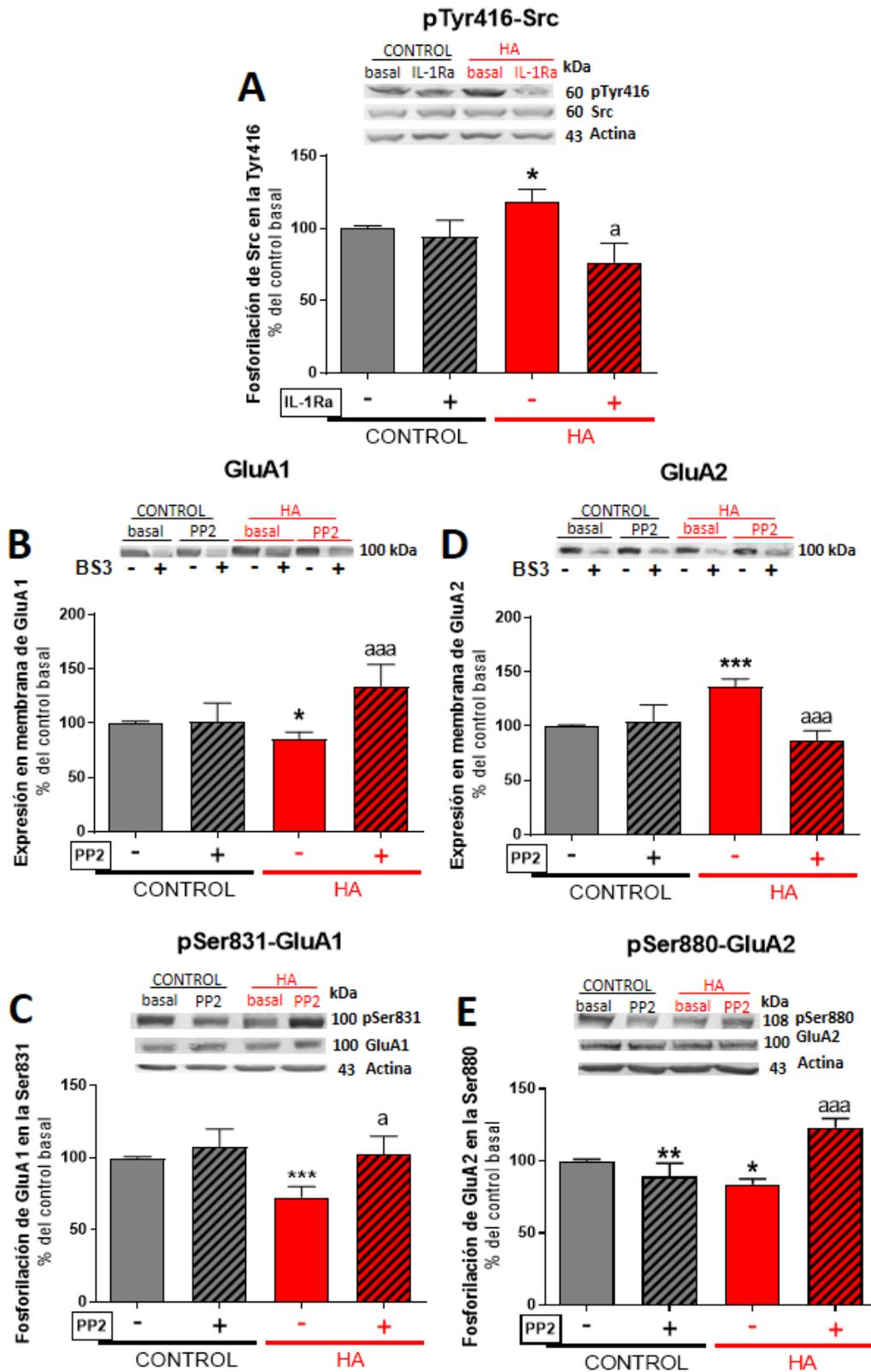


Figura 20. La activación de Src por fosforilación media los efectos de la sobreactivación del receptor de IL-1 sobre la expresión en membrana y la fosforilación de GluA1 y GluA2 en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas fueron incubadas en presencia de IL-1Ra (A) o de PP2 (B-E), un inhibidor de Src, y procesadas luego para analizar la fosforilación de Src en la Tyr416 (A), la expresión en membrana de las subunidades GluA1 (B) y GluA2 (D) del receptor AMPA y su fosforilación en la Ser831 (C) y la Ser880 (E) respectivamente. Los valores se expresan como el porcentaje que representa la media \pm SEM de la intensidad de banda de 24, 22, 33, 32 y 18 ratas por grupo (en A, B, C, D y E respectivamente) respecto a las ratas control tratadas

RESULTADOS

basalmente con Krebs. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Bonferroni. Los valores significativamente diferentes de las rodajas de ratas control tratadas con Krebs se indican con un asterisco y los diferentes de las rodajas de ratas hiperamonémicas tratadas con Krebs se indican con "a" (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ^a $p < 0.05$, ^{aaa} $p < 0.001$).

Como a menudo la activación del receptor de IL-1 induce la fosforilación y activación de la tirosín-quinasa Src (Viviani *et al.*, 2006), decidimos averiguar si ésta se encontraba alterada en nuestro modelo. La fosforilación de Src en el residuo Tyr416 está aumentada en el hipocampo de las ratas hiperamonémicas hasta un $118 \pm 8\%$ de las control ($p < 0.05$) y el bloqueo del receptor de IL-1 tratando las rodajas con IL-1Ra revierte este aumento, devolviéndola a niveles de $77 \pm 13\%$ ($p < 0.05$) respecto a las rodajas de ratas control (Fig. 20A).

Para averiguar si esta sobreactivación de Src está mediando las alteraciones en GluA1 y GluA2, las rodajas se incubaron con un inhibidor de dicha quinasa, PP2. El tratamiento con el inhibidor de Src normaliza la expresión en membrana de GluA1 en el hipocampo de ratas hiperamonémicas aumentándola hasta un $134 \pm 20\%$ ($p < 0.001$) (Fig. 20B), a la vez que restaura su fosforilación en la Ser831 hasta un $103 \pm 13\%$ de las ratas control ($p < 0.05$) (Fig. 20C). Por otra parte, el tratamiento con el inhibidor de Src reduce la expresión en membrana de GluA2 hasta un $87 \pm 8\%$ ($p < 0.001$) (Fig. 20D) y aumenta su fosforilación en la Ser880 hasta un $123 \pm 7\%$ ($p < 0.001$) (Fig. 20E) en el hipocampo de ratas hiperamonémicas respecto a las ratas control.

2.4. GluN2B y p38 median los efectos de IL-1 β y Src sobre GluA2 pero no sobre GluA1.

La quinasa Src aumenta la expresión en membrana de GluN2B mediante su fosforilación en el residuo Tyr1472 (Viviani *et al.*, 2006). En el hipocampo de ratas hiperamonémicas la fosforilación de GluN2B en la Tyr1472 está aumentada hasta un $122 \pm 10\%$ ($p < 0.05$) (Fig. 21A) y también su expresión en membrana, que alcanza un $151 \pm 10\%$ respecto a las ratas control ($p < 0.001$) (Fig. 21B). Si bloqueamos el receptor de IL-1 incubando las rodajas con IL-1Ra, la expresión en membrana de GluN2B se normaliza hasta un $87 \pm 16\%$ ($p < 0.001$) y también revierte el aumento en su fosforilación en la Tyr1472, que disminuye hasta el $75 \pm 13\%$ de las ratas control ($p < 0.001$) (Fig. 21A, B). Al inhibir la actividad de Src mediante la incubación de las rodajas con PP2 se obtienen resultados similares, la expresión en membrana de GluN2B se normaliza hasta alcanzar un $106 \pm 9\%$ ($p < 0.01$) y disminuye su fosforilación en la Tyr1472 hasta un $89 \pm 12\%$ ($p < 0.05$) respecto a las ratas control (Fig. 21C, D).

Se ha descrito que el calcio que entra a través de los receptores NMDA que contienen a la subunidad GluN2B induce preferencialmente la activación por fosforilación de la MAP quinasa p38 (Li *et al.*, 2006), por lo que analizamos si el aumento en la expresión en membrana de GluN2B que observamos en el hipocampo de ratas hiperamonémicas induce un aumento en la fosforilación de p38.

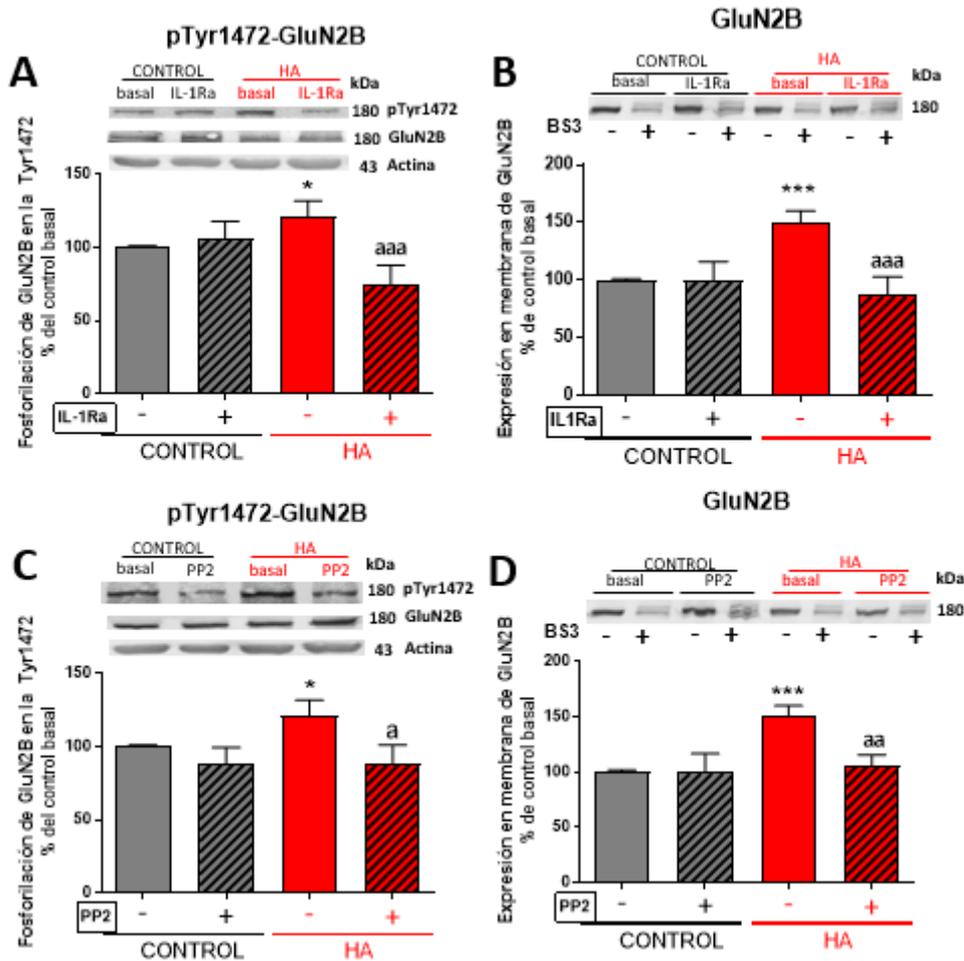


Figura 21. La activación de Src mediada por el receptor de IL-1 aumenta la fosforilación y la expresión en membrana de GluN2B en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas fueron incubadas en presencia de IL-1Ra (A, B) o de PP2 (C, D), y procesadas luego para analizar la fosforilación de GluN2B en la Tyr1472 (A, C) y su expresión en membrana (B, D). Los valores se expresan como el porcentaje que representa la media \pm SEM de la intensidad de banda de 27, 37, 28 y 37 ratas por grupo (en A, B, C y D respectivamente) respecto a las ratas control tratadas basalmente con Krebs. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Bonferroni. Los valores significativamente diferentes de las rodajas de ratas control tratadas con Krebs se indican con un asterisco y los diferentes de las rodajas de ratas hiperamonémicas tratadas con Krebs se indican con "a" (* p <0.05, *** p <0.001, ^a p <0.05, ^{aa} p <0.01, ^{aaa} p <0.001).

Como se muestra en la figura 22 (A-C), la fosforilación de p38 está aumentada en el hipocampo de ratas hiperamonémicas hasta un $124 \pm 10\%$ (p <0.05) de las ratas control y este aumento se revierte incubando las rodajas con IL-1Ra (a un $58 \pm 15\%$ de las ratas

RESULTADOS

control, $p < 0.001$, Fig. 22A), PP2 (a un $75 \pm 8\%$ de las ratas control, $p < 0.01$, Fig. 22B) o un antagonista selectivo de los receptores NMDA que contienen la subunidad GluN2B como es el ifenprodil (Amico-Ruvio *et al.*, 2012) (a un $91 \pm 9\%$ de las ratas control, $p < 0.05$, Fig. 22C).

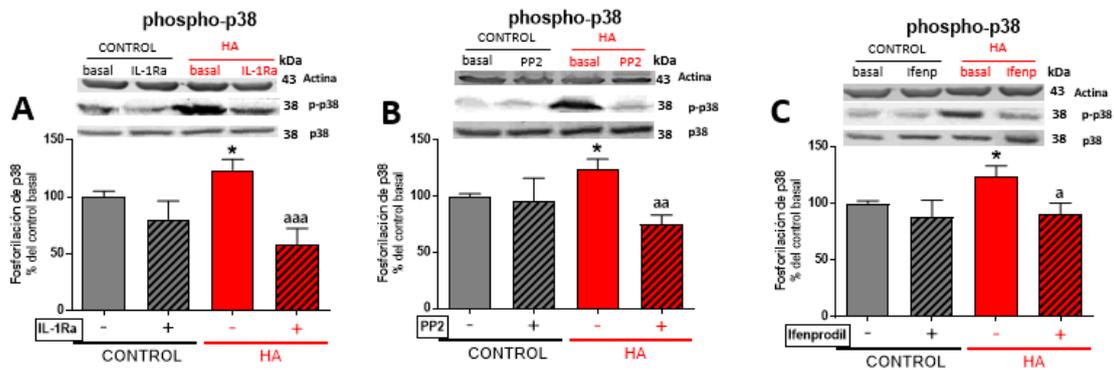


Figura 22. La activación de p38 por fosforilación, en el hipocampo de ratas hiperamonémicas, está mediada por el receptor de IL-1, Src y GluN2B. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron en presencia de IL-1Ra (A), PP2 (B) ifenprodil (C), un antagonista de los receptores NMDA que contienen GluN2B, y se analizó la fosforilación de p38 (A, B, C). Los valores se expresan como el porcentaje que representa la media \pm SEM de la intensidad de banda de 18, 16 y 20 ratas por grupo (en A, B y C respectivamente) respecto a las ratas control tratadas basalmente con Krebs. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Bonferroni. Los valores significativamente diferentes de las rodajas de ratas control tratadas con Krebs se indican con un asterisco y los diferentes de las rodajas de ratas hiperamonémicas tratadas con Krebs se indican con "a" (* $p < 0.05$, ^a $p < 0.05$, ^{aaa} $p < 0.01$, ^{aaa} $p < 0.001$).

Para determinar si esta activación de p38 está mediando las alteraciones en la fosforilación y expresión en membrana de GluA1 y GluA2, analizamos los efectos de la incubación con SB239063, un inhibidor de p38, sobre rodajas de hipocampo de ratas hiperamonémicas. Los resultados obtenidos para las dos subunidades son discordantes. Por un lado, la inhibición de p38 normaliza la expresión en membrana de GluA2 hasta un $94 \pm 18\%$ ($p < 0.01$, Fig. 23A) y aumenta también su fosforilación en la Ser880 hasta $135 \pm 20\%$ ($p < 0.001$, Fig. 23B) respecto a las ratas control. Pero, por otro lado, el inhibidor de p38 no normaliza la expresión en membrana de GluA1 ni su fosforilación en la Ser831 (Fig. 23 C, D).

2.5. La MAP quinasa p38 altera la fosforilación y expresión en membrana de GluA2 inhibiendo a PKC ζ .

Continuado con la ruta que conduce a las alteraciones de GluA2 en hiperamonemia, se ha descrito que esta subunidad es fosforilada en el residuo Ser880 por la proteín-quinasa C (PKC) (Matsuda *et al.*, 1999). Los datos anteriores sugieren, por tanto, que la

RESULTADOS

sobreactivación de la p38 podría estar reduciendo la actividad de alguna isoforma de la PKC, provocando la disminución en la fosforilación de GluA2 en la Ser880 y el aumento de su expresión en membrana. Esta isoforma podría ser la PKC zeta (PKC ζ), pues se ha visto que la p38 activada es capaz de unirse a esta isoforma impidiendo su activación por auto-fosforilación en el residuo Thr560 y reduciendo su actividad (Kim *et al.*, 2005).

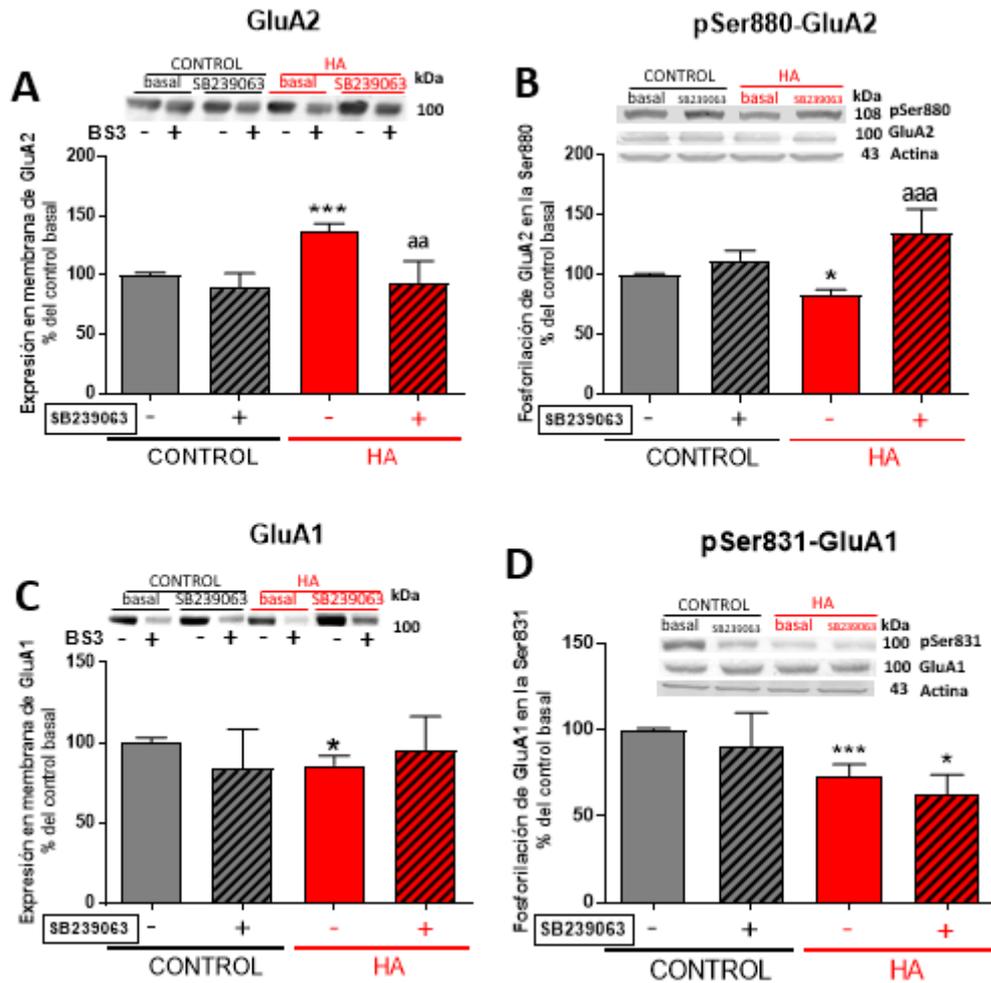


Figura 23. En el hipocampo de ratas hiperamonémicas, la activación de p38 es responsable de las alteraciones en la expresión en membrana y fosforilación de GluA2, pero no de las de GluA1. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas fueron incubadas en presencia de SB239063, un inhibidor de p38, y procesadas luego para analizar la fosforilación de GluA1 en la Ser831 (D), GluA2 en la Ser880 (B) y la expresión en membrana de GluA1 (C) y GluA2 (A). Los valores se expresan como el porcentaje que representa la media \pm SEM de la intensidad de banda de 30, 17, 22 y 29 ratas por grupo (en A, B, C y D respectivamente) respecto a las ratas control tratadas basalmente con Krebs. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Bonferroni. Los valores significativamente diferentes de las rodajas de ratas control tratadas con Krebs se indican con un asterisco y los diferentes de las rodajas de ratas hiperamonémicas tratadas con Krebs se indican con "a" (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ^{aa} $p < 0.01$, ^{aaa} $p < 0.001$).

RESULTADOS

Decidimos por tanto analizar si la fosforilación de la PKC ζ en la Thr560 está alterada en el hipocampo de ratas hiperamonémicas y, como se muestra en la figura 24, está significativamente disminuida hasta un $83\pm 6\%$ de las ratas control ($p < 0.05$) y se normaliza cuando tratamos las rodajas con IL-1Ra para bloquear el receptor de IL-1 (a un $113\pm 7\%$ de las ratas control, $p < 0.01$, Fig. 24A), con PP2 para inhibir la actividad de Src (a un $114\pm 7\%$ de las ratas control, $p < 0.01$, Fig. 24B) o ifenprodil para bloquear GluN2B (a un $115\pm 8\%$ de las ratas control, $p < 0.01$, Fig. 24C).

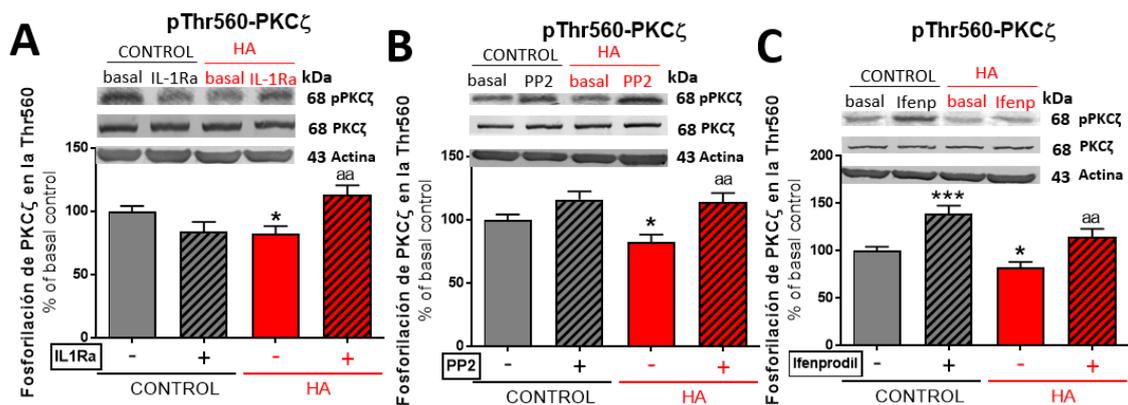


Figura 24. La sobreactivación del receptor de IL-1, Src y los receptores NMDA que contienen GluN2B disminuye la fosforilación de la PKC ζ en la Thr560 en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron en presencia de IL-1Ra (A), PP2 (B), o ifenprodil (C) y se analizó la fosforilación de la PKC ζ en la Thr560 (A, B, C). Los valores se expresan como el porcentaje que representa la media \pm SEM de la intensidad de banda de 15 ratas por grupo respecto a las ratas control tratadas basalmente con Krebs. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Bonferroni. Los valores significativamente diferentes de las rodajas de ratas control tratadas con Krebs se indican con un asterisco y los diferentes de las rodajas de ratas hiperamonémicas tratadas con Krebs se indican con "a" (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, aa $p < 0.01$).

Los resultados anteriores se resumen en la ruta propuesta en la figura 25 para explicar el mecanismo por el cual la hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de la subunidad GluA2 del receptor AMPA en el hipocampo. La hiperamonemia aumenta los niveles de IL-1 β , que activa el correspondiente receptor de IL-1. Cuando esto ocurre, la quinasa Src se activa por fosforilación y a su vez fosforila el residuo Tyr1472 de la subunidad GluN2B del receptor NMDA aumentando su expresión en membrana. El calcio que entra a través de los receptores NMDA con GluN2B activa por fosforilación a p38 y ésta bloquea la activación de PKC ζ por autofosforilación en el residuo Thr560, disminuyendo su actividad. Al estar menos activa la PKC ζ , la fosforilación del residuo Ser880 de GluA2 disminuye y con ella aumenta la expresión en membrana de dicha subunidad.

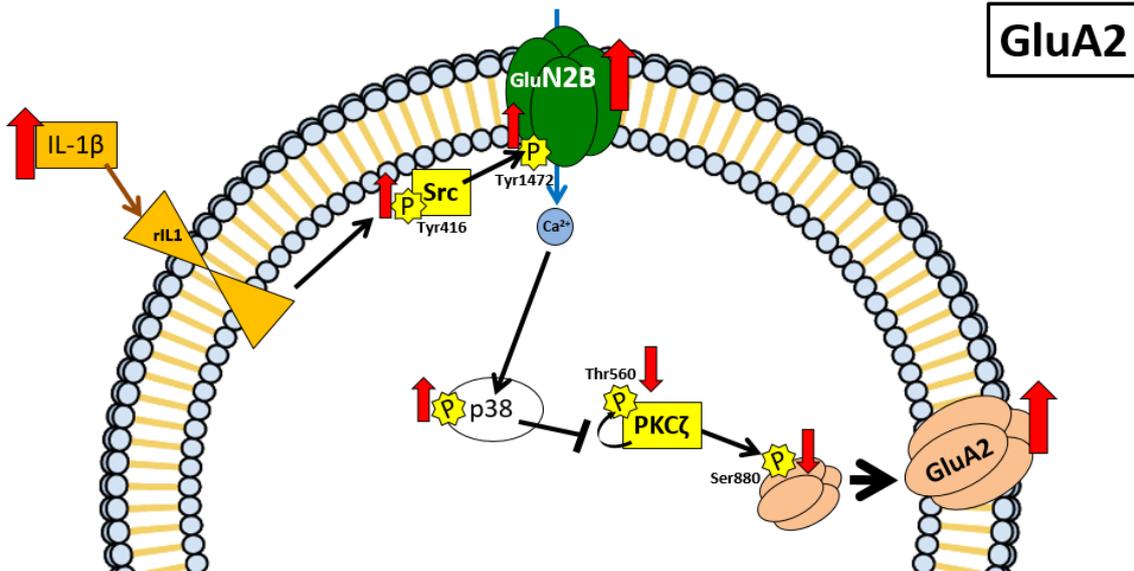


Figura 25. Mecanismos moleculares propuestos para las alteraciones inducidas por la IL-1 β en la expresión en membrana de la subunidad GluA2 del receptor AMPA en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. La hiperamonemia aumenta los niveles de IL-1 β potenciando la activación del receptor de IL-1. Esto conduce a la activación de Src, reflejada por el aumento de su fosforilación en la Tyr416. Src a su vez fosforila GluN2B en la Tyr1472 y aumenta su expresión de la membrana, lo que conduce a la activación de p38. La p38 activada se une a la PKC ζ y reduce su fosforilación en la Thr560, lo cual disminuye su actividad reduciendo la fosforilación en la Ser880 de GluA2 y aumentando su expresión en membrana.

2.6. CaMKII y PKC δ median el efecto de IL-1 β y Src sobre la fosforilación y la expresión en membrana de GluA1.

Los resultados arriba presentados muestran que las alteraciones en la fosforilación y expresión en membrana de GluA1 en el hipocampo de las ratas hiperamonémicas también se deben a la activación del receptor de IL-1 y de la quinasa Src, pero en cambio no está mediado por la ruta p38-PKC ζ . Como el residuo Ser831 puede ser fosforilado por la PKC y también por la CaMKII (Roche *et al.*, 1996; Barria *et al.*, 1997), nuestra hipótesis alternativa es que podría ser la CaMKII la implicada en este caso.

Normalmente la CaMKII se encuentra formando parte de la densidad post-sináptica, esto es, asociada a la cara interna de la membrana plasmática. Por ello, lo primero que hicimos fue estudiar el efecto de la hiperamonemia sobre la presencia de la CaMKII en membrana. En rodajas de hipocampo de ratas hiperamonémicas, la presencia de la CaMKII en membrana está muy reducida, alcanzando niveles del 54 \pm 10% de las ratas control ($p < 0.01$) (Fig. 26A, B). Además, esta disminución se revierte incubando las rodajas con IL-1Ra para bloquear el receptor de IL-1 (110 \pm 22% de las ratas control, $p < 0.05$, Fig. 26A) o inhibiendo Src con PP2 (145 \pm 24% de las ratas control, $p < 0.001$, Fig. 26B).

RESULTADOS

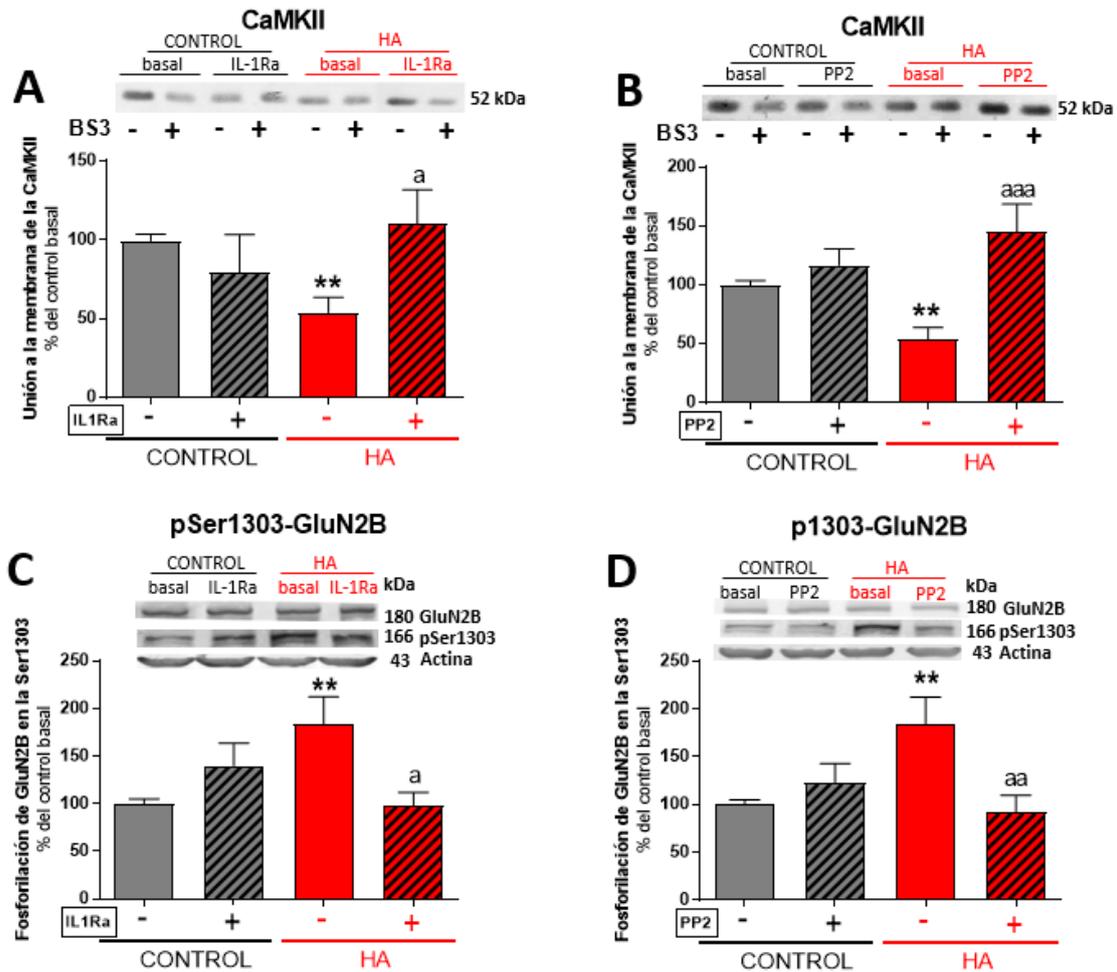


Figura 26. El receptor de IL-1 y Src aumentan la fosforilación de GluN2B en la Ser1303 y reducen la asociación a la membrana de la CaMKII en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron en presencia de IL-1Ra (A, C) o PP2 (B, D) y se analizó la fosforilación de GluN2B en la Ser1303 (C, D) y la asociación a la membrana de la CaMKII (A, B). Los valores se expresan como el porcentaje que representa la media \pm SEM de la intensidad de banda de 12, 15, 17 y 17 ratas por grupo (en A, B, C y D respectivamente) respecto a las ratas control tratadas basalmente con Krebs. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Bonferroni. Los valores significativamente diferentes de las rodajas de ratas control tratadas con Krebs se indican con un asterisco y los diferentes de las rodajas de ratas hiperamonémicas tratadas con Krebs se indican con "a" (** p <0.01, $^a p$ <0.05, $^{aa} p$ <0.01, $^{aaa} p$ <0.001).

En la densidad post-sináptica, la CaMKII está físicamente ligada al receptor NMDA. Por ello, uno de los puntos de regulación de la asociación de la CaMKII a la membrana es la fosforilación de la subunidad GluN2B del receptor NMDA en el residuo Ser1303, lo cual disocia a la CaMKII del receptor NMDA e induce su internalización hacia el citosol (Strack *et al.*, 2000). La fosforilación de GluN2B en el residuo Ser1303 está aumentada en el hipocampo de ratas hiperamonémicas hasta un $184 \pm 29\%$ de las ratas control (p <0.01) (fig. 26C, D) y los niveles de fosforilación de este residuo se normalizan bloqueando el receptor de IL-1 con IL-1Ra ($98 \pm 14\%$ de las ratas control, p <0.05 (Fig. 26C) o inhibiendo Src con PP2 ($92 \pm 18\%$ de las ratas control, p <0.01, Fig. 26D).

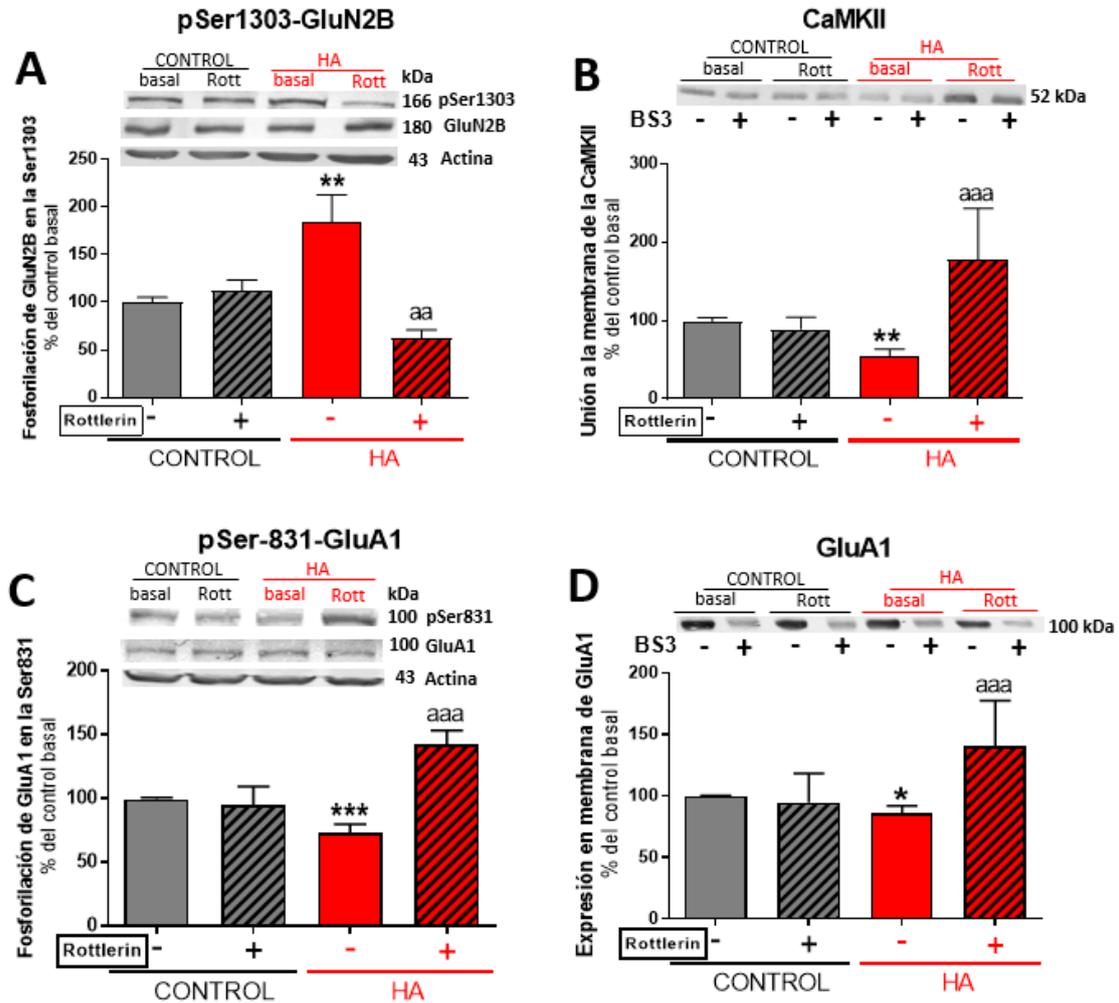


Figura 27. El aumento de la actividad de la PKC δ aumenta la fosforilaci3n de GluN2B en la Ser1303, reduciendo la asociaci3n de la CaMKII a la membrana y la fosforilaci3n de GluA1 en la Ser831, disminuyendo su expresi3n en membrana, en el hipocampo de ratas hiperamon3micas. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamon3micas se incubaron en presencia de rottlerina, un inhibidor de la PKC δ , y se analiz3 la fosforilaci3n de GluN2B en la Ser1303 (A) y de GluA1 en la Ser831 (C), la asociaci3n a la membrana de la CaMKII (B) y la expresi3n en membrana de GluA1 (D). Los valores se expresan como el porcentaje que representa la media \pm SEM de la intensidad de banda de 15, 10, 29 y 21 ratas por grupo (en A, B, C y D respectivamente) respecto a las ratas control tratadas basalmente con Krebs. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos v3as y un test post hoc de Bonferroni. Los valores significativamente diferentes de las rodajas de ratas control tratadas con Krebs se indican con un asterisco y los diferentes de las rodajas de ratas hiperamon3micas tratadas con Krebs se indican con "a" (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ^{aa} $p < 0.01$, ^{aaa} $p < 0.001$).

Por tanto, el aumento en la fosforilaci3n de GluN2B en la Ser1303 est3 mediado por el receptor de IL-1 y Src. Sin embargo, Src es una tiros3n-quinasa y no puede fosforilar residuos de serina. Debe haber, por tanto, otra quinasa de serina-treonina implicada en la ruta que medie los efectos de Src sobre la fosforilaci3n de GluN2B en la Ser1303 (Liao *et al.*, 2001). Se ha descrito que Src fosforila a la isoforma delta de la PKC (PKC δ) en su residuo Tyr311 aumentando su actividad (Murugappan *et al.*, 2009).

RESULTADOS

Para analizar si la PKC δ es la quinasa que induciría el aumento en la fosforilación de la Ser1303 en GluN2B en el hipocampo de las ratas hiperamonémicas, incubamos las rodajas con un inhibidor específico de la PKC δ , la rottlerina. El tratamiento con rottlerina revierte por completo el aumento en la fosforilación de la Ser1303 de GluN2B en las ratas hiperamonémicas, disminuyéndolo hasta valores de $62\pm 9\%$ respecto a las ratas control ($p < 0.01$) (Fig. 27A). Además, el tratamiento con rottlerina aumenta la unión de la CaMKII en membrana hasta valores incluso mayores que los de las ratas control ($178\pm 75\%$ de las ratas control, $p < 0.001$, Fig. 27B). Y éste aumento en la presencia de la CaMKII en la membrana va asociada a un aumento de la fosforilación de GluA1 en la Ser831 ($142\pm 11\%$ de las ratas control, $p < 0.001$, Fig. 27C) y de su expresión en membrana ($140\pm 37\%$ de las ratas control, $p < 0.001$, Fig. 27D).

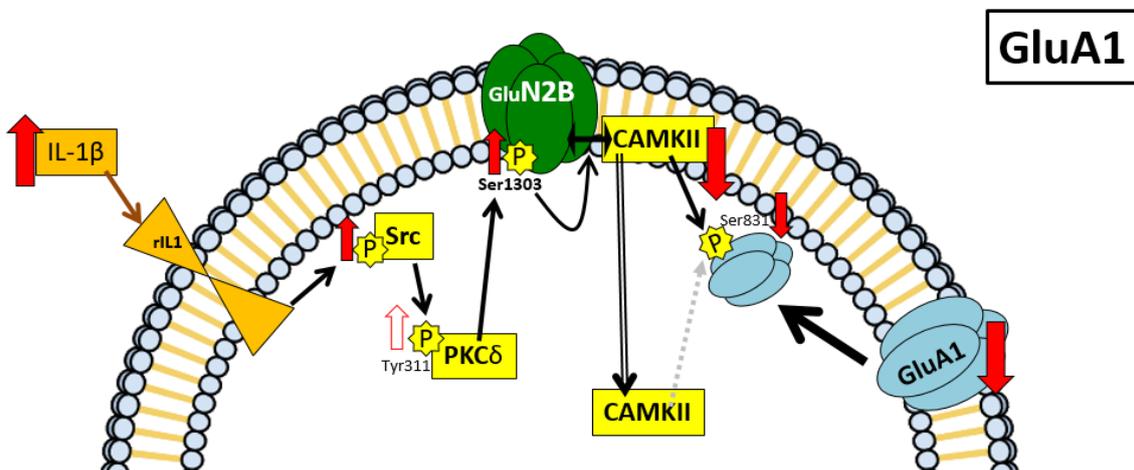


Figura 28. Mecanismos moleculares propuestos para las alteraciones inducidas por la IL-1 β en la expresión en membrana de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. La hiperamonemia aumenta los niveles de IL-1 β potenciando la activación del receptor de IL-1. Esto conduce a la activación de Src, reflejada por el aumento de su fosforilación en la Tyr416. Src activa a la PKC δ , que aumenta la fosforilación de GluN2B en la Ser1303, reduciendo la asociación de la CaMKII con la membrana y la fosforilación de GluA1 en la Ser831, lo cual disminuye su expresión en membrana.

En la figura 28 se representa la ruta propuesta que resume los resultados arriba expuestos y explica el mecanismo por el cual la hiperamonemia disminuye la expresión en membrana de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en el hipocampo. La hiperamonemia aumenta los niveles de IL-1 β , que activa el correspondiente receptor de IL-1. Cuando esto ocurre, la quinasa Src se activa por fosforilación y a su vez fosforila a la PKC δ aumentando su actividad. Esta quinasa aumenta la fosforilación de GluN2B en el residuo Ser1303 provocando la internalización de la CaMKII hacia el

citósol, lo cual reduce la fosforilación de la Ser831 de GluA1 y disminuye su expresión en membrana.

Las rutas por las que la IL-1 β altera la expresión en membrana de GluA1 y GluA2 en el hipocampo de ratas hiperamonémicas se representan en la figura 29. Tienen en común la activación del receptor de IL-1 y el aumento de la activación de Src por fosforilación, pero luego se produce la bifurcación que da lugar a las dos rutas diferentes descritas anteriormente.

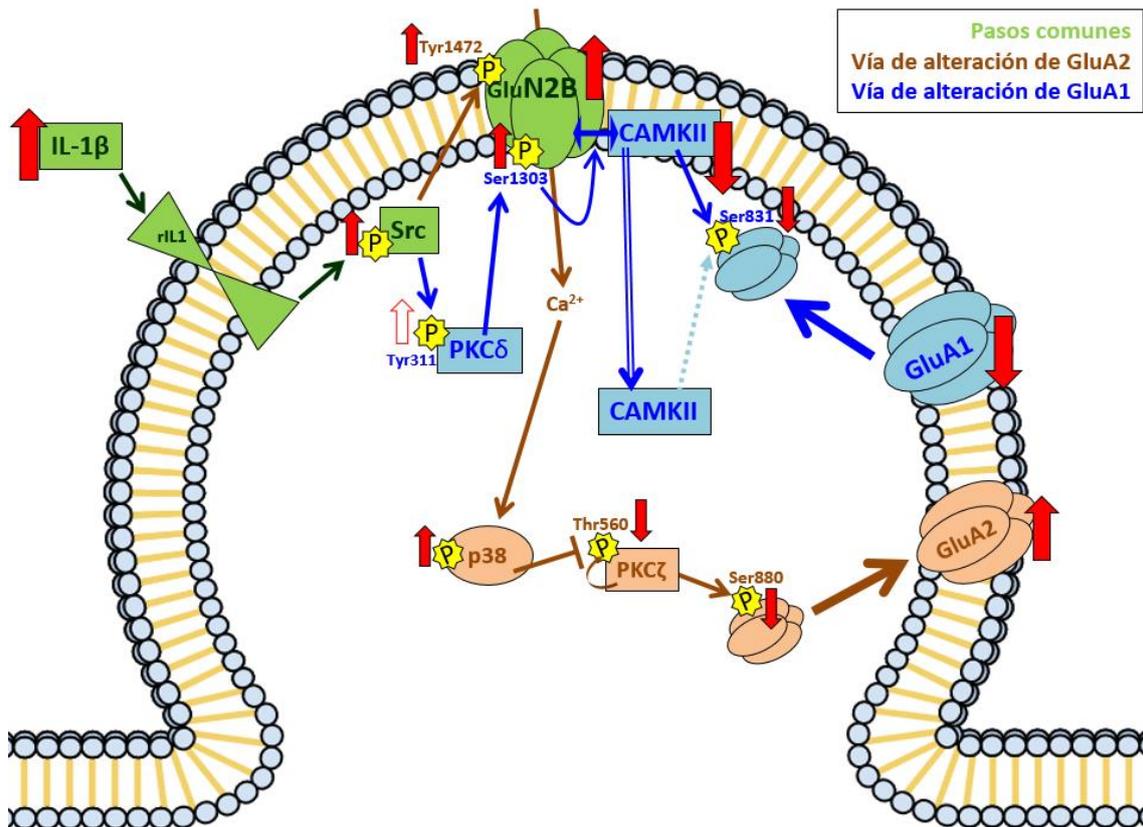


Figura 29. Superposición de los mecanismos moleculares por los cuales la IL-1 β altera la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. En el hipocampo de ratas hiperamonémicas, la IL-1 β desencadena al menos dos vías de alteración diferentes. Ambas tienen como paso común (**en verde**) la activación de Src debido a la sobreactivación del receptor de IL-1 como consecuencia del aumento en los niveles de IL-1 β . Por un lado (**en marrón**), Src fosforila a GluN2B en la Tyr1472 aumentando su expresión en membrana. Como consecuencia de esto, el calcio que entra a través de estos receptores NMDA activa preferencialmente a p38 por fosforilación. Al ser fosforilada, p38 se une al dominio regulador de la PKC ζ evitando su activación por autofosforilación en la Thr560. Por esta razón, la fosforilación de la Ser880 de GluA2 está disminuida y su expresión en membrana aumentada, al verse reducida su endocitosis. Por otro lado (**en azul**) Src también fosforila y activa a la PKC δ , que fosforila a su vez a GluN2B en la Ser1303. Esta fosforilación hace que la CaMKII se disocie de GluN2B y de la membrana, reduciendo su disponibilidad para fosforilar GluA1 en la Ser831, lo cual disminuye además su expresión en membrana.

RESULTADOS

3. MODULACIÓN POR GMPc EXTRACELULAR DE LA NEUROINFLAMACIÓN Y LAS ALTERACIONES INDUCIDAS POR LA HIPERAMONEMIA EN LA FOSFORILACIÓN Y LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE RECEPTORES DE GLUTAMATO EN EL HIPOCAMPO.

En ratas hiperamonémicas, alteraciones en la vía de síntesis y degradación del GMPc en el hipocampo son responsables de las alteraciones en la LTP (Monfort *et al.*, 2005). Además, el GMPc extracelular reduce la neuroinflamación y restaura la expresión en membrana de algunos receptores en el hipocampo de ratas hiperamonémicas in vivo (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a). En este apartado profundizamos en los mecanismos moleculares por los que el GMPc extracelular modula la expresión en membrana de receptores AMPA y NMDA en el hipocampo.

3.1. El GMPc extracelular restaura las alteraciones en la fosforilación y la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

Como se ha comentado anteriormente (ver apartado 2.1 de Resultados), la fosforilación de la subunidad GluA1 en la Ser831 y de GluA2 en la Ser880 está disminuida en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. En paralelo, la hiperamonemia reduce la expresión en membrana de GluA1, pero aumenta la de GluA2 (Fig. 19).

El tratamiento ex vivo con GMPc de rodajas del hipocampo de ratas hiperamonémicas normaliza la expresión en membrana de GluA2 al restaurar la fosforilación de la Ser880 ($98\pm 8\%$, $p<0.001$, y $113\pm 11\%$, $p<0.01$, de las ratas control respectivamente) así como la fosforilación de la Ser831 y la expresión en membrana de GluA1 (104 ± 14 , $p<0.05$, y 122 ± 9 , $p<0.0001$, de las ratas control respectivamente) (Fig. 30).

3.2. En el hipocampo de ratas hiperamonémicas, el GMPc extracelular restaura la fosforilación y la expresión en membrana de GluA2 disminuyendo la inhibición de PKC ζ por p38 al normalizar la fosforilación y expresión en membrana de la subunidad GluN2B del receptor NMDA.

La disminución en la fosforilación de la Ser880 en el hipocampo de ratas hiperamonémicas se debe a una reducción de la activación por fosforilación en la Thr560 de la PKC ζ como consecuencia de un aumento en la activación de p38 por fosforilación (ver apartado 2.5 de Resultados).

El tratamiento de rodajas de hipocampo de ratas hiperamonémicas con GMPc extracelular restaura la fosforilación de la PKC ζ en la Thr560 ($125\pm 10\%$ de las ratas control, $p<0.001$) reduciendo la fosforilación de p38 ($86\pm 11\%$ de las ratas control,

RESULTADOS

$p < 0.01$) (Fig. 31A, B), lo cual sugiere que éste es el mecanismo por el cual el GMPc extracelular normaliza la fosforilación y expresión en membrana de GluA2. Además, el GMPc extracelular aumenta la fosforilación de la PKC ζ en el hipocampo de las ratas control ($128 \pm 13\%$, $p < 0.05$) (Fig. 31A).

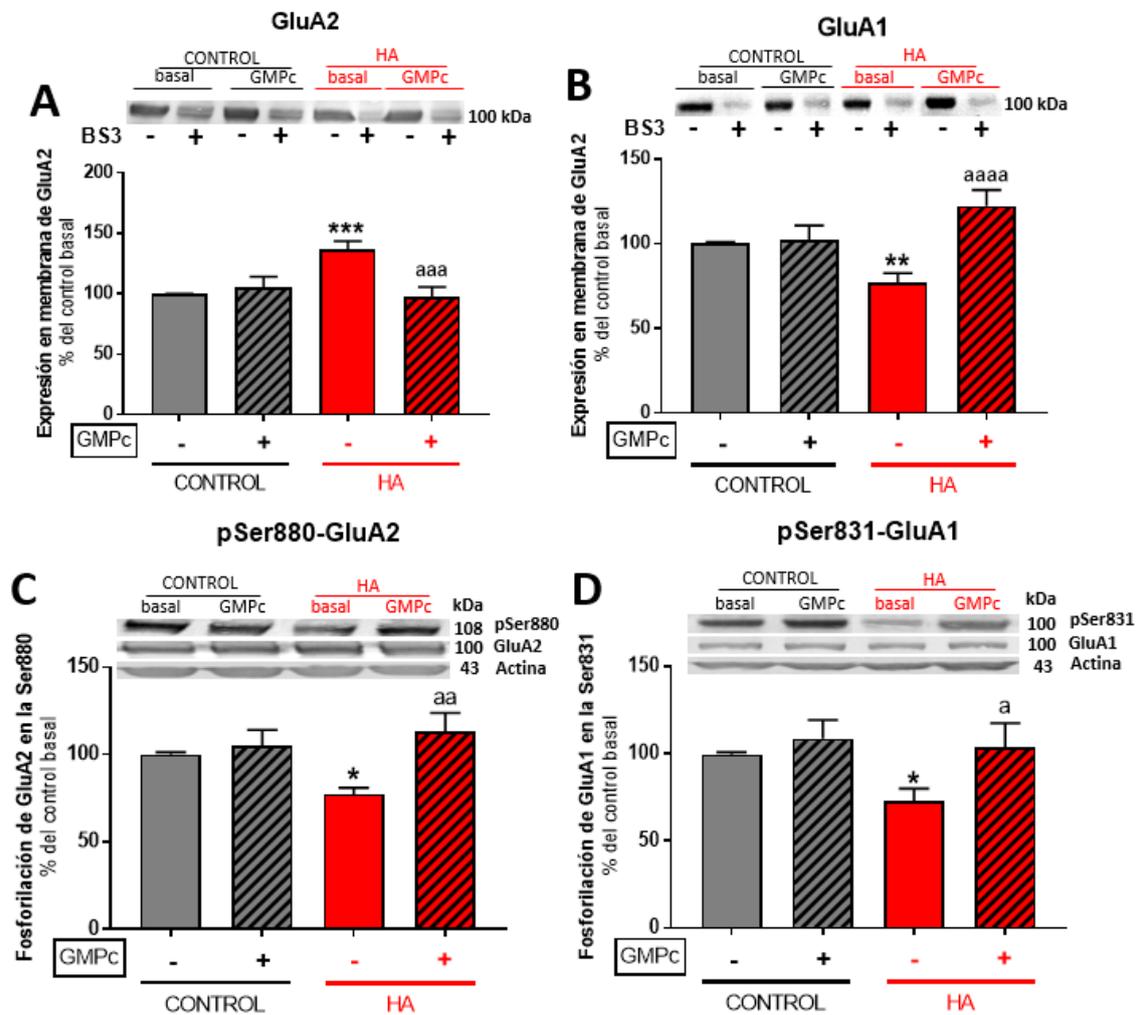


Figura 30. El tratamiento con GMPc extracelular revierte las alteraciones inducidas por la hiperamonemia en la expresión en membrana y la fosforilación de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA en el hipocampo. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron en presencia de GMPc y se analizó la expresión en membrana de GluA1 y GluA2 (A, B) así como su fosforilación en la Ser831 (C) y la Ser880 (D) respectivamente. Los valores se expresan como el porcentaje que representa la media \pm SEM de la intensidad de banda de 52, 38, 22 y 44 ratas por grupo (en A, B, C y D respectivamente) respecto a las ratas control tratadas basalmente con Krebs. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes de las rodajas de ratas control tratadas con Krebs se indican con un asterisco y los diferentes de las rodajas de ratas hiperamonémicas tratadas con Krebs se indican con "a" (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ^a $p < 0.05$, ^{aa} $p < 0.01$, ^{aaaa} $p < 0.001$, ^{aaaaa} $p < 0.0001$).

Como se ha comentado anteriormente (ver apartado 2.4 de Resultados), la sobreactivación de p38 en el hipocampo de ratas hiperamonémicas se debe a la

RESULTADOS

entrada de calcio a través de los receptores NMDA que contienen la subunidad GluN2B, cuya expresión en membrana y fosforilación en la Tyr1472 están aumentadas. Nuestros resultados muestran que el GMPc normaliza la fosforilación en la Tyr1472 y la expresión en membrana de GluN2B en el hipocampo de ratas hiperamonémicas ($97\pm 7\%$ de las ratas control, $p < 0.01$, y $103\pm 7\%$ de las ratas control, $p < 0.0001$, respectivamente) (Fig. 31D, C), disminuyendo así la fosforilación de p38 descrita previamente.

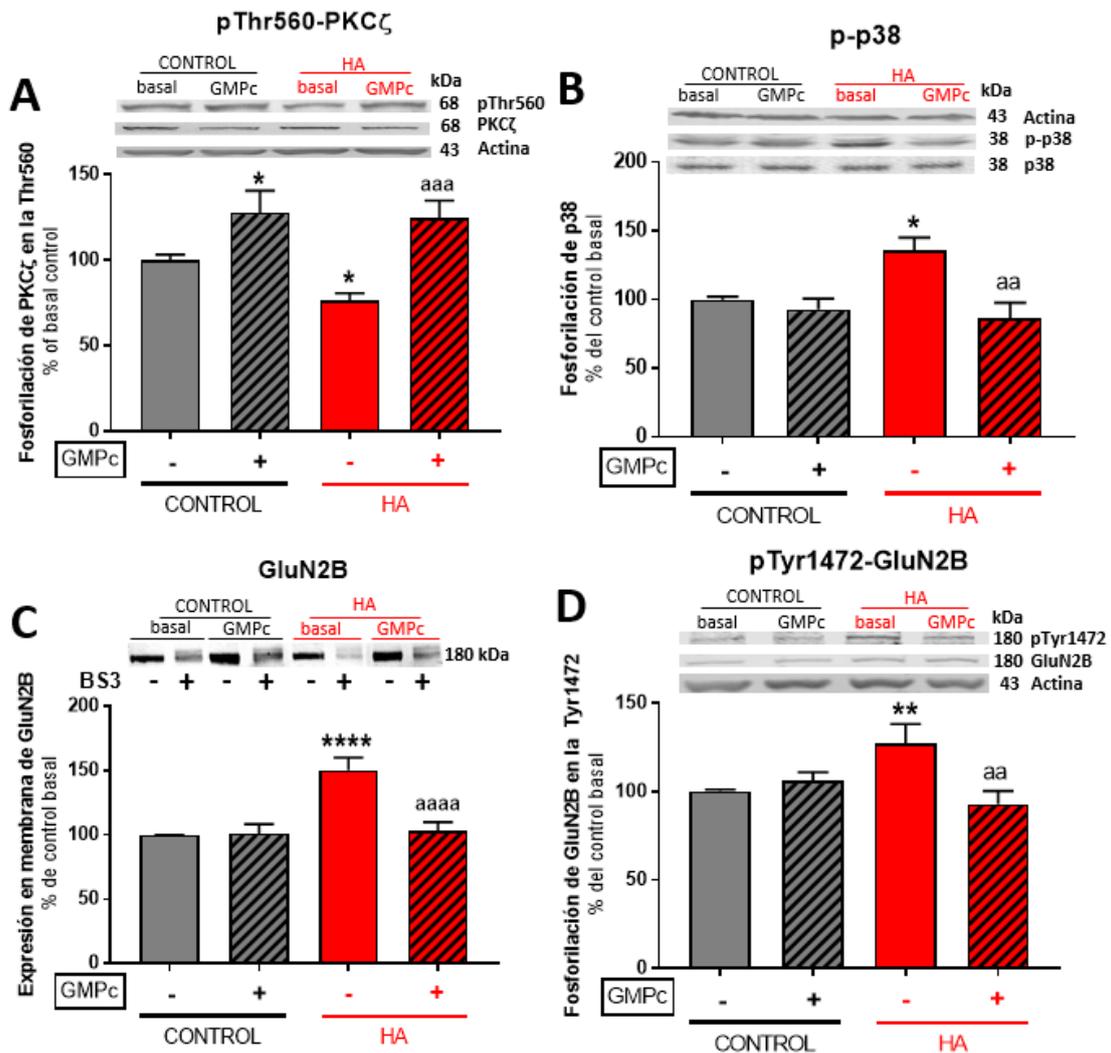


Figura 31. En el hipocampo de ratas hiperamonémicas, el GMPc extracelular restaura la fosforilación de PKC ζ y normaliza la de p38, así como la expresión en membrana y fosforilación de GluN2B. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron en presencia de GMPc y se analizó la fosforilación de la PKC ζ en la Thr560 (A), de p38 (B) y la expresión en membrana y fosforilación de la subunidad GluN2B del receptor NMDA (C, D). Los valores se expresan como el porcentaje que representa la media \pm SEM de la intensidad de banda de 21, 26, 53 y 35 ratas por grupo (en A, B, C y D respectivamente) respecto a las ratas control tratadas basalmente con Krebs. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes de las rodajas de ratas control tratadas con Krebs se indican con un asterisco y los diferentes de las rodajas de ratas hiperamonémicas tratadas con Krebs se indican con "a" (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$, ^{aa} $p < 0.01$, ^{aaa} $p < 0.001$, ^{aaaa} $p < 0.0001$).

3.3. El GMPc extracelular normaliza la fosforilación y expresión en membrana de GluN2B en el hipocampo de ratas hiperamonémicas reduciendo la fosforilación de Src al disminuir los niveles de IL-1 β .

Resultados descritos anteriormente (ver apartado 2.4 de Resultados) indican que el aumento en la fosforilación y la expresión en membrana de GluN2B en el hipocampo de ratas hiperamonémicas se debe a la activación de Src como consecuencia de una sobreactivación del receptor de IL-1.

El tratamiento con GMPc extracelular en rodajas de hipocampo de ratas hiperamonémicas reduce la fosforilación de Src ($94\pm 8\%$ de ratas control, $p < 0.01$) (Fig. 32A) disminuyendo los niveles de IL-1 β ($105\pm 8\%$ de ratas control, $p < 0.05$) (Fig. 32B), lo cual induce los efectos ya descritos sobre GluN2B.

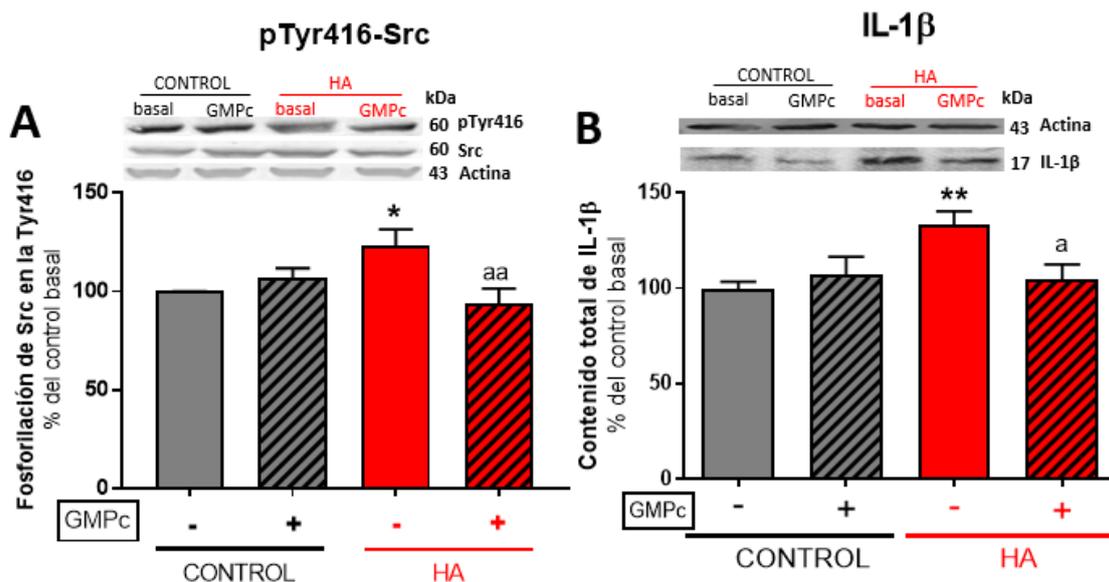


Figura 32. El GMPc extracelular revierte el aumento en la fosforilación de Src y en los niveles de IL-1 β en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron en presencia de GMPc y se analizó la fosforilación de la Src en la Tyr416 (A) y los niveles de IL-1 β (B). Los valores se expresan como el porcentaje que representa la media \pm SEM de la intensidad de banda de 35 y 24 ratas por grupo, en A y B respectivamente, respecto a las ratas control tratadas basalmente con Krebs. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes de las rodajas de ratas control tratadas con Krebs se indican con un asterisco y los diferentes de las rodajas de ratas hiperamonémicas tratadas con Krebs se indican con "a" (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ^a $p < 0.05$, ^{aa} $p < 0.01$).

3.4. El GMPc disminuye los niveles de IL-1 β en el hipocampo de ratas hiperamonémicas modulando la activación de la microglía.

La IL-1 β es una citocina proinflamatoria liberada principalmente por la microglía (Shaftel *et al.*, 2008), y se ha visto que este tipo celular está sobreactivado en el

RESULTADOS

hipocampo de ratas hiperamonémicas (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a). Por ello, analizamos mediante inmunohistoquímica en las rodajas previamente tratadas, si el GMPc extracelular disminuye los niveles de IL-1 β modulando la activación de la microglía en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

Los resultados muestran que en las rodajas de hipocampo de rata hiperamonémicas hay una fuerte activación de la microglía, evidenciada por la disminución de su área ($79 \pm 7 \text{ mm}^2$ respecto a $200 \pm 10 \text{ mm}^2$ en ratas control, $p < 0.0001$) (Fig. 33A) y su perímetro ($64 \pm 6 \text{ mm}$ respecto a $141 \pm 9 \text{ mm}$ en ratas control, $p < 0.0001$) (Fig. 33B) que les confiere una forma más ameboide (Fig. 33C).

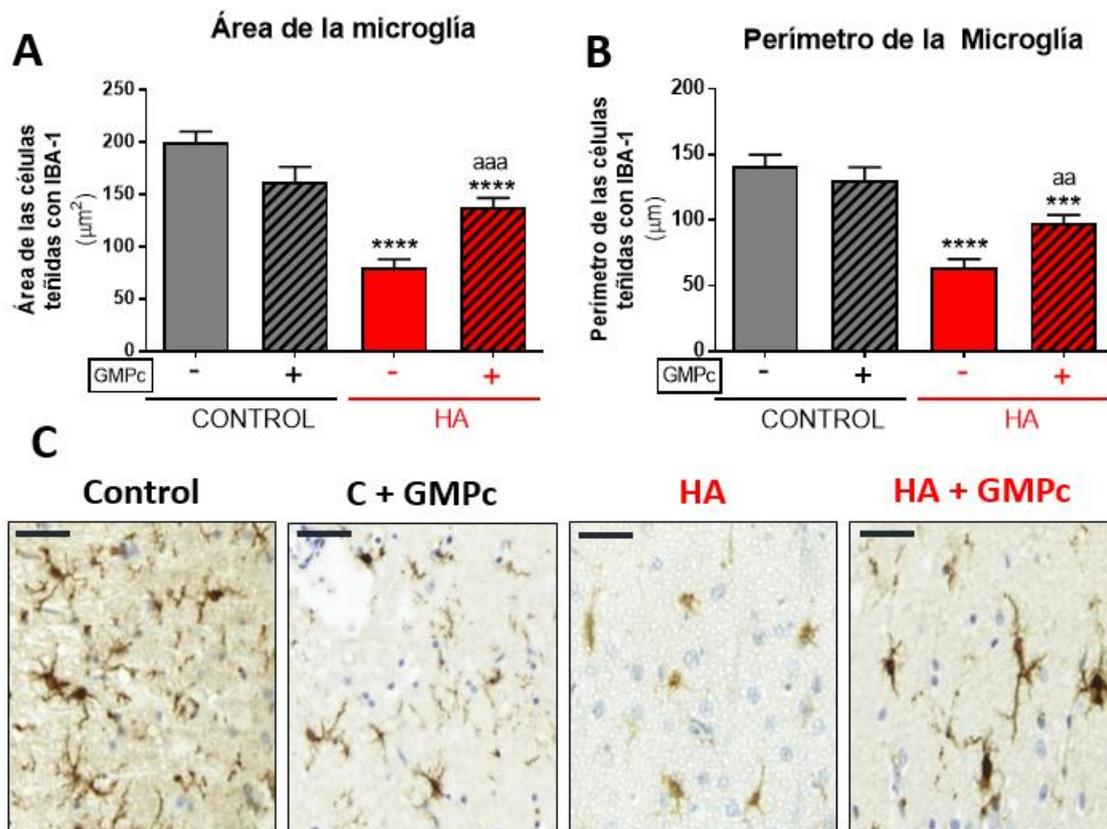


Figura 33. El GMPc extracelular revierte la activación de la microglía en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. Se llevaron a cabo inmunohistoquímicas a partir de rodajas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas tratadas previamente con GMPc, tal y como se describe en Materiales y Métodos, empleando un anticuerpo contra IBA1. Se muestran imágenes representativas (C) donde la escala mostrada es de $50 \mu\text{m}$ de longitud. Para analizar la activación de la microglía se midió el área (A) y el perímetro (B) de las células microgliales teñidas con IBA1 usando el programa *Image J*, como se describe en Materiales y Métodos. Los valores son la media \pm SEM del área (μm^2) y perímetro (μm) de toda la microglía presente en al menos 10 campos (56x) por rodaja, habiéndose analizado al menos 5 rodajas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes de las rodajas de ratas control tratadas con Krebs se indican con un asterisco y los diferentes de las rodajas de ratas hiperamonémicas tratadas con Krebs se indican con "a" (** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ^{aa} $p < 0.01$, ^{aaa} $p < 0.001$).

El tratamiento de las rodajas con GMPc extracelular aumenta significativamente el área y el perímetro de la microglía ($137\pm 9\text{mm}^2$, $p<0.001$, y $98\pm 6\text{mm}$, $p<0.01$, respectivamente) (Fig. 33A, B) en el hipocampo de ratas hiperamonémicas, aunque su estado de activación aún permanece ligeramente por encima del de las ratas control (Fig. 33C).

3.5. El GMPc extracelular revierte las alteraciones en la fosforilación y la asociación a la membrana de la CaMKII.

Como ya se ha comentado previamente, la fosforilación de GluA1 en la Ser831 aumenta su expresión en membrana y está mediada por CaMKII (Qin *et al.*, 2005). En el hipocampo de ratas hiperamonémicas, la disminución de la asociación de la CaMKII a la membrana es responsable de la reducción en la fosforilación de GluA1 y ésta se recupera cuando la CaMKII vuelve a la membrana (ver apartado 2.6 de Resultados).

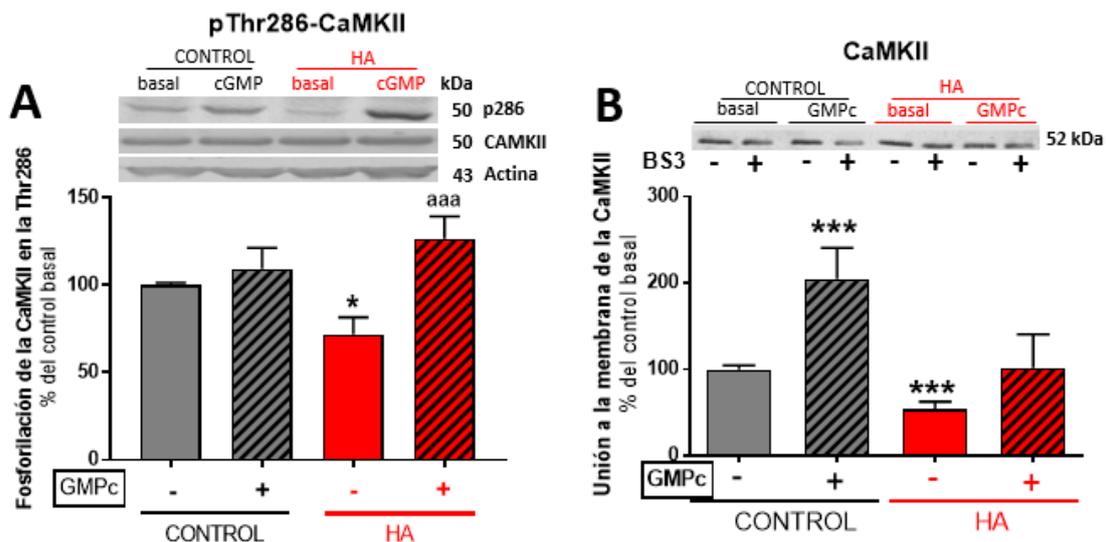


Figura 34. El GMPc extracelular restaura la fosforilación y expresión en membrana de la CaMKII. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron en presencia o ausencia de GMPc y se analizó la fosforilación de la CaMKII en la Thr286 (A), así como la asociación de la CaMKII a la membrana (B). Los valores se expresan como el porcentaje que representa la media \pm SEM de la intensidad de banda de 14 y 13 ratas por grupo (en A y B respectivamente) respecto a las ratas control tratadas basalmente con Krebs. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y un test post hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes de las rodajas de ratas control tratadas con Krebs se indican con un asterisco y los diferentes de las rodajas de ratas hiperamonémicas tratadas con Krebs se indican con "a" (* $p<0.05$, *** $p<0.001$, ^{aaa} $p<0.001$).

Nuestros resultados muestran que el GMPc extracelular estaría recuperando la fosforilación de GluA1 por medio de este mecanismo, ya que restaura la presencia de la CaMKII en la membrana hasta un $102\pm 39\%$ de las ratas control (Fig. 34B). Además, el

RESULTADOS

tratamiento con GMPc aumenta la unión de la CaMKII a la membrana en las ratas control ($205 \pm 36\%$ de las ratas control, $p < 0.001$).

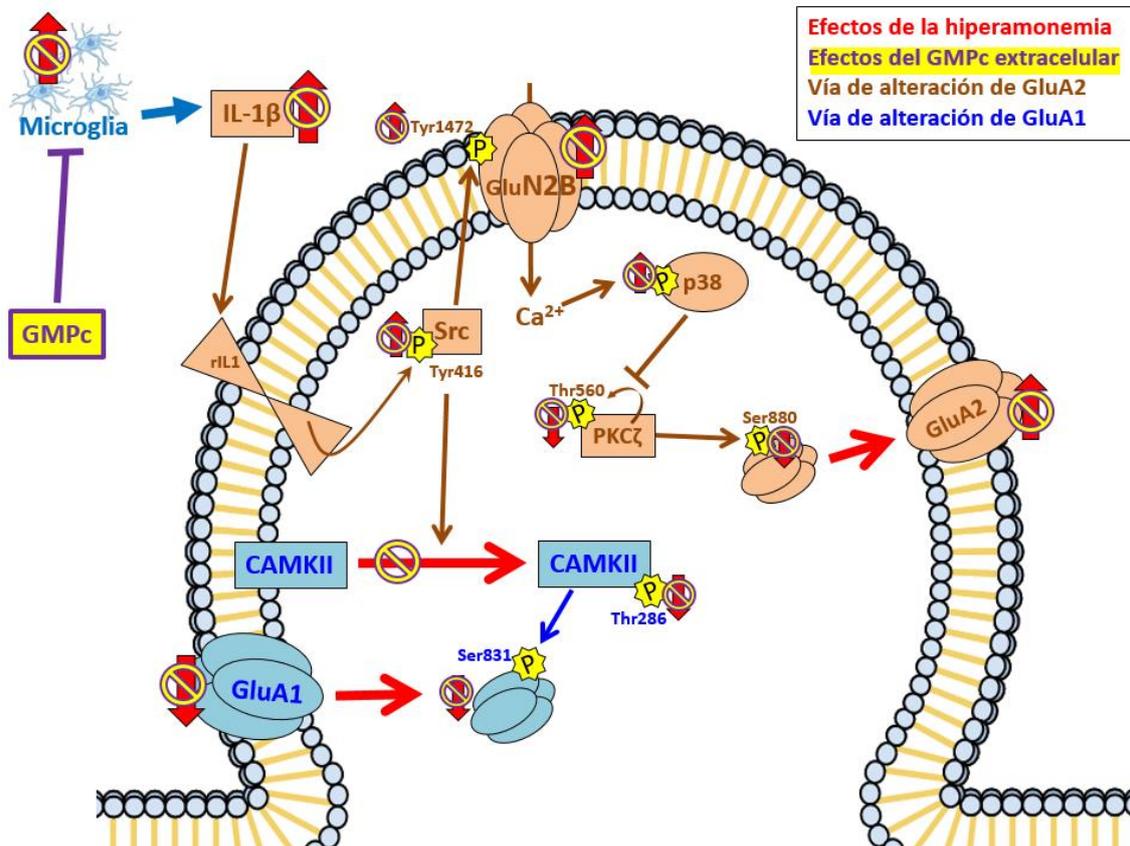


Figura 32. Esquema representativo de los mecanismos por los cuales el GMPc extracelular contrarresta las alteraciones inducidas por la hiperamonemia en la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA en el hipocampo. El GMPc extracelular normaliza la expresión en membrana de GluA1 y GluA2 en el hipocampo de ratas hiperamonémicas, pero los mecanismos finales por los que lo hace son diferentes. Por un lado, la hiperamonemia induce una serie de alteraciones (en rojo) que aumentan la expresión en membrana de GluA2 (en marrón). El GMPc extracelular normaliza su expresión en membrana restaurando la fosforilación de la Ser880 al disminuir la fosforilación de p38 y restaurar la activación de la PKCζ por fosforilación en la Thr560. La modulación de p38 se produce porque el GMPc disminuye la expresión en membrana de la subunidad GluN2B del receptor NMDA, que está aumentada en hiperamonemia, al reducir su fosforilación en la Tyr1472. Y esto ocurre porque el GMPc disminuye los niveles de IL-1β en el hipocampo de ratas hiperamonémicas, disminuyendo así la activación de Src mediada por el receptor de IL-1. La disminución en los niveles de IL-1β sería la consecuencia de la reducción por GMPc extracelular de la activación de la microglía, en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. Por otro lado, el GMPc extracelular modula también las alteraciones inducidas por la hiperamonemia (en rojo) en la expresión en membrana de GluA1 (en azul). El GMPc extracelular restaura la expresión en membrana de GluA1 aumentando su fosforilación en la Ser831 porque revierte la disminución causada por la hiperamonemia en la activación de la CaMKII por fosforilación en la Thr286 y en su asociación a la membrana. Esto sería también consecuencia de la reducción en la activación de la microglía, la producción de IL-1β y la activación de Src.

Para su activación, la CaMKII requiere la autofosforilación, mediada por calcio-cadmodulina, de la Thr286 (Fan *et al.*, 2014). De manera interesante, la hiperamonemia no sólo internaliza la CaMKII, sino que disminuye su fosforilación de en

la Thr286, y por tanto su actividad, en el hipocampo de ratas hiperamonémicas ($71\pm 9\%$ de las ratas control, $p < 0.05$) y el GMPc extracelular también la restaura ($127\pm 13\%$ de las ratas control, $p < 0.001$) (Fig. 34A).

En resumen, como se ilustra en la figura 35, el GMPc extracelular estaría revirtiendo las alteraciones causadas por la hiperamonemia en la expresión en membrana de GluA1 y GluA2 en el hipocampo modulando diferentes vías de señalización. El GMPc extracelular modula la microglía reduciendo su activación, lo cual disminuye los niveles de IL-1 β y altera a su vez todos los pasos de la vía descrita anteriormente (Fig. 25) por la que se altera la fosforilación y la expresión en membrana de GluA2. Y, por otro lado, el GMPc extracelular también estaría normalizando la expresión en membrana de GluA1 en el hipocampo de ratas hiperamonémicas restaurando la fosforilación y la asociación con la membrana de la CaMKII.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. EFECTOS DEL BLOQUEO IN VIVO DEL RECEPTOR DE IL-1 SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN, LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE RECEPTORES Y LAS ALTERACIONES COGNITIVAS EN RATAS HIPERAMONÉMICAS.

Como se ha comentado en la introducción, la hiperamonemia induce un estado de neuroinflamación que aumenta los niveles de diversas citocinas proinflamatorias, entre ellas la IL-1 β , que dan lugar al deterioro cognitivo que presentan estas ratas (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a). No obstante, estudios previos han sugerido que podría no tratarse de un proceso único y homogéneo, sino que determinadas citocinas serían responsables de alteraciones cognitivas concretas y no de otras. Por ejemplo, Cabrera-Pastor y colaboradores (2016a) apuntan que, mientras que el TNF α sería responsable de las alteraciones en el aprendizaje y la memoria espacial, la IL-1 β estaría relacionada más bien con los déficits en la memoria de trabajo de las ratas hiperamonémicas.

Por ello, y para profundizar en el proceso neuroinflamatorio desencadenado por la hiperamonemia, la primera parte de esta tesis (apartado 1 de Resultados) se ha dedicado a esclarecer los efectos concretos de la IL-1 β sobre diferentes tipos de memoria y áreas cerebrales, así como los mecanismos neuroinflamatorios y moleculares implicados. Para ello, tal y como se explica en Materiales y Métodos, se ha recurrido a la administración intracerebral crónica e in vivo del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), un péptido endógeno que bloquea dicho receptor impidiendo competitivamente la unión de la IL-1 β (Irikura *et al.*, 2002) y, por tanto, la activación de las vías de señalización que ésta desencadena.

1.1. Efectos del tratamiento con IL-1Ra sobre las alteraciones cognitivas que presentan las ratas hiperamonémicas.

En nuestros estudios, ratas hiperamonémicas y controles, tratadas con IL-1Ra o bien su vehículo, se sometieron a diferentes tipos de test de comportamiento para analizar hasta tres tipos de memoria diferentes: memoria de trabajo, memoria (y aprendizaje) espacial y memoria de reconocimiento (diferenciando entre reconocimiento de objetos y de localizaciones espaciales). En primer lugar, nuestros resultados del laberinto radial de 8 brazos muestran que las ratas hiperamonémicas presentan alteraciones tanto en la memoria de trabajo como en la de referencia, y también en el aprendizaje espacial, lo cual concuerda con resultados de estudios previos (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a). En segundo lugar, la hiperamonemia altera igualmente la memoria de reconocimiento, afectando a la capacidad de las ratas para reconocer tanto un objeto nuevo como una localización espacial nueva respecto a otra ya conocida. Aunque, por lo que sabemos, los nuestros son los primeros

estudios acerca de alteraciones en la memoria de reconocimiento causadas por la hiperamonemia, sí se han descrito este tipo de alteraciones en otros modelos de encefalopatía hepática (García-Moreno *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2015; García-Ayllón *et al.*, 2008; Kawai *et al.*, 2012; Leke *et al.*, 2013), si bien los mecanismos implicados no han sido analizados de forma exhaustiva.

Apoyando los resultados descritos por Cabrera-Pastor y colaboradores (2016a), hemos encontrado una disociación en los mecanismos implicados en estas alteraciones cognitivas, ya que el tratamiento con IL-1Ra en las ratas hiperamonémicas restaura la memoria de trabajo y la memoria de reconocimiento de objetos, pero no así la memoria de referencia y el aprendizaje espacial ni la memoria de reconocimiento de localizaciones espaciales. Esto sugiere que, en las ratas hiperamonémicas, el aumento de los niveles de IL-1 β desencadena una serie de mecanismos que alteran diferentes tipos de memoria sin componente espacial. En cambio, las alteraciones que presentan estas ratas en otros tipos de memoria que sí tienen un componente espacial, estarían causadas por otros factores proinflamatorios, siendo el TNF α un posible aspirante a representar este papel (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a).

1.2. Efectos del tratamiento con IL-1Ra sobre la neuroinflamación que presentan las ratas hiperamonémicas en hipocampo y corteza.

Para profundizar en los mecanismos subyacentes a esta disociación, analizamos la activación de la microglía en diferentes áreas cerebrales que se ha descrito están implicadas en estos tipos de memoria.

Tradicionalmente el hipocampo se ha relacionado con aprendizaje y memoria espacial (O'Keefe & Nadel, 1978; Morris *et al.*, 1982) y es necesario igualmente para la memoria de reconocimiento que requiere procesamiento de información espacial (Mumby *et al.*, 2002; Barker & Warburton, 2011). Sin embargo, el hipocampo también está implicado en otros procesos cognitivos sin componente espacial, como la memoria de reconocimiento de objetos (Broadbent *et al.*, 2004; Hammond *et al.*, 2004) o la memoria de trabajo (Siapas *et al.*, 2005; Hyman *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2015).

Estudios previos han relacionado la activación de la microglía en el hipocampo con diferentes tipos de alteraciones cognitivas en diversas situaciones patológicas (Rosi *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2017; Zarezadeh *et al.*, 2017), incluida la hiperamonemia (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a). Apoyando estos datos, nuestros resultados muestran que la hiperamonemia induce activación de la microglía en el hipocampo, la cual es revertida por el tratamiento con IL-1Ra.

DISCUSIÓN

Si la activación de la microglía en el hipocampo fuera la causa de las alteraciones espaciales y no espaciales que presentan las ratas hiperamonémicas, el tratamiento con IL-1Ra debería revertir ambas al igual que revierte la activación de la microglía. El hecho de que esto no ocurra (ver arriba) sugiere que la neuroinflamación inducida por la hiperamonemia en otras áreas cerebrales podría estar alterando los procesos de memoria en áreas que envían eferencias al hipocampo. De hecho, estudios previos han demostrado que la hiperamonemia provoca la activación de la microglía en otras áreas, como cerebelo o corteza (Rodrigo *et al.*, 2010).

La información procedente de áreas sensoriales y asociativas del cerebro llega al hipocampo principalmente a través de proyecciones procedentes de las cortezas perirrinal y postrrinal. Sin embargo, mientras que la información relativa a las propiedades de los objetos procede principalmente de la corteza perirrinal y llega al hipocampo a través de la corteza entorrinal lateral, la corteza postrrinal procesa sobre todo la información espacial, que envía al hipocampo a través de la corteza entorrinal medial (Van Strien *et al.*, 2009; Ramos, 2013). Estudios basados en lesiones en la corteza perirrinal y postrrinal han demostrado la implicación diferencial de estas áreas en la memoria de reconocimiento de objetos y en la memoria espacial y de reconocimiento de localizaciones espaciales respectivamente (Mumby *et al.*, 2002; Norman y Eacott, 2005; Vann *et al.*, 2000). Además, se han relacionado alteraciones en el reconocimiento de objetos con activación de microglía en la corteza perirrinal (Heisler y O'Connor, 2016).

Nuestros resultados muestran que la hiperamonemia induce activación de la microglía tanto en la corteza perirrinal como en la postrrinal, pero, inesperadamente, sólo la microglía de la corteza perirrinal ve disminuida su activación tras el tratamiento con IL-1Ra.

Todo esto sugiere que la hiperamonemia estaría induciendo dos procesos neuroinflamatorios diferentes, tal y como se representa en la figura 36. Uno de ellos, mediado por la IL-1 β , provocaría la activación de la microglía en la corteza perirrinal y el hipocampo, alterando la memoria de tipo no espacial. Por otro lado, un segundo mecanismo independiente de IL-1 β activaría la microglía en la corteza postrrinal. Como consecuencia de esta disociación, al bloquear el receptor de IL-1 sólo revertimos la activación de la microglía en corteza postrrinal e hipocampo, restaurando únicamente los tipos de memoria sin componente espacial.

Aunque el hipocampo también intervenga en el procesamiento espacial y en esta región se normalice la activación de la microglía, el procesamiento ya viene alterado desde la corteza postrrinal, donde la microglía permanece aún activada tras el tratamiento con IL-1Ra.

Para entender mejor esta disociación anatómica y funcional, analizamos los niveles de IL-1 β en hipocampo, corteza perirrinal y corteza postrrinal. La hiperamonemia aumenta tanto el

contenido de IL-1 β en el hipocampo como el número de células positivas para IL-1 β en corteza perirrinal. Pero en cambio, el número de células positivas para IL-1 β no está aumentado en la corteza postrrinal de ratas hiperamonémicas, sugiriendo que las disociaciones observadas en los efectos del IL-1Ra sobre la activación de la microglía y las alteraciones cognitivas se asocian con diferencias neuroanatómicas en los niveles de expresión de la IL-1 β .

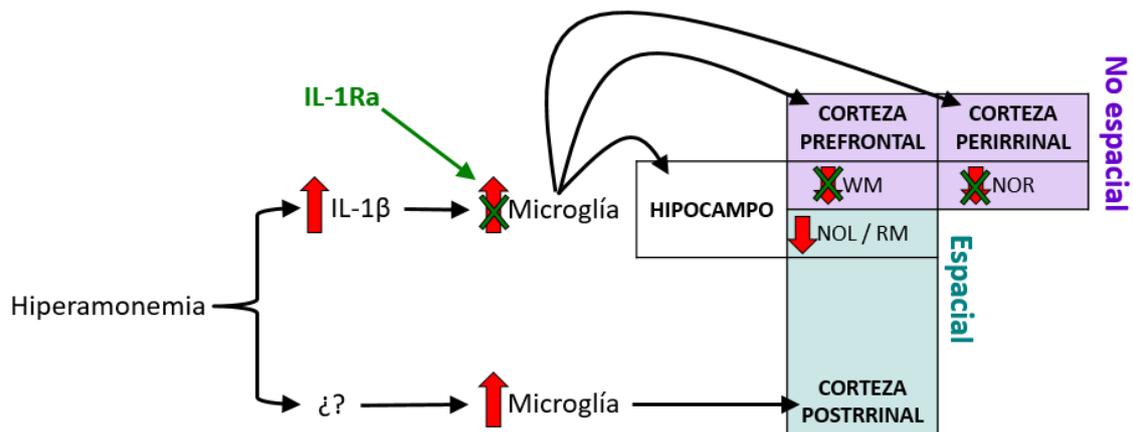


Figura 36. Disociación de los mecanismos implicados en las alteraciones inducidas por la hiperamonemia. En las ratas hiperamonémicas, el aumento en los niveles de IL-1 β activa la microglía en hipocampo, corteza prefrontal y corteza perirrinal, alterando la memoria de trabajo (WM) y la memoria de reconocimiento de objetos (NOR). Por ello, todas estas alteraciones se revierten mediante el tratamiento con IL-1Ra (en verde). En cambio, otros factores proinflamatorios inducidos por la hiperamonemia activarían la microglía en corteza postrrinal, alterando la memoria de reconocimiento de localizaciones espaciales (NOL) y la memoria de referencia espacial (RM), sobre lo cual el IL-1Ra no ejerce ningún efecto.

Curiosamente, el tratamiento con IL-1Ra revierte el aumento en los niveles de la propia IL-1 β en hipocampo y corteza perirrinal en las ratas hiperamonémicas. El IL-1Ra es un péptido endógeno con efectos antiinflamatorios (Klementiev *et al.*, 2014) que compite con la IL-1 β por su unión al receptor de IL-1, el cual se expresa moderadamente en la membrana de prácticamente todos los tipos celulares (Irikura *et al.*, 2002; Dinarello, 2011). Estudios previos han demostrado que el tratamiento intracerebral con IL-1Ra no solo bloquea la señalización por IL-1 β , sino que reduce su expresión en el cerebro (Frank *et al.*, 2012; Lan *et al.*, 2015). Clausen y colaboradores (2016) demostraron, en un modelo murino de traumatismo, que la IL-1 β y el IL-1Ra pueden ser liberados por diferentes tipos de microglía. Encontraron que el tratamiento con IL-1Ra aumenta la producción de IL-1Ra por parte de la microglía, reduciendo los niveles cerebrales de IL-1 β , probablemente al inhibir a la microglía productora de IL-1 β . Un efecto diferencial de la IL-1 β y/o el IL-1Ra sobre diversos tipos de microglía podría ser un mecanismo que contribuya a lo que está ocurriendo en la neuroinflamación de las ratas hiperamonémicas. Estudios previos han demostrado que existe diversidad transcripcional y

DISCUSIÓN

fenotípica entre la microglía de diferentes regiones cerebrales (Grabert *et al.*, 2016). Esto explicaría, por ejemplo, que la activación de la microglía es mucho mayor en la corteza perirrinal de ratas hiperamonémicas que en el resto de áreas, o que en general la microglía de hipocampo presenta un perímetro notablemente mayor que la del resto de áreas (Fig. 12). Además, el IL-1Ra que administramos intracerebralmente a las ratas hiperamonémicas podría estar inhibiendo a la microglía productora de IL-1 β en hipocampo y corteza perirrinal, lo cual explicaría la disminución de sus niveles y los efectos antiinflamatorios observados. Por otro lado, la microglía que se activa en corteza postrrinal sería de un subtipo que no produce IL-1 β . Sin embargo, esto son especulaciones que deberán ser probadas o refutadas con nuevos experimentos en nuestro modelo.

Como se ha comentado anteriormente, la memoria de trabajo está afectada en las ratas hiperamonémicas, y el tratamiento con IL-1Ra la restaura. El procesamiento de este tipo de memoria a corto plazo no depende únicamente del hipocampo, sino que implica su coordinación con la corteza prefrontal (Siapas *et al.*, 2005; Hyman *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2015). Concretamente, la porción medial de la corteza prefrontal medial es especialmente importante en el procesamiento de la memoria de trabajo espacial (Kesner & Churchwell, 2011). La microglía está activada en la región prelímbica de la corteza prefrontal medial de ratas hiperamonémicas, y el tratamiento con IL-1Ra revierte dicha activación. Estos datos sugieren que las alteraciones causadas por la hiperamonemia en la memoria de trabajo espacial estarían causadas por la activación de la microglía mediada por la IL-1 β en el circuito hipocampo \rightarrow corteza prefrontal (Fig. 36).

Paradójicamente, en las ratas control, el tratamiento con IL-1Ra provoca la activación de la microglía en hipocampo y corteza prefrontal y aumenta la expresión de IL-1 β en la región CA1 del hipocampo, lo cual podría estar relacionado con las alteraciones que presentan estas ratas en la memoria espacial y de trabajo (Fig. 18). Si bien un exceso de IL-1 β es claramente perjudicial para la función cognitiva, sus niveles fisiológicos son necesarios y juegan un papel importante en la formación de memoria (Schneider *et al.*, 1998; Yirmiya *et al.*, 2002; Goshen *et al.*, 2007), por lo que el bloqueo del receptor de IL-1 en ratas control, en las que los niveles de IL-1 β no están aumentados, podría tener efectos perjudiciales sobre la función cognitiva, tal y como observamos en la memoria espacial y de trabajo.

1.3. Implicaciones funcionales de las alteraciones causadas por la hiperamonemia en la expresión en membrana de receptores en hipocampo y corteza prefrontal. Efectos del bloqueo del receptor de IL-1.

La función y expresión en membrana de los receptores ionotrópicos de glutamato (AMPA y NMDA) y GABA_A son cruciales para los procesos de plasticidad sináptica subyacentes a la memoria y el aprendizaje (Morris, 2006; Anggono & Huganir, 2012; Lorenz-Guertin & Jacob, 2018). Su expresión en membrana y función se ven alteradas por la neuroinflamación y, en concreto, por la IL-1 β (Lai *et al.*, 2006; Viviani *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012). Puesto que las alteraciones inducidas por la neuroinflamación en la expresión en membrana de los receptores AMPA, NMDA y GABA_A son un punto clave en las alteraciones cognitivas en ratas con encefelopatía hepática e hiperamonemia (Hernández-Rabaza *et al.*, 2015, 2016a; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a), resulta plausible que éste sea el mecanismo por el cual la IL-1 β está alterando la memoria espacial, de reconocimiento y de trabajo en nuestras ratas hiperamonémicas.

Tabla 4. Alteraciones en la expresión en membrana de receptores en ratas hiperamonémicas. Efecto del tratamiento con IL-1Ra en ratas hiperamonémicas y controles

		Hipocampo		Corteza prefrontal	
		Control	HA	Control	HA
NMDA	GluN1		↓	↑	✗
	GluN2A		✗		✗
	GluN2B	↑	↑		✗
AMPA	GluA1		✗	↓	✗
	GluA2	↑	↑		✗
GABA _A	α 1		✗	↓	✗

Se representa, en rojo, las alteraciones causadas por la hiperamonemia en la expresión en membrana de receptores NMDA, AMPA y GABA_A. En verde, los efectos del IL-1Ra sobre la expresión en membrana en ratas controles e hiperamonémicas.

Como se resume en la tabla 4, el tratamiento intracerebral con IL-1Ra restaura la expresión en membrana de tres subunidades que la tienen disminuida en el hipocampo de ratas hiperamonémicas: la subunidad GluN2A del receptor NMDA, GluA1 del receptor AMPA y α 1 del receptor GABA_A. Sin embargo, no restaura la expresión en membrana de la subunidad GluN1 del receptor NMDA y tampoco normaliza las de la subunidad GluN2B del receptor NMDA ni la subunidad GluA2 del AMPA, que están aumentadas en hiperamonemia.

DISCUSIÓN

Por otro lado, la hiperamonemia reduce la expresión en membrana de todas las subunidades estudiadas de los receptores AMPA, NMDA y GABA_A en corteza prefrontal, mientras que el tratamiento con IL-1Ra restaura todas estas alteraciones (tabla 4).

1.3.1. Memoria de trabajo y de referencia espacial.

En general, diversos estudios han puesto de manifiesto la importancia que tienen en el hipocampo los receptores AMPA para la memoria de trabajo espacial y no para la de referencia (Reisel *et al.*, 2002; Schmitt *et al.*, 2003; Shimshek *et al.*, 2006; Sanderson *et al.*, 2010). Más específicamente, estudios en ratones knock-out para la subunidad GluA1 del receptor AMPA, han mostrado que es esencial para la LTP en hipocampo y la memoria de trabajo espacial, pero no así para la memoria de referencia (Reisel *et al.*, 2002; Sanderson *et al.*, 2010). Sin embargo, puesto que estos ratones carecen por completo de dicha subunidad, no es posible confirmar en qué áreas es especialmente importante su expresión y en cuáles no. Un estudio llevado a cabo por Freudenberg y colaboradores (2013), suprimiendo selectivamente la expresión de GluA1 en el hipocampo, demostró que la expresión de GluA1 en dicha región es crucial para la memoria de trabajo con tiempos de retención de al menos 30 segundos. Además, la disminución de la expresión en membrana de GluA1 en el hipocampo se ha relacionado con déficits en la memoria de trabajo asociados a privación de sueño (Xie *et al.*, 2015). Puesto que las ratas hiperamonémicas presentan una disminución en la expresión en membrana de GluA1 en el hipocampo y el tratamiento con IL-1Ra la restaura al igual que ocurre con la memoria de trabajo, la alteración de la expresión en membrana de GluA1 en el hipocampo podría ser parte de los mecanismos por los cuales la IL-1 β altera la memoria de trabajo en las ratas hiperamonémicas (Fig. 17).

Por otro lado, la depleción de la subunidad GluA2 del receptor AMPA mantiene intacta la LTP en el hipocampo, pero altera severamente la neurotransmisión y la memoria de trabajo espacial. Aunque con más problemas que los controles, los ratones sin GluA2 consiguen aprender test de memoria de referencia espacial (Shimshek *et al.*, 2006). Sin embargo, puesto que la hiperamonemia parece alterar la expresión en membrana de GluA2 en el hipocampo por mecanismos independientes de la IL-1 β , no parece que dichas alteraciones estén relacionadas con las de la memoria de trabajo en nuestro caso. En cuanto al papel de los receptores NMDA en el hipocampo, hay estudios que indican que son necesarios tanto para la memoria de trabajo como para la de referencia espacial (Morris *et al.*, 2013; Yamada *et al.*, 2015). También se ha propuesto la existencia de una disociación entre receptores AMPA y NMDA hipocampales en cuanto a su

función en la memoria de trabajo. Mientras que los receptores AMPA serían necesarios para las fases de consolidación y retención, los NMDA están más implicados en codificación y recuperación (Yoshihara e Ichitani, 2004). En nuestro caso, las aproximaciones experimentales realizadas no nos permiten sacar conclusiones respecto a las diferentes fases del aprendizaje y la memoria, por lo que serían necesarios nuevos experimentos para esclarecer este punto.

En el hipocampo y la corteza prefrontal, los receptores NMDA están compuestos principalmente por un homodímero de dos subunidades GluN1 y otro de dos subunidades GluN2A o GluN2B. La subunidad GluN1 es esencial para la inserción en la membrana del receptor NMDA, por lo que es un componente indispensable del receptor. En cambio, las subunidades GluN2A y GluN2B actúan más bien como moduladoras de la función del receptor, ya que determinan su papel en procesos de plasticidad sináptica al conferirle propiedades distintas según cuál de ellas esté presente (Monaco *et al.*, 2015). Nuestros resultados muestran que, en el hipocampo de ratas hiperamonémicas, la expresión en membrana de las subunidades GluN1 y GluN2A está disminuida mientras que la de GluN2B está aumentada. El tratamiento con IL-1Ra restaura la expresión en membrana de GluN2A, lo cual podríamos relacionar con la recuperación de la memoria de trabajo. En cambio, la expresión en membrana de GluN2B permanece elevada tras el tratamiento con IL-1Ra. Esto podría, al menos en parte, ser la causa de que no se recupere la memoria espacial de referencia, ya que se ha visto que los receptores NMDA que contienen la subunidad GluN2B favorecen la depresión a largo plazo (LTD) en lugar de la potenciación (LTP) (Li *et al.*, 2006), que es muy importante para el aprendizaje espacial. Además, también está descrito que la activación excesiva del receptor NMDA impide la retención de las tareas de aprendizaje espacial en determinadas circunstancias (Shinohara y Hata, 2014).

Diversos estudios han demostrado la importancia de la activación del receptor NMDA también en la corteza prefrontal para una adecuada memoria de trabajo (Aultman y Moghaddam, 2001; Auger y Floresco, 2017). Existe algo de controversia en cuanto a la implicación relativa de GluN2A y GluN2B en corteza prefrontal en la memoria de trabajo. Algunos estudios indican que los receptores NMDA que contienen GluN2A en la corteza prefrontal son los principales responsables de una correcta memoria de trabajo (McQuail *et al.*, 2016; Auger & Floresco, 2017), mientras que otros trabajos respaldan la importancia de la subunidad GluN2B en dicho cometido (Monaco *et al.*, 2015). Tanto GluN2A como GluN2B, y también la subunidad GluN1, tienen su expresión en membrana

DISCUSIÓN

reducida en la corteza prefrontal de las ratas hiperamonémicas. Por tanto, aunque GluN2A y GluN2B también están alteradas, la pérdida de GluN1 en la membrana sería en este caso el mayor desencadenante de la alteración en la función del receptor NMDA en la corteza prefrontal que podría estar afectando a la memoria de trabajo. El bloqueo del receptor de IL-1 restaura la expresión en membrana de GluN1, GluN2A y GluN2B en la corteza prefrontal de ratas hiperamonémicas, lo cual indica que podría ser otro de los puntos modulados por la IL-1 β que deteriora la memoria de trabajo en estas ratas, y cuya reversión por IL-1Ra contribuiría a restaurar la memoria de trabajo.

Aunque por lo que sabemos no hay estudios detallados sobre el papel de los receptores AMPA de la corteza prefrontal en la memoria de trabajo, hay algunos trabajos destacables. Por ejemplo, se ha descrito la importancia de la subunidad GluA1 en corteza para la memoria de trabajo espacial (Freudenberg *et al.*, 2013). Wincott y colaboradores (2014) demostraron que la reducción en la presencia post-sináptica de GluA1 en corteza prefrontal se relaciona con una reducción en la memoria de trabajo en el laberinto radial. Nuestros resultados muestran que tanto GluA1 como GluA2 tienen su expresión en membrana disminuida en la corteza prefrontal de ratas hiperamonémicas, y que el tratamiento con IL-1Ra la restaura. No obstante, el papel de la modulación de la expresión en membrana de los receptores AMPA por IL-1 β en la corteza prefrontal de ratas hiperamonémicas en la alteración de la memoria de trabajo es sólo hipotético y debe ser estudiado más a fondo.

La importancia del receptor GABA_A en corteza prefrontal para la memoria de trabajo también ha sido demostrada por algunos estudios (Auger and Floresco, 2014 y 2017). La mayoría de los receptores GABA_A en el cerebro contienen la subunidad α 1 (Vithlani *et al.*, 2011), siendo también una de las principales subunidades expresadas en la corteza (Pirker *et al.*, 2000). En las ratas hiperamonémicas, la expresión en membrana de la subunidad α 1 está disminuida en corteza prefrontal y se restaura con el tratamiento con IL-1Ra, por lo que podría estar contribuyendo también a las alteraciones en la memoria de trabajo de estas ratas.

En cuanto a los receptores GABA_A en el hipocampo, la subunidad α 1 también es muy abundante en esta región (Pirker *et al.*, 2000). La hiperamonemia reduce la expresión en membrana de la subunidad α 1 por un mecanismo dependiente de IL-1 β , ya que el tratamiento con IL-1Ra la recupera. Se ha descrito la importancia de las interneuronas GABAérgicas parvalbúmina-positivas del hipocampo en la memoria de trabajo en el laberinto radial, mientras que parece que no intervienen en la memoria espacial de referencia (Murray *et al.*, 2011). Estas interneuronas GABAérgicas expresan

abundantemente la subunidad $\alpha 1$ (Szodorai *et al.*, 2018), por lo que la disminución de su expresión en membrana en el hipocampo de ratas hiperamonémicas podría estar relacionada con las alteraciones de la memoria de trabajo que presentan estas ratas.

1.3.2. Memoria de reconocimiento.

En lo que respecta a la memoria de reconocimiento, el estudio de la literatura indica que la corteza prefrontal interviene específicamente cuando la tarea requiere la integración de diferentes tipos de información, por ejemplo, una combinación de objeto y espacio o tiempo y objeto, pero no cuando se puede resolver siguiendo una estrategia simple, como es el caso del reconocimiento de objetos o de localizaciones espaciales analizado en esta tesis (Morici *et al.*, 2015). En cambio, el hipocampo participa en el reconocimiento simple tanto de objetos como de localizaciones espaciales (Mumby *et al.*, 2002; Broadbent *et al.*, 2004; Hammond *et al.*, 2004; Barker & Warburton, 2011). Por tanto, nuestros resultados acerca de la expresión en membrana de receptores en el hipocampo podrían darnos información acerca de los mecanismos por los cuales la IL-1 β altera la memoria de reconocimiento en ratas hiperamonémicas.

Diversos estudios avalan la importancia de los receptores NMDA en el hipocampo para la memoria de reconocimiento, dado que la inyección sistémica (De Lima *et al.*, 2005) o específicamente en el hipocampo (Iwamura *et al.*, 2016) de inhibidores del receptor NMDA empeora el reconocimiento de objetos. Además, en un modelo de traumatismo en rata, se ha visto un deterioro de la memoria de reconocimiento asociado a activación de la microglía, disminución de la respuesta mediada por los receptores NMDA y de la LTP en hipocampo (Aungst *et al.*, 2014). Si bien nuestros resultados muestran que la expresión en membrana de GluN1 en hipocampo, disminuida en hiperamonemia, no se restaura tras el tratamiento con IL-1Ra como sí ocurre con el reconocimiento de objetos, la implicación de GluN2A en la LTP (Li *et al.*, 2006) apoya que la normalización de la expresión en membrana de esta subunidad podría contribuir a recuperar la memoria de reconocimiento.

En cuanto al papel de los receptores AMPA, Schiapparelli y colaboradores (2006) mostraron que el tratamiento con antagonistas de estos receptores también deteriora el reconocimiento de objetos, relacionado con una disminución en los niveles de GluA1 y también de GluA2 en hipocampo. Esto concuerda parcialmente con nuestros resultados, ya que la recuperación de la memoria de reconocimiento de objetos en las ratas hiperamonémicas tras el tratamiento con IL-1Ra viene acompañada de la normalización

DISCUSIÓN

de la expresión en membrana de GluA1 en el hipocampo. En cambio, las alteraciones que ocurren en GluA2 no se revierten, por lo que esta subunidad no parece estar implicada en nuestro caso. Otro estudio, en un modelo de Parkinson en rata, demostró que el deterioro del reconocimiento de objetos se asocia a una disminución de la LTP, así como de la fosforilación de la CaMKII en la Thr286 y de GluA1 en la Ser831 (Moriguchi *et al.*, 2012). Esto resulta interesante ya que la fosforilación del residuo Ser831 de GluA1 por la CaMKII, que aumenta su expresión en membrana en un mecanismo crucial en la LTP (Qin, 2005), está disminuida en el hipocampo de ratas hiperamonémicas por acción de la IL-1 β , tal y como se expone en el apartado 2.1 de los Resultados de esta tesis. Por tanto, parece más que probable que las alteraciones mediadas por la IL-1 β de la expresión en membrana de GluA1 en el hipocampo contribuyan a las alteraciones en la memoria de reconocimiento.

En cuanto al papel del receptor GABA_A en la memoria de reconocimiento, diversos estudios en diferentes modelos muestran que el bloqueo de este receptor, ya sea a nivel periférico o localmente en el hipocampo, mejora este tipo de memoria (Ruby *et al.*, 2013; Nishimura *et al.*, 2017; Neugebauer *et al.*, 2018). Nuestros resultados muestran que, paralelamente a lo que ocurre con el reconocimiento de objetos, la expresión en membrana de la subunidad α 1 del receptor de GABA_A disminuye en el hipocampo de ratas hiperamonémicas y se restaura tras el tratamiento con IL-1Ra. Sin embargo, no parece que ambos procesos estén relacionados, puesto que, si bien en la literatura no hay información sobre la implicación de subunidades concretas, lo que está descrito es un papel negativo de la actividad del receptor de GABA_A sobre la memoria de reconocimiento.

Finalmente, hay que señalar que el tratamiento con IL-1Ra tiene algunos efectos sobre la expresión en membrana de receptores en las ratas control. En concreto, aumenta la expresión en membrana de las subunidades GluA2 y GluN2B en el hipocampo y GluN1 en corteza prefrontal, a la vez que disminuye la de la subunidad α 1 en esta misma región. Al menos el aumento de GluN2B podría estar relacionado con el empeoramiento de la memoria espacial y de trabajo de las ratas control en el laberinto radial.

En esta tesis se muestra que en ratas con hiperamonemia crónica, similar a la que presentan los pacientes con cirrosis hepática, el bloqueo del receptor de IL-1, reduce la activación de la microglía, revierte algunas de las alteraciones cognitivas y frena los mecanismos de alteración de la expresión en membrana de los receptores AMPA desencadenados por la IL-1 β . Además, se ha descrito que el tratamiento con IL-1Ra también previene alteraciones en la LTP causadas por la IL-1 β (Cunningham *et al.*, 1996).

Por ello, el IL-1Ra se revela como un potencial tratamiento contra la neuroinflamación inducida por la hiperamonemia en pacientes con encefalopatía hepática mínima.

El antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), o anakinra en su forma comercial, ya se emplea a nivel periférico en pacientes para el tratamiento de diversas enfermedades autoinmunes (Dinarelli *et al.*, 2009) y en ensayos clínicos para el tratamiento de la neuroinflamación asociada a traumatismos (Emsley *et al.*, 2005).

2. MECANISMOS MOLECULARES DE LAS ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO EN EL HIPOCAMPO DE RATAS HIPERAMONÉMICAS.

La segunda parte de esta tesis (apartado 2 de Resultados) se ha dedicado a dilucidar de forma detallada los mecanismos moleculares por los cuales la IL-1 β altera la expresión en membrana de receptores de glutamato, AMPA y NMDA, en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

En concreto, hemos identificado dos vías de señalización por las que se altera, respectivamente, la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA. Los niveles de IL-1 β están aumentados en el hipocampo de las ratas hiperamonémicas, lo cual activa, a través del receptor de IL-1, a la tirosín-quinasa Src por fosforilación en la Tyr416. Estos pasos son comunes a las vías que conducen a la alteración de la expresión en membrana tanto de GluA1 como de GluA2. La contribución del receptor de IL-1 y de Src se confirma porque al bloquear el receptor de IL-1 con IL-1Ra o inhibir Src con PP2, incubando las rodajas de hipocampo con estos compuestos, se revierten las alteraciones en la expresión en membrana de GluA1 y GluA2. No obstante, tras la activación de Src, la vía diverge en dos ramas diferentes. Por un lado, Src fosforila a la subunidad GluN2B del receptor NMDA en la Tyr1472 aumentando su expresión en membrana, lo cual induce la activación de p38 por fosforilación. Una vez activada, p38 se une a la PKC ζ reduciendo su fosforilación en la Thr560 y su actividad quinasa. El resultado final es una disminución de la fosforilación de GluA2 en la Ser880, lo cual impide su endocitosis aumentando su expresión en membrana (Fig. 29 y 37). Estas alteraciones en la expresión en membrana y fosforilación de GluA2 revierten al bloquear los receptores NMDA que contienen la subunidad GluN2B con ifenprodil o al inhibir p38 con SB239063, lo cual confirma el papel de ambos en las alteraciones mencionadas.

DISCUSIÓN

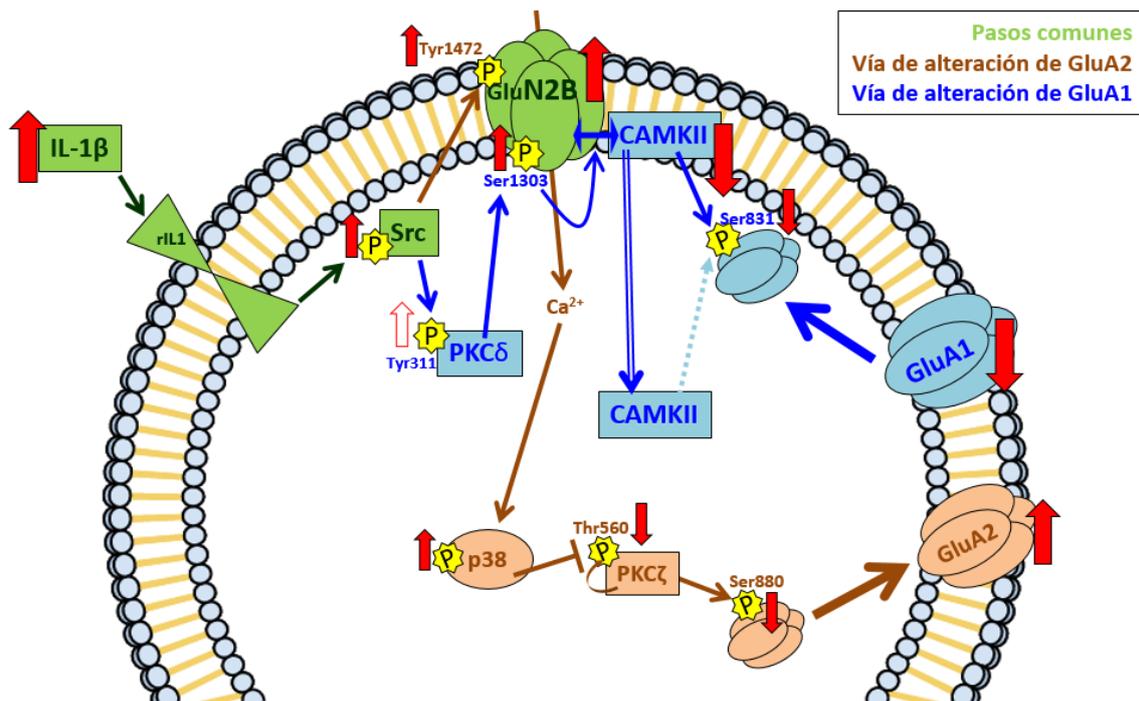


Figura 37. Superposición de los mecanismos moleculares por los cuales la IL-1 β altera la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA en el hipocampo de ratas hiperamonémicas (reproducción de la figura 29).

Por otro lado, la alteración en la expresión en membrana de GluA1 también está mediada por el receptor de IL-1 y Src, pero a partir de ahí la vía diverge de la de GluA2. El aumento de la fosforilación de Src en las ratas hiperamonémicas activa a su vez a la PKC δ , que fosforila la subunidad GluN2B en la Ser1303, impidiendo la asociación de la CaMKII al receptor NMDA y reduciendo su presencia en la densidad post-sináptica, lo cual disminuye finalmente la fosforilación de GluA1 en la Ser831 y su expresión en membrana. Estos pasos pueden revertirse bloqueando el receptor de IL-1 con IL-1Ra, inhibiendo Src con PP2 o la PKC δ con rottlerina, lo que apoya la contribución de todos estos pasos a la vía propuesta en las figuras 29 y 37, que explican las alteraciones en la fosforilación y expresión en membrana de GluA1 en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

La modulación de la expresión en membrana de los receptores AMPA es clave en procesos de plasticidad sináptica que tienen lugar en el hipocampo (Anggono y Hugarir, 2012). La potenciación (LTP) y depresión (LTD) a largo plazo están mediadas respectivamente por un aumento o disminución en la expresión en membrana de los receptores AMPA en las neuronas post-sinápticas (Kullmann, 1999; Malinow, 2003). La LTP en el hipocampo se considera la base del aprendizaje y la memoria espacial (Richter-Levin y Bliss, 1995). Tanto la LTP en el hipocampo (Muñoz *et al.*, 2000) como el aprendizaje y la memoria espacial (Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a) están disminuidos en las ratas hiperamonémicas.

Las alteraciones en la modulación de la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 en las ratas hiperamonémicas identificadas en esta tesis podrían ser un desencadenante importante de las alteraciones descritas en la LTP y el aprendizaje espacial, pero también en la memoria de trabajo y de reconocimiento (ver apartado 1.3 de la Discusión). Nuestros resultados muestran que las alteraciones en la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 en el hipocampo de ratas hiperamonémicas son consecuencia de la neuroinflamación que presentan, y en concreto de una sobreactivación del receptor de IL-1 debido al aumento en los niveles de IL-1 β . Ya se ha descrito que niveles elevados de IL-1 β reducen la LTP (Murray y Lynch, 1998). Todos estos datos apoyan la hipótesis de que en las ratas hiperamonémicas (y probablemente en otras situaciones patológicas) el aumento en los niveles de IL-1 β en el hipocampo altera la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA, lo cual conduciría al deterioro de la LTP y del aprendizaje y memoria espaciales.

Existen evidencias en la literatura que demuestran la existencia de diferentes pasos de la vía propuesta en la figura 37. Así, se ha visto que la fosforilación por Src del residuo Tyr1472 de GluN2B aumenta su expresión en membrana (Viviani *et al.*, 2006); que el calcio que entra a través de los receptores NMDA que contienen la subunidad GluN2B activa de forma preferencial a p38 (Li *et al.*, 2006); y que la forma fosforilada de p38 es capaz de unirse físicamente a la PKC ζ impidiendo su activación por auto-fosforilación y reduciendo su actividad (Kim *et al.*, 2005). Estudios previos ya han mostrado que existe una sobreactivación de p38 en modelos de encefalopatía hepática con fallo hepático crónico, sugiriendo además su potencial terapéutico como antiinflamatorio alternativo a los no esteroideos para pacientes con fallo hepático (Agustí *et al.*, 2011).

Los resultados expuestos muestran que los pasos de la vía esquematizada en la figura 37 ocurren de forma secuencial en el hipocampo de ratas hiperamonémicas tras la activación del receptor de IL-1, aumentando finalmente la expresión en membrana de GluA2. El bloqueo del receptor de IL-1 previene todos los pasos siguientes de la vía, lo cual confirma su implicación al principio de ésta. La inhibición de Src con PP2 previene los cambios en la fosforilación y expresión en membrana de GluN2B así como en fosforilación de p38, PKC ζ y el residuo Ser880 de GluA2, normalizando además también su expresión en membrana, lo cual demuestra que la activación de Src precede todos estos pasos posteriores. De manera similar, el bloqueo de GluN2B con ifenprodil previene las alteraciones en la fosforilación de p38, PKC ζ y el residuo Ser880 de GluA2, normalizando también su expresión en membrana, indicando que GluN2B precede estos pasos. Finalmente, la inhibición de p38 con SB239063 previene los cambios en la

DISCUSIÓN

fosforilación y la expresión en membrana de GluA2. En conjunto, todos estos resultados muestran que la hiperamonemia induce la activación secuencial de la vía descrita en la figura 22 modulando la expresión en membrana de GluA2.

Además, esta vía estaría ocurriendo en neuronas y no en astrocitos, lo cual está apoyado por las observaciones de Srinivasan *et al.* (2004), quienes demostraron que la IL-1 β activa la vía de señalización de p38 en neuronas de hipocampo y la de NF- κ B (factor nuclear kappa B) en astrocitos, señalando una diferenciación funcional según el tipo celular en cuanto al efecto de la IL-1 β en el cerebro. Sin embargo, estos investigadores no analizaron si la activación de p38 es un efecto directo de la IL-1 β o existen pasos intermedios. Lo que demuestran nuestros resultados es que el bloqueo del receptor de IL-1, Src o la subunidad GluN2B el receptor NMDA reducen la fosforilación de p38, apoyando la idea de que su activación por IL-1 β está además mediada por Src y GluN2B.

Respecto a la vía de alteración de GluA1, también hay trabajos en la literatura que han señalado previamente la existencia de estos pasos intermedios propuestos en la figura 37. Se ha demostrado que Src fosforila a la PKC δ en la Tyr311 aumentando su actividad (Chen *et al.*, 2016) y que la fosforilación de GluN2B en la Ser1303 reduce la expresión en membrana de la CaMKII (Strack *et al.*, 2000). Lo que demuestran nuestros resultados es que todos estos pasos ocurren secuencialmente en el hipocampo de ratas hiperamonémicas tras la activación del receptor de IL-1, reduciendo finalmente la expresión en membrana de GluA1.

Tanto en el caso de la vía de GluA2 como de la de GluA1, la transducción de señales es un proceso muy rápido, ya que observamos cambios en las rodajas *ex vivo* con tiempos de incubación de 20 min. La fosforilación y expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA están sometidas a rápidas modulaciones inducidas en procesos de plasticidad sináptica o en respuesta a determinados estímulos. Los resultados expuestos anteriormente demuestran que, en las condiciones empleadas en esta tesis, la hiperamonemia altera estas vías como se representa en la figura 37.

Los datos anteriores demuestran que la neuroinflamación inducida por la hiperamonemia en el hipocampo altera la neurotransmisión glutamatérgica alterando la expresión en membrana de determinadas subunidades de los receptores AMPA y NMDA. Además, dichas alteraciones están mediadas por el aumento en los niveles de IL-1 β y la activación del receptor de IL-1, habiéndose identificado las vías de señalización intracelular implicadas.

Es digno de mención el hecho de que la neuroinflamación podría estar alterando los receptores AMPA también por otros mecanismos. Por ejemplo, el TNF α altera también la expresión en membrana de las subunidades del receptor AMPA. Curiosamente, los efectos de la IL-1 β y el TNF α sobre la expresión en membrana de los receptores AMPA son opuestos. La

IL-1 β reduce la expresión en membrana de la subunidad GluA1, mientras que el TNF α la aumenta y reduce la de GluA2 (Beattie *et al.*, 2002; Stellwagen *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2006; Ferguson *et al.*, 2008). Esto indica que diferentes tipos o grados de neuroinflamación pueden inducir alteraciones diferentes en la expresión en membrana de los receptores AMPA según la prevalencia de la IL-1 β o el TNF α .

El TNF α aumenta selectivamente la expresión en membrana de GluA1 en neuronas de hipocampo, aumentando la proporción de receptores carentes de GluA2, lo que modifica las propiedades de los receptores AMPA, haciéndolos permeables al calcio (Stellwagen *et al.*, 2005). La inyección in vivo de TNF α en ratas también aumenta la expresión sináptica de GluA1 y disminuye la de GluA2 (Ferguson *et al.*, 2008). Por el contrario, altas concentraciones de IL-1 β reducen la expresión en membrana de GluA1 (Lai *et al.*, 2006). Los resultados presentados en esta tesis muestran que, en ratas hiperamonémicas, el aumento en los niveles de IL-1 β reduce la expresión en membrana de GluA1 y aumenta la de GluA2, a través de la activación del receptor de IL-1.

No obstante, aunque los efectos de la IL-1 β y el TNF α sobre la expresión en membrana de los receptores AMPA son opuestos, en ambos casos desembocan en una alteración de la neurotransmisión glutamatérgica. El aumento sostenido en los niveles de IL-1 β o TNF α altera la LTP hipocampal (Cunningham *et al.*, 1996), mientras que niveles altos de IL-1 β alteran el aprendizaje y la memoria espacial (Gibertini *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 2009), la memoria de trabajo (Sparkman *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2018) y la memoria de reconocimiento (Wang *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2015; Bassani *et al.*, 2017). Estudios recientes sugieren que el TNF α también afecta al aprendizaje espacial (Golan *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2011). Una limitación importante de esta tesis es que los efectos descritos podrían estar circunscritos a un determinado período de tiempo en la escala de progresión temporal de la hiperamonemia crónica. Nuestros resultados se han obtenido en ratas con 4-5 semanas de hiperamonemia. Sin embargo, el tipo o grado de neuroinflamación podrían ser diferentes a tiempos más largos, desencadenando otros mecanismos. Varios estudios, citados ya anteriormente, apuntan que la neuroinflamación podría alterar la neurotransmisión en el hipocampo y el aprendizaje espacial por diferentes mecanismos según el tipo y grado de neuroinflamación, por ejemplo, en función de la contribución relativa de la IL-1 β y el TNF α (Cunningham *et al.*, 1996; Gibertini *et al.*, 1995; Beattie *et al.*, 2002; Golan *et al.*, 2004; Stellwagen *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2006; Ferguson *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2009; Gong *et al.*, 2011). Esto podría explicar las discrepancias entre los efectos descritos aquí para 4-5 semanas de hiperamonemia y otros resultados previos (Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a) en los que se

DISCUSIÓN

describe un aumento de la expresión en membrana de GluA1 y una disminución de GluA2 a 8 semanas de hiperamonemia. Esto podría ser debido a un papel preponderante de los efectos de un aumento de TNF α a tiempos más largos.

Resultados preliminares de nuestro grupo indican que, en ratas hiperamonémicas, la neuroinflamación es un proceso dinámico y cambia con el tiempo, dando lugar a diferentes estadios con distintos patrones de marcadores inflamatorios. Este tipo de dinamismo en la neuroinflamación ha sido descrito también en otras situaciones patológicas como el Parkinson (Maia *et al.*, 2012), ictus (Thiel *et al.*, 2010; Walberer *et al.*, 2010), isquemia (van Ham *et al.*, 2014), esclerosis lateral amiotrófica, SIDA y esclerosis múltiple (Agius, 2012).

Esta progresión en las características de la neuroinflamación, y sus consecuencias sobre la neurotransmisión, sugiere que los tratamientos destinados a revertir deterioros cognitivos asociados a procesos neuroinflamatorios deberían ser diferentes en función de las características concretas del proceso en cada caso, que podrían ser diferentes en situaciones patológicas distintas.

3. MECANISMOS MOLECULARES DE LA MODULACION POR GMPc EXTRACELULAR DE LAS ALTERACIONES CAUSADAS POR LA HIPERAMONEMIA Y LA NEUROINFLAMACIÓN EN LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE RECEPTORES EN EL HIPOCAMPO.

En esta tesis también hemos caracterizado los mecanismos por los cuales el GMPc extracelular revierte las alteraciones causadas por la neuroinflamación en la expresión en membrana de receptores AMPA y NMDA en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. Dichos mecanismos parecen ser debidos, principalmente, a la reducción mediada por el GMPc extracelular en la respuesta neuroinflamatoria en el hipocampo de ratas hiperamonémicas, concretamente en la activación de la microglía y el aumento de los niveles de IL-1 β .

Estudios *in vivo* han mostrado previamente que los niveles de GMPc extracelular están reducidos en el cerebro de ratas hiperamonémicas, y que su recuperación mediante administración intracerebral restaura el aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y, la coordinación motora y la memoria de referencia espacial en este modelo de encefalopatía hepática mínima (Erceg *et al.*, 2005b; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a y 2018).

Mientras que la recuperación de la coordinación motora y del aprendizaje en el laberinto en Y se relacionan con la normalización de los niveles extracelulares de GABA en cerebelo (Cauli *et al.*, 2009; Cabrera-Pastor *et al.*, 2018), la reparación de la memoria espacial de referencia sería debida a la normalización de la expresión en membrana de los receptores AMPA en el hipocampo (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a). En esta parte de la tesis, hemos abordado el estudio

de los mecanismos moleculares por los cuales el GMPc extracelular normaliza la expresión en membrana de los receptores AMPA en el hipocampo de ratas hiperamonémicas mediante experimentos ex vivo en rodajas frescas, lo cual nos permite analizar las vías de señalización implicadas.

Como se ha discutido en el apartado anterior, la fosforilación de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en la Ser831 y de la subunidad GluA2 en la Ser880 están disminuidas en rodajas de hipocampo de ratas hiperamonémicas, lo cual explica la reducción en la expresión en membrana de GluA1 y el aumento de GluA2. Los resultados de los experimentos con adición de GMPc extracelular muestran que dicho tratamiento normaliza la expresión en membrana de GluA1 y GluA2 restaurando la fosforilación de estos dos residuos clave.

En cuanto a cómo lo hace, el GMPc extracelular normaliza no sólo la presencia de la CaMKII en membrana, sino también su activación por fosforilación en la Thr286, que en hiperamonemia está disminuida. Esto, tal y como se describe en el apartado anterior, facilita la fosforilación de la Ser831 y la restauración de la expresión en membrana de GluA1. Como también se ha mencionado antes, el proceso que desencadena las alteraciones en la asociación de la CaMKII a la membrana incluye la activación previa de Src. El GMPc extracelular reduce la fosforilación de Src, lo cual sería responsable de la normalización en la CaMKII.

En cuanto a la subunidad GluA2, ya se ha comentado previamente que la fosforilación de la Ser880 está disminuida en hiperamonemia, como consecuencia de una inhibición, mediada por p38, de la PKC ζ . El tratamiento con GMPc extracelular en rodajas de hipocampo de ratas hiperamonémicas reduce la fosforilación de p38, aumentando la activación de la PKC ζ por auto-fosforilación en la Thr560.

La sobreactivación de la p38 por fosforilación causada por la hiperamonemia se debe a un aumento en la expresión en membrana de los receptores NMDA que contienen la subunidad GluN2B, debida a un aumento en el residuo de Tyr1472 de dicha subunidad como consecuencia del aumento en la activación de Src. El GMPc extracelular normaliza tanto la fosforilación de Src, como la de la Tyr1472 y la expresión en membrana de GluN2B en el hipocampo de ratas hiperamonémicas, lo cual explicaría su efecto sobre p38 y, en definitiva, sobre el aumento en la expresión en membrana de GluA2 causado por la hiperamonemia.

Como se expone en el apartado 2.3 de Resultados, el principal desencadenante de la activación de Src en el hipocampo es el aumento en los niveles del IL-1 β , que activa a Src a través de su receptor de IL-1. Nuestros resultados muestran, además, que el GMPc extracelular estaría reduciendo la fosforilación de Src en el hipocampo de ratas hiperamonémicas porque también disminuye los niveles de IL-1 β .

DISCUSIÓN

La neuroinflamación inducida por la hiperamonemia, con el correspondiente aumento de IL-1 β , parece estar causada por la activación de la microglía, según resultados mostrados en esta tesis y estudios previos (Rodrigo *et al.*, 2010; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a). Por tanto, analizamos si el tratamiento con GMPc extracelular reduce la activación de la microglía en rodajas de hipocampo de ratas hiperamonémicas, y los resultados muestran que efectivamente es lo que ocurre.

En resumen, como se resume en la figura 38, los resultados expuestos en el apartado 3 muestran que el GMPc extracelular reduce la activación de la microglía en el hipocampo de ratas hiperamonémicas, disminuyendo así los niveles de IL-1 β y la activación del receptor de IL-1.

Como consecuencia de ello, disminuye la activación de Src y se restaura la unión a la membrana y la actividad de la CaMKII, revirtiendo la disminución inducida por la hiperamonemia en la fosforilación y expresión en membrana de la subunidad GluA1 del receptor AMPA. Por otro lado, la disminución de la activación de Src también normaliza la fosforilación y expresión en membrana de GluN2B, lo cual reduce la activación de p38 y restaura la activación por autofosforilación de la PKC ζ , revirtiéndose así también las alteraciones causadas por la hiperamonemia en la fosforilación y expresión en membrana de GluA2.

Los mecanismos y vías de señalización alterados en hiperamonemia podrían estar alterados de manera similar en otras patologías. Por ejemplo, se ha visto que los niveles de GMPc en líquido cefalorraquídeo están disminuidos en pacientes con Alzheimer, lo cual sería un reflejo de una disminución de los niveles de GMPc extracelular en el cerebro, incluyendo el hipocampo. Además, los niveles de GMPc en líquido cefalorraquídeo están asociados con demencia y la aparición de beta-amiloide en pacientes con Alzheimer (Ugarte *et al.*, 2015). Una disminución similar en los niveles de GMPc en líquido cefalorraquídeo ha sido descrita en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Oeckl *et al.*, 2012).

Se ha propuesto que la disminución en los niveles de GMPc en estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer podría estar relacionada con el deterioro cognitivo (Ugarte *et al.*, 2015). Esto coincide con otros trabajos en los cuales se muestra que el aumento de GMPc mediante tratamiento con sildenafil (inhibidor de la fosfodiesterasa 5, PDE5) restaura la función cognitiva sin afectar a los depósitos de beta-amiloide en un modelo de Alzheimer en ratón. Los autores proponen, en base a estos datos, el potencial terapéutico del sildenafil como tratamiento para el Alzheimer (Cuadrado-Tejedor *et al.*, 2011). Efectos similares han sido obtenidos mediante tratamiento con tadalafilo, otro inhibidor de la PDE5 que también aumenta los niveles de GMPc (García-Barroso *et al.*, 2013).

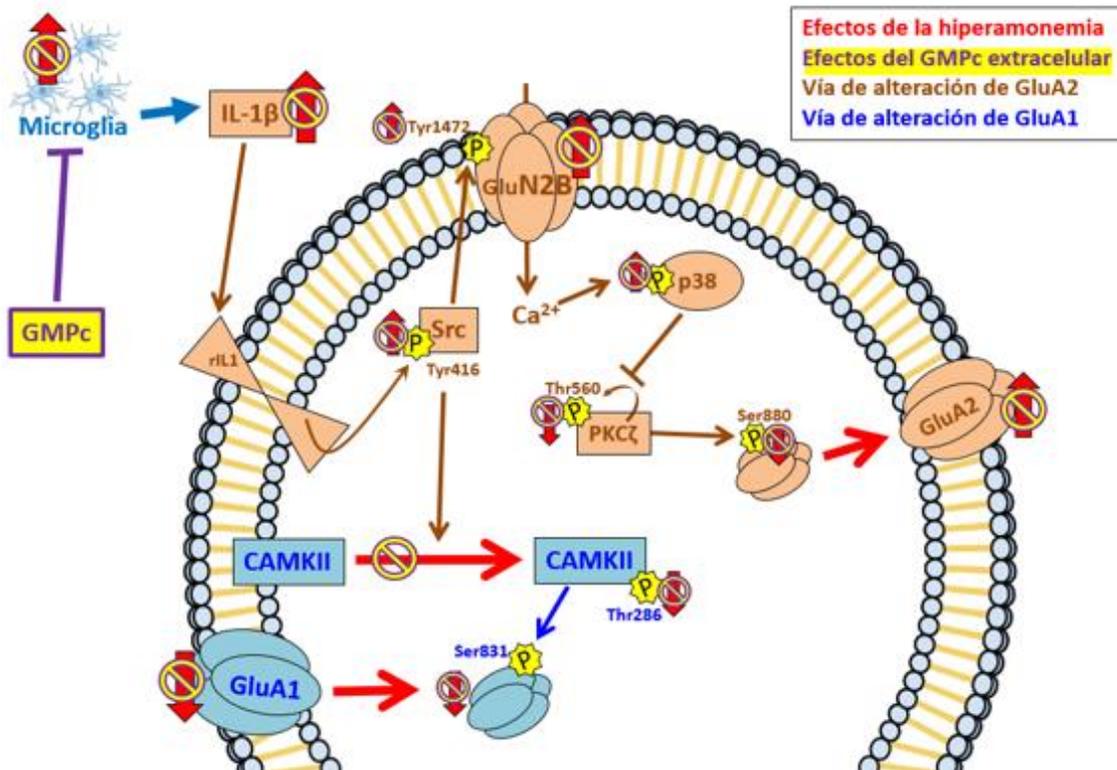


Figura 38. Esquema representativo de los mecanismos por los cuales el GMPc extracelular contrarresta las alteraciones inducidas por la hiperamonemia en la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA en el hipocampo (reproducción de la figura 35).

El sildenafil también restaura la función cognitiva en ratas con encefalopatía hepática (Hernández-Rabaza *et al.*, 2015) y ratones con enfermedad de Huntington (Saavedra *et al.*, 2013) y la modulación de los niveles de GMPc en hipocampo se ha propuesto como candidata para tratar los déficits cognitivos asociados a ambas patologías (Saavedra *et al.*, 2013; Hernández-Rabaza *et al.*, 2015). Hay que tener en cuenta, no obstante, que los inhibidores de fosfodiesterasas, como el tadalafilo o el sildenafil, aumentan tanto el GMPc intracelular como el extracelular, ya que parte del GMPc sintetizado intracelularmente sale al exterior a través de canales específicos. Por ello, en los experimentos con este tipo de aproximaciones es complicado discernir entre efectos intra y extracelulares del GMPc.

Estos estudios sugieren que la reducción de los niveles extracelulares de GMPc podría estar implicada en diversas enfermedades neurológicas y neurodegenerativas. Es muy probable que la disminución en los niveles de GMPc implique alteraciones en la expresión

DISCUSIÓN

en membrana de receptores AMPA en el hipocampo, lo que a su vez conduciría a alteraciones en el aprendizaje y la memoria. El aumento de GMPc extracelular en estas patologías podría modular las mismas vías de señalización descritas en esta tesis, normalizando los receptores AMPA y la función cognitiva, como en la hiperamonemia crónica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las ratas hiperamonémicas tienen alterados la memoria de trabajo y el aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto radial de 8 brazos, así como la memoria de reconocimiento de objetos y de localizaciones espaciales en los test correspondientes. El bloqueo del receptor de IL-1, mediante la administración intracerebral de IL-1Ra, restaura las alteraciones no espaciales (memoria de trabajo y reconocimiento de objetos) pero no las espaciales (memoria y aprendizaje espacial y reconocimiento de localizaciones espaciales). Por tanto, la IL-1 β es la responsable de las alteraciones cognitivas no espaciales que presentan las ratas hiperamonémicas, pero no de las alteraciones espaciales.
2. La hiperamonemia induce activación de la microglía en hipocampo, corteza prefrontal, corteza perirrinal y corteza postrinal. El tratamiento con IL-1Ra revierte la activación de la microglía en hipocampo, corteza prefrontal y corteza perirrinal, pero no en corteza postrinal, lo que indica que en ésta última región no es un proceso mediado por la IL-1 β .
3. La hiperamonemia aumenta los niveles de IL-1 β en hipocampo, corteza perirrinal y corteza prefrontal, lo cual se revierte tras el tratamiento con IL-1Ra en las dos primeras regiones. En corteza postrinal, la IL-1 β no está aumentada en hiperamonemia.
4. La hiperamonemia disminuye la expresión en membrana de las subunidades GluN1 y GluN2A del receptor NMDA, GluA1 del receptor AMPA y α 1 del receptor GABA_A en el hipocampo y aumenta la expresión en membrana de las subunidades GluN2B y GluA2. El bloqueo del receptor de IL-1 restaura la expresión en membrana de las subunidades GluN2A, GluA1 y α 1.
5. En corteza prefrontal, la hiperamonemia disminuye la expresión en membrana de las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B del receptor NMDA; GluA1 y GluA2 del receptor AMPA y α 1 del receptor GABA_A mediante un proceso mediado por la IL-1 β , ya que tras el tratamiento con IL-1Ra se normaliza la expresión en membrana de todas las subunidades.
6. El tratamiento con IL-1Ra en las ratas control deteriora la memoria de trabajo y la memoria espacial en el laberinto radial. Esto podría deberse a que induce activación

de la microglía en hipocampo y corteza prefrontal, así como un aumento en los niveles de IL-1 β en hipocampo. Además, el tratamiento con IL-1Ra aumenta la expresión en membrana de GluN1 en corteza prefrontal y GluA2 y GluN2B en hipocampo; mientras que disminuye la de GluA1 y α 1 en corteza prefrontal.

7. La activación del receptor de IL-1 aumenta la expresión en membrana de la subunidad GluA2 del receptor AMPA en el hipocampo de ratas hiperamonémicas disminuyendo su fosforilación en el residuo Ser880. Esto está mediado por la activación de Src, que fosforila a GluN2B en la Tyr1472 y aumenta su expresión en membrana, lo cual activa por fosforilación a p38 que, a su vez, impide la activación de PKC ζ por autofosforilación en el residuo Thr560.
8. La activación del receptor de IL-1 disminuye la expresión en membrana de la subunidad GluA1 del receptor AMPA en el hipocampo de ratas hiperamonémicas disminuyendo su fosforilación en el residuo Ser831. Esto se debe a una internalización de la CaMKII como consecuencia de la fosforilación de GluN2B en el residuo Ser1303 por PKC δ , que es activada por fosforilación de Src.
9. El GMPc extracelular normaliza la fosforilación y la expresión en membrana de GluA1 y GluA2 en el hipocampo de ratas hiperamonémicas disminuyendo la activación de la microglía y los niveles de IL-1 β . Al hacerlo, disminuye la activación de Src, GluN2B normaliza su expresión en membrana y disminuye la fosforilación de p38 desbloqueando la activación de PKC ζ , lo cual normaliza la fosforilación y expresión en membrana de GluA2. Además, la asociación a la membrana de la CaMKII y su fosforilación en la Thr286 también se normalizan, lo cual restaura la fosforilación y expresión en membrana de GluA1.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Agius, L.M. (2012). Neuroinflammation as the proximate cause of signature pathogenic pattern progression in amyotrophic lateral sclerosis, AIDS, and multiple sclerosis. *Patholog Res Int* 2012, 169270.
2. Aguilar, M.A., Miñarro, J., and Felipo, V. (2000). Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats. *Exp. Neurol.* 161, 704–713.
3. Agusti, A., Cauli, O., Rodrigo, R., Llansola, M., Hernández-Rabaza, V., and Felipo, V. (2011). p38 MAP kinase is a therapeutic target for hepatic encephalopathy in rats with portacaval shunts. *Gut* 60, 1572–1579.
4. Agusti, A., Hernández-Rabaza, V., Balzano, T., Taoro-Gonzalez, L., Ibañez-Grau, A., Cabrera-Pastor, A., Fustero, S., Llansola, M., Montoliu, C., and Felipo, V. (2017). Sildenafil reduces neuroinflammation in cerebellum, restores GABAergic tone, and improves motor incoordination in rats with hepatic encephalopathy. *CNS Neurosci Ther* 23, 386–394.
5. Ahluwalia, V., Wade, J.B., Heuman, D.M., Hammeke, T.A., Sanyal, A.J., Sterling, R.K., Stravitz, R.T., Luketic, V., Siddiqui, M.S., Puri, P., *et al.* (2014). Enhancement of functional connectivity, working memory and inhibitory control on multi-modal brain MR imaging with Rifaximin in Cirrhosis: implications for the gut-liver-brain axis. *Metab Brain Dis* 29, 1017–1025.
6. Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M., Cooper, N.R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B.L., *et al.* (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 21, 383–421.
7. Almeida-Suhett, C.P., Prager, E.M., Pidoplichko, V., Figueiredo, T.H., Marini, A.M., Li, Z., Eiden, L.E., and Braga, M.F.M. (2015). GABAergic interneuronal loss and reduced inhibitory synaptic transmission in the hippocampal CA1 region after mild traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 273, 11–23.
8. Amico-Ruvio, S.A., Paganelli, M.A., Myers, J.M., and Popescu, G.K. (2012). Ifenprodil effects on GluN2B-containing glutamate receptors. *Mol. Pharmacol.* 82, 1074–1081.
9. Amlal, H., and Soleimani, M. (1997). K⁺/NH₄⁺ antiporter: a unique ammonium carrying transporter in the kidney inner medulla. *Biochim. Biophys. Acta* 1323, 319–333.
10. Amodio, P., Montagnese, S., Gatta, A., and Morgan, M.Y. (2004). Characteristics of minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 19, 253–267.
11. Amtul, Z., and Atta-Ur-Rahman, null (2015). Neural plasticity and memory: molecular mechanism. *Rev Neurosci* 26, 253–268.
12. Andric, S.A., Kostic, T.S., and Stojilkovic, S.S. (2006). Contribution of multidrug resistance protein MRP5 in control of cyclic guanosine 5'-monophosphate intracellular signaling in anterior pituitary cells. *Endocrinology* 147, 3435–3445.

13. Anggono, V., and Huganir, R.L. (2012). Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology* 22, 461–469.
14. Arias, N., Méndez, M., and Arias, J.L. (2015). Differential contribution of the hippocampus in two different demanding tasks at early stages of hepatic encephalopathy. *Neuroscience* 284, 1–10.
15. Aronson, D.C., Chamuleau, R.A., Frederiks, W.M., Gooszen, H.G., Heijmans, H.S., and James, J. (1993). Reversibility of cholestatic changes following experimental common bile duct obstruction: fact or fantasy? *J. Hepatol.* 18, 85–95.
16. Auger, M.L., and Floresco, S.B. (2014). Prefrontal cortical GABA modulation of spatial reference and working memory. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18.
17. Auger, M.L., and Floresco, S.B. (2017). Prefrontal cortical GABAergic and NMDA glutamatergic regulation of delayed responding. *Neuropharmacology* 113, 10–20.
18. Aultman, J.M., and Moghaddam, B. (2001). Distinct contributions of glutamate and dopamine receptors to temporal aspects of rodent working memory using a clinically relevant task. *Psychopharmacology (Berl.)* 153, 353–364.
19. Aungst, S.L., Kabadi, S.V., Thompson, S.M., Stoica, B.A., and Faden, A.I. (2014). Repeated mild traumatic brain injury causes chronic neuroinflammation, changes in hippocampal synaptic plasticity, and associated cognitive deficits. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 1223–1232.
20. Avital, A., Goshen, I., Kamsler, A., Segal, M., Iverfeldt, K., Richter-Levin, G., and Yirmiya, R. (2003). Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity. *Hippocampus* 13, 826–834.
21. Azorín, I., Miñana, M.D., Felipo, V., and Grisolia, S. (1989). A simple animal model of hyperammonemia. *Hepatology* 10, 311–314.
22. Baddeley, A. (2003). Working memory: looking back and looking forward. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 829–839.
23. Bajaj, J.S., Saeian, K., Schubert, C.M., Hafeezullah, M., Franco, J., Varma, R.R., Gibson, D.P., Hoffmann, R.G., Stravitz, R.T., Heuman, D.M., *et al.* (2009). Minimal hepatic encephalopathy is associated with motor vehicle crashes: the reality beyond the driving test. *Hepatology* 50, 1175–1183.
24. Bajaj, J.S., Schubert, C.M., Heuman, D.M., Wade, J.B., Gibson, D.P., Topaz, A., Saeian, K., Hafeezullah, M., Bell, D.E., Sterling, R.K., *et al.* (2010). Persistence of cognitive impairment after resolution of overt hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 138, 2332–2340.

BIBLIOGRAFÍA

25. Balzano, T., Forteza, J., Molina, P., Giner, J., Monzó, A., Sancho-Jiménez, J., Urios, A., Montoliu, C., and Felipo, V. (2018). The Cerebellum of Patients with Steatohepatitis Shows Lymphocyte Infiltration, Microglial Activation and Loss of Purkinje and Granular Neurons. *Sci Rep* 8, 3004.
26. Barker, G.R., Bird, F., Alexander, V., and Warburton, E.C. (2007). Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *Journal of Neuroscience* 27, 2948–2957.
27. Barker, G.R.I., and Warburton, E.C. (2011). When is the hippocampus involved in recognition memory? *J. Neurosci.* 31, 10721–10731.
28. Barria, A., Derkach, V., and Soderling, T. (1997). Identification of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 32727–32730.
29. Bassani, T.B., Turnes, J.M., Moura, E.L.R., Bonato, J.M., Cópola-Segovia, V., Zanata, S.M., Oliveira, R.M.M.W., and Vital, M.A.B.F. (2017). Effects of curcumin on short-term spatial and recognition memory, adult neurogenesis and neuroinflammation in a streptozotocin-induced rat model of dementia of Alzheimer's type. *Behav. Brain Res.* 335, 41–54.
30. Basu, A., Krady, J.K., and Levison, S.W. (2004). Interleukin-1: A master regulator of neuroinflammation. *Journal of Neuroscience Research* 78, 151–156.
31. Beattie, E.C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J.C., Ha, B.K., Von Zastrow, M., Beattie, M.S., and Malenka, R.C. (2002). Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science* 295, 2282–2285.
32. Bellinger, F.P., Madamba, S., and Siggins, G.R. (1993). Interleukin 1 β inhibits synaptic strength and long-term potentiation in the rat CA1 hippocampus. *Brain Research* 628, 227–234.
33. Bengtsson, F., Nobin, A., Falck, B., Gage, F.H., and Jeppsson, B. (1986). Portacaval shunt in the rat: selective alterations in behavior and brain serotonin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 1611–1616.
34. Bentivoglio, M., Mariotti, R., and Bertini, G. (2011). Neuroinflammation and brain infections: historical context and current perspectives. *Brain Res Rev* 66, 152–173.
35. Bilbo, S.D., Smith, S.H., and Schwarz, J.M. (2012). A lifespan approach to neuroinflammatory and cognitive disorders: a critical role for glia. *J Neuroimmune Pharmacol* 7, 24–41.
36. Block, M.L., Zecca, L., and Hong, J.-S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 57–69.
37. Bon, C.L.M., and Garthwaite, J. (2003). On the Role of Nitric Oxide in Hippocampal Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* 23, 1941–1948.

38. Borán, M.S., Baltrons, M.A., and García, A. (2008). The ANP-cGMP-protein kinase G pathway induces a phagocytic phenotype but decreases inflammatory gene expression in microglial cells. *Glia* 56, 394–411.
39. Bormann, J. (2000). The “ABC” of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 16–19.
40. Boyer, L., Richieri, R., Dassa, D., Boucekine, M., Fernandez, J., Vaillant, F., Padovani, R., Auquier, P., and Lancon, C. (2013). Association of metabolic syndrome and inflammation with neurocognition in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res* 210, 381–386.
41. Broadbent, N.J., Squire, L.R., and Clark, R.E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *PNAS* 101, 14515–14520.
42. Bukanova, J.V., Solntseva, E.I., Kondratenko, R.V., and Skrebitsky, V.G. (2014). Glycine receptor in hippocampal neurons as a target for action of extracellular cyclic nucleotides. *Neurosci. Lett.* 561, 58–63.
43. Burgess, N., Maguire, E.A., and O’Keefe, J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35, 625–641.
44. Cabrera-Pastor, A., Taoro, L., Llansola, M., and Felipo, V. (2015). Roles of the NMDA receptor and EAAC1 transporter in the modulation of extracellular glutamate by low and high affinity AMPA receptors in the cerebellum in vivo: differential alteration in chronic hyperammonemia. *ACS Chemical Neuroscience* 6, 1913–1921.
45. Cabrera-Pastor, A., Hernández-Rabaza, V., Taoro-Gonzalez, L., Balzano, T., Llansola, M., and Felipo, V. (2016). In vivo administration of extracellular cGMP normalizes TNF- α and membrane expression of AMPA receptors in hippocampus and spatial reference memory but not IL-1 β , NMDA receptors in membrane and working memory in hyperammonemic rats. *Brain Behav. Immun.* 57, 360–370.
46. Cabrera-Pastor, A., Malaguarnera, M., Taoro-Gonzalez, L., Llansola, M., & Felipo, V. (2016). Extracellular cGMP modulates learning biphasically by modulating glycine receptors, CaMKII and glutamate-nitric oxide-cGMP pathway. *Scientific reports*, 6, 33124.
47. Cabrera-Pastor, A., Balzano, T., Hernández-Rabaza, V., Malaguarnera, M., Llansola, M., and 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.
48. Cagnin, A., Taylor-Robinson, S.D., Forton, D.M., and Banati, R.B. (2006). In vivo imaging of cerebral “peripheral benzodiazepine binding sites” in patients with hepatic encephalopathy. *Gut* 55, 547–553.

BIBLIOGRAFÍA

49. Cauli, O., Llansola, M., Erceg, S., and Felipo, V. (2006). Hypolocomotion in rats with chronic liver failure is due to increased glutamate and activation of metabotropic glutamate receptors in substantia nigra. *J. Hepatol.* *45*, 654–661.
50. Cauli, O., Mlili, N., Rodrigo, R., and Felipo, V. (2007). Hyperammonaemia alters the mechanisms by which metabotropic glutamate receptors in nucleus accumbens modulate motor function. *J. Neurochem.* *103*, 38–46.
51. Cauli, O., Rodrigo, R., Llansola, M., Montoliu, C., Monfort, P., Piedrafita, B., Mlili, N., Boix, J., Agustí, A., and Felipo, V. (2009). Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* *24*, 69–80.
52. Chen, Z.S., Lee, K., and Kruh, G.D. (2001). Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J. Biol. Chem.* *276*, 33747–33754.
53. Chen, J., Buchanan, J.B., Sparkman, N.L., Godbout, J.P., Freund, G.G., and Johnson, R.W. (2008). Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. *Brain Behav. Immun.* *22*, 301–311.
54. Chen, C.-J., Wu, C.-H., Liao, Y.-P., Hsu, H.-L., Tseng, Y.-C., Liu, H.-L., and Chiu, W.-T. (2012). Working memory in patients with mild traumatic brain injury: functional MR imaging analysis. *Radiology* *264*, 844–851.
55. Chen, C.-L., Wang, S.-H., Chan, P.-C., Shen, M.-R., and Chen, H.-C. (2016). Phosphorylation of E-cadherin at threonine 790 by protein kinase C δ reduces β -catenin binding and suppresses the function of E-cadherin. *Oncotarget* *7*, 37260–37276.
56. Cherniack, E.P. (2012). A berry thought-provoking idea: the potential role of plant polyphenols in the treatment of age-related cognitive disorders. *Br. J. Nutr.* *108*, 794–800.
57. Christensen, A.L. (1984). Neuropsychological investigation with Luria's methods. *Scand J Work Environ Health* *10 Suppl 1*, 33–34.
58. Chung, H.J., Xia, J., Scannevin, R.H., Zhang, X., and Huganir, R.L. (2000). Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *J. Neurosci.* *20*, 7258–7267.
59. Churchwell, J.C., and Kesner, R.P. (2011). Hippocampal-prefrontal dynamics in spatial working memory: interactions and independent parallel processing. *Behav. Brain Res.* *225*, 389–395.
60. Clausen, B.H., Lambertsen, K.L., Dagnæs-Hansen, F., Babcock, A.A., von Linstow, C.U., Meldgaard, M., Kristensen, B.W., Deierborg, T., and Finsen, B. (2016). Cell therapy centered on IL-1Ra is neuroprotective in experimental stroke. *Acta Neuropathologica* *131*, 775–791.

61. Clemmesen, J.O., Larsen, F.S., Kondrup, J., Hansen, B.A., and Ott, P. (1999). Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 29, 648–653.
62. Córdoba, J., Cabrera, J., Lataif, L., Penev, P., Zee, P., and Blei, A.T. (1998). High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis. *Hepatology* 27, 339–345.
63. Cuadrado-Tejedor, M., Hervias, I., Ricobaraza, A., Puerta, E., Pérez-Roldán, J.M., García-Barroso, C., Franco, R., Aguirre, N., and García-Osta, A. (2011). Sildenafil restores cognitive function without affecting β -amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *British Journal of Pharmacology* 164, 2029–2041.
64. Cull-Candy, S., Brickley, S., and Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 327–335.
65. Cull-Candy, S., Kelly, L., and Farrant, M. (2006). Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 288–297.
66. Cunningham, A.J., Murray, C.A., O'Neill, L.A., Lynch, M.A., and O'Connor, J.J. (1996). Interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumour necrosis factor (TNF) inhibit long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neurosci. Lett.* 203, 17–20.
67. Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernández-Rabaza, V., Gil-Perotín, S., Cubas-Núñez, L., García-Verdugo, J.-M., Agusti, A., *et al.* (2016a). Reducing Peripheral Inflammation with Infliximab Reduces Neuroinflammation and Improves Cognition in Rats with Hepatic Encephalopathy. *Front Mol Neurosci* 9, 106.
68. Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Agusti, A., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernández-Rabaza, V., Gomez-Gimenez, B., ElMlili, N., Llansola, M., *et al.* (2016b). Infliximab reduces peripheral inflammation, neuroinflammation, and extracellular GABA in the cerebellum and improves learning and motor coordination in rats with hepatic encephalopathy. *J Neuroinflammation* 13, 245.
69. Dalley, J.W., Cardinal, R.N., and Robbins, T.W. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 28, 771–784.
70. Das, S., and Potter, H. (1995). Expression of the Alzheimer amyloid-promoting factor antichymotrypsin is induced in human astrocytes by IL-1. *Neuron* 14, 447–456.
71. Das, S., Mishra, K.P., Ganju, L., and Singh, S.B. (2017). Andrographolide-A promising therapeutic agent, negatively regulates glial cell derived neurodegeneration of prefrontal cortex, hippocampus and working memory impairment. *Journal of Neuroimmunology* 313, 161–175.

BIBLIOGRAFÍA

72. De Flora, A., Guida, L., Franco, L., Zocchi, E., Pestarino, M., Usai, C., Marchetti, C., Fedele, E., Fontana, G., and Raiteri, M. (1996). Ectocellular in vitro and in vivo metabolism of cADP-ribose in cerebellum. *Biochem. J.* *320 (Pt 2)*, 665–671.
73. Deidda, G., Bozarth, I.F., and Cancedda, L. (2014). Modulation of GABAergic transmission in development and neurodevelopmental disorders: investigating physiology and pathology to gain therapeutic perspectives. *Front Cell Neurosci* *8*, 119.
74. Depino, A.M., Alonso, M., Ferrari, C., del Rey, A., Anthony, D., Besedovsky, H., Medina, J.H., and Pitossi, F. (2004). Learning modulation by endogenous hippocampal IL-1: Blockade of endogenous IL-1 facilitates memory formation. *Hippocampus* *14*, 526–535.
75. Devan, B.D., Sierra-Mercado, D., Jimenez, M., Bowker, J.L., Duffy, K.B., Spangler, E.L., and Ingram, D.K. (2004). Phosphodiesterase inhibition by sildenafil citrate attenuates the learning impairment induced by blockade of cholinergic muscarinic receptors in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *79*, 691–699.
76. Devan, B.D., Pistell, P.J., Daffin, L.W., Nelson, C.M., Duffy, K.B., Bowker, J.L., Bharati, I.S., Sierra-Mercado, D., Spangler, E.L., and Ingram, D.K. (2007). Sildenafil citrate attenuates a complex maze impairment induced by intracerebroventricular infusion of the NOS inhibitor Nomega-nitro-L-arginine methyl ester. *Eur. J. Pharmacol.* *563*, 134–140.
77. Dhiman, R.K., and Chawla, Y.K. (2009). Minimal hepatic encephalopathy. *Indian J Gastroenterol* *28*, 5–16.
78. Dinarello, C.A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* *117*, 3720–3732.
79. Domek-Łopacińska, K., and Strosznajder, J.B. (2005). Cyclic GMP metabolism and its role in brain physiology. *J. Physiol. Pharmacol.* *56 Suppl 2*, 15–34.
80. Eichenbaum, H., Yonelinas, A.P., and Ranganath, C. (2007). The Medial Temporal Lobe and Recognition Memory. *Annual Review of Neuroscience* *30*, 123–152.
81. Elizondo, A., Araya, J., Rodrigo, R., Poniachik, J., Csendes, A., Maluenda, F., Díaz, J.C., Signorini, C., Sgherri, C., Comporti, M., *et al.* (2007). Polyunsaturated fatty acid pattern in liver and erythrocyte phospholipids from obese patients. *Obesity (Silver Spring)* *15*, 24–31.
82. Emsley, H.C.A., Smith, C.J., Georgiou, R.F., Vail, A., Hopkins, S.J., Rothwell, N.J., Tyrrell, P.J., and Acute Stroke Investigators (2005). A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *76*, 1366–1372.
83. Ennaceur, A., Neave, N., and Aggleton, J.P. (1996). Neurotoxic lesions of the perirhinal cortex do not mimic the behavioural effects of fornix transection in the rat. *Behavioural Brain Research* *80*, 9–25.

84. Erceg, S., Monfort, P., Hernández-Viadel, M., Rodrigo, R., Montoliu, C., and Felipo, V. (2005a). Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology* 41, 299–306.
85. Erceg, S., Monfort, P., Hernandez-Viadel, M., Llansola, M., Montoliu, C., and Felipo, V. (2005b). Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain Res.* 1036, 115–121.
86. Esteban, J.A., Shi, S.-H., Wilson, C., Nuriya, M., Huganir, R.L., and Malinow, R. (2003). PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nature Neuroscience* 6, 136–143.
87. Evans, M.S., and Viola-McCabe, K.E. (1996). Midazolam inhibits long-term potentiation through modulation of GABAA receptors. *Neuropharmacology* 35, 347–357.
88. Fan, X., Jin, W.Y., and Wang, Y.T. (2014). The NMDA receptor complex: a multifunctional machine at the glutamatergic synapse. *Front Cell Neurosci* 8, 160.
89. Farina, C., Aloisi, F., and Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28, 138–145.
90. Felipo, V., Miñana, M.D., and Grisolia, S. (1988a). Long-term ingestion of ammonium increases acetylglutamate and urea levels without affecting the amount of carbamoyl-phosphate synthase. *Eur. J. Biochem.* 176, 567–571.
91. Felipo, V., Miñana, M.D., and Grisolia, S. (1988b). Paradoxical protection of both protein-free and high protein diets against acute ammonium intoxication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156, 506–510.
92. Felipo, V., and Butterworth, R.F. (2002). Neurobiology of ammonia. *Prog. Neurobiol.* 67, 259–279.
93. Felipo, V., Urios, A., Montesinos, E., Molina, I., Garcia-Torres, M.L., Civera, M., Olmo, J.A.D., Ortega, J., Martinez-Valls, J., Serra, M.A., *et al.* (2012). Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 27, 51–58.
94. Felipo, V. (2013). Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nature Reviews Neuroscience* 14, 851–858.
95. Ferando, I., Faas, G.C., and Mody, I. (2016). Diminished KCC2 confounds synapse specificity of LTP during senescence. *Nat. Neurosci.* 19, 1197–1200.
96. Ferenci, P., Lockwood, A., Mullen, K., Tarter, R., Weissenborn, K., and Blei, A.T. (2002). Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the

BIBLIOGRAFÍA

- working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 35, 716–721.
97. Ferguson, A.R., Christensen, R.N., Gensel, J.C., Miller, B.A., Sun, F., Beattie, E.C., Bresnahan, J.C., and Beattie, M.S. (2008). Cell death after spinal cord injury is exacerbated by rapid TNF alpha-induced trafficking of GluR2-lacking AMPARs to the plasma membrane. *J. Neurosci.* 28, 11391–11400.
98. Frank, M.G., Barrientos, R.M., Thompson, B.M., Weber, M.D., Watkins, L.R., and Maier, S.F. (2012). IL-1RA injected intra-cisterna magna confers extended prophylaxis against lipopolysaccharide-induced neuroinflammatory and sickness responses. *Journal of Neuroimmunology* 252, 33–39.
99. Freudenberg, F., Marx, V., Seeburg, P.H., Sprengel, R., and Celikel, T. (2013). Circuit mechanisms of GluA1-dependent spatial working memory. *Hippocampus* 23, 1359–1366.
100. Fuster, J.M. (1997). Network memory. *Trends Neurosci.* 20, 451–459.
101. García-Ayllón, M.-S., Cauli, O., Silveyra, M.-X., Rodrigo, R., Candela, A., Compañ, A., Jover, R., Pérez-Mateo, M., Martínez, S., Felipo, V., *et al.* (2008). Brain cholinergic impairment in liver failure. *Brain* 131, 2946–2956.
102. García-Barroso, C., Ricobaraza, A., Pascual-Lucas, M., Unceta, N., Rico, A.J., Goicolea, M.A., Sallés, J., Lanciego, J.L., Oyarzabal, J., Franco, R., *et al.* (2013). Tadalafil crosses the blood–brain barrier and reverses cognitive dysfunction in a mouse model of AD. *Neuropharmacology* 64, 114–123.
103. García-Moreno, L.M., Conejo, N.M., González-Pardo, H., Aller, M.A., Nava, M.P., Arias, J., and Arias, J.L. (2005). Evaluation of two experimental models of hepatic encephalopathy in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38, 127–132.
104. Gerok, W., and Häussinger, D. (1984). [Ammonium detoxication and pH regulation by the liver]. *Med Welt* 35, 28–34.
105. Gibertini, M., Newton, C., Friedman, H., and Klein, T.W. (1995). Spatial learning impairment in mice infected with *Legionella pneumophila* or administered exogenous interleukin-1-beta. *Brain Behav. Immun.* 9, 113–128.
106. Glenn, M.J., and Mumby, D.G. (1998). Place memory is intact in rats with perirhinal cortex lesions. *Behavioral Neuroscience* 112, 1353.
107. Golan, H., Levav, T., Mendelsohn, A., and Huleihel, M. (2004). Involvement of tumor necrosis factor alpha in hippocampal development and function. *Cereb. Cortex* 14, 97–105.
108. Gómez-Giménez, B., Llansola, M., Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Malaguarnera, M., Agusti, A., and Felipo, V. (2017). Sex-dependent effects of developmental exposure to

different pesticides on spatial learning. The role of induced neuroinflammation in the hippocampus. *Food Chem. Toxicol.* 99, 135–148.

109. Gong, Q.-H., Wang, Q., Pan, L.-L., Liu, X.-H., Xin, H., and Zhu, Y.-Z. (2011). S-Propargyl-cysteine, a novel hydrogen sulfide-modulated agent, attenuates lipopolysaccharide-induced spatial learning and memory impairment: Involvement of TNF signaling and NF- κ B pathway in rats. *Brain, Behavior, and Immunity* 25, 110–119.
110. González-Scarano, F., and Baltuch, G. (1999). Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 219–240.
111. Goshen, I., Kreisel, T., Ounallah-Saad, H., Renbaum, P., Zalstein, Y., Ben-Hur, T., Levy-Lahad, E., and Yirmiya, R. (2007). A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology* 32, 1106–1115.
112. Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M.H., Clohisey, S., Baillie, J.K., Stevens, M.P., Freeman, T.C., Summers, K.M., and McColl, B.W. (2016). Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat. Neurosci.* 19, 504–516.
113. Grau, E., Felipo, V., Miñana, M.D., and Grisolia, S. (1992). Treatment of hyperammonemia with carbamylglutamate in rats. *Hepatology* 15, 446–448.
114. Grazioli, L., Alberti, D., Olivetti, L., Rigamonti, W., Codazzi, F., Matricardi, L., Fugazzola, C., and Chiesa, A. (2000). Congenital absence of portal vein with nodular regenerative hyperplasia of the liver. *Eur Radiol* 10, 820–825.
115. Greve, J.W., Gouma, D.J., Soeters, P.B., and Burman, W.A. (1990). Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: a study with germ-free rats. *Gastroenterology* 98, 478–485.
116. Griffin, W.S., Stanley, L.C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L.J., White, Cl., and Araoz, C. (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 7611–7615.
117. Groeneweg, M., Quero, J.C., De Bruijn, I., Hartmann, I.J., Essink-bot, M.L., Hop, W.C., and Schalm, S.W. (1998). Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology* 28, 45–49.
118. Guo, Y., Kotova, E., Chen, Z.-S., Lee, K., Hopper-Borge, E., Belinsky, M.G., and Kruh, G.D. (2003). MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl) adenine. *J. Biol. Chem.* 278, 29509–29514.

BIBLIOGRAFÍA

119. Guo, H.B., Cheng, Y.F., Wu, J.G., Wang, C.M., Wang, H.T., Zhang, C., Qiu, Z.K., and Xu, J.P. (2015). Donepezil improves learning and memory deficits in APP/PS1 mice by inhibition of microglial activation. *Neuroscience* 290, 530–542.
120. van Ham, T.J., Brady, C.A., Kalicharan, R.D., Oosterhof, N., Kuipers, J., Veenstra-Algra, A., Sjollem, K.A., Peterson, R.T., Kampinga, H.H., and Giepmans, B.N.G. (2014). Intravital correlated microscopy reveals differential macrophage and microglial dynamics during resolution of neuroinflammation. *Dis Model Mech* 7, 857–869.
121. Hammond, R.S., Tull, L.E., and Stackman, R.W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 82, 26–34.
122. Hanley, J.G. (2014). Subunit-specific trafficking mechanisms regulating the synaptic expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptors. *Semin. Cell Dev. Biol.* 27, 14–22.
123. Hawkins, R.D., Zhuo, M., and Arancio, O. (1994). Nitric oxide and carbon monoxide as possible retrograde messengers in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurobiol.* 25, 652–665.
124. Hayashi, Y., Shi, S.H., Esteban, J.A., Piccini, A., Poncer, J.C., and Malinow, R. (2000). Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287, 2262–2267.
125. He, P., Liu, Q., Wu, J., and Shen, Y. (2012). Genetic deletion of TNF receptor suppresses excitatory synaptic transmission via reducing AMPA receptor synaptic localization in cortical neurons. *FASEB J.* 26, 334–345.
126. Heisler, J.M., and O'Connor, J.C. (2015). Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent neurotoxic kynurenine metabolism mediates inflammation-induced deficit in recognition memory. *Brain Behav. Immun.* 50, 115–124.
127. Hermenegildo, C., Montoliu, C., Llansola, M., Muñoz, M.D., Gaztelu, J.M., Miñana, M.D., and Felipo, V. (1998). Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 10, 3201–3209.
128. Hernández-Rabaza, V., Agustí, A., Cabrera-Pastor, A., Fustero, S., Delgado, O., Taoro-Gonzalez, L., Montoliu, C., Llansola, M., and Felipo, V. (2015). Sildenafil reduces neuroinflammation and restores spatial learning in rats with hepatic encephalopathy: underlying mechanisms. *Journal of Neuroinflammation* 12, 195.
129. Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Malaguarnera, M., Agustí, A., Llansola, M., and Felipo, V. (2016a). Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by sulforaphane. *Journal of Neuroinflammation* 13, 41.

130. Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Gonzalez-Usano, A., Agusti, A., Balzano, T., ... & Felipo, V. (2016b). 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.
131. Hernandez-Viadel, M., Montoliu, C., Monfort, P., Canales, J.J., Erceg, S., Rowan, M., Ceccatelli, S., and Felipo, V. (2003). Chronic exposure to 2,5-hexanedione impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in rat brain in vivo. *Neurochem. Int.* 42, 525–533.
132. Hewett, S.J., Jackman, N.A., and Claycomb, R.J. (2012). Interleukin-1 β in central nervous system injury and repair. *European Journal of Neurodegenerative Disease* 1, 195.
133. Hilsabeck, R.C., Perry, W., and Hassanein, T.I. (2002). Neuropsychological impairment in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 35, 440–446.
134. Hovens, I.B., Schoemaker, R.G., van der Zee, E.A., Absalom, A.R., Heineman, E., and van Leeuwen, B.L. (2014). Postoperative cognitive dysfunction: Involvement of neuroinflammation and neuronal functioning. *Brain Behav. Immun.* 38, 202–210.
135. Huijgen, J., and Samson, S. (2015). The hippocampus: A central node in a large-scale brain network for memory. *Rev. Neurol. (Paris)* 171, 204–216.
136. Hyman, J.M., Zilli, E.A., Paley, A.M., and Hasselmo, M.E. (2010). Working Memory Performance Correlates with Prefrontal-Hippocampal Theta Interactions but not with Prefrontal Neuron Firing Rates. *Front Integr Neurosci* 4, 2.
137. Irikura, V.M., Lagraoui, M., and Hirsh, D. (2002). The Epistatic Interrelationships of IL-1, IL-1 Receptor Antagonist, and the Type I IL-1 Receptor. *The Journal of Immunology* 169, 393–398.
138. Iwamura, E., Yamada, K., and Ichitani, Y. (2016). Involvement of hippocampal NMDA receptors in retrieval of spontaneous object recognition memory in rats. *Behav. Brain Res.* 307, 92–99.
139. Iwasa, M., and Takei, Y. (2015). Pathophysiology and management of hepatic encephalopathy 2014 update: Ammonia toxicity and hyponatremia. *Hepatology Research* 45, 1155–1162.
140. Jayakumar, A.R., Rama Rao, K.V., and Norenberg, M.D. (2015). Neuroinflammation in hepatic encephalopathy: mechanistic aspects. *J Clin Exp Hepatol* 5, S21-28.
141. Jedlitschky, G., Burchell, B., and Keppler, D. (2000). The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* 275, 30069–30074.
142. Johansson, M., Agusti, A., Llansola, M., Montoliu, C., Strömberg, J., Malinina, E., Ragagnin, G., Doverskog, M., Bäckström, T., and Felipo, V. (2015). GR3027 antagonizes GABAA receptor-

BIBLIOGRAFÍA

potentiating neurosteroids and restores spatial learning and motor coordination in rats with chronic hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 309, G400–G409.

143. Jover, R., Rodrigo, R., Felipo, V., Insausti, R., Sáez-Valero, J., García-Ayllón, M.S., Suárez, I., Candela, A., Compañ, A., Esteban, A., *et al.* (2006). Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 43, 1257–1266.
144. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Biochemistry, D. of, Jessell, M.B.T., Siegelbaum, S., and Hudspeth, A.J. (2000). *Principles of neural science* (McGraw-hill New York).
145. Katsuki, H., Nakai, S., Hirai, Y., Akaji, K., Kiso, Y., and Satoh, M. (1990). Interleukin-1 β inhibits long-term potentiation in the CA3 region of mouse hippocampal slices. *European Journal of Pharmacology* 181, 323–326.
146. Kawai, H., Ishibashi, T., Kudo, N., Kawashima, Y., and Mitsumoto, A. (2012). Behavioral and biochemical characterization of rats treated chronically with thioacetamide: proposal of an animal model for hepatic encephalopathy associated with cirrhosis. *The Journal of Toxicological Sciences* 37, 1165–1175.
147. Kelly, A., Vereker, E., Nolan, Y., Brady, M., Barry, C., Loscher, C.E., Mills, K.H., and Lynch, M.A. (2003). Activation of p38 plays a pivotal role in the inhibitory effect of lipopolysaccharide and interleukin-1 β on long-term potentiation in rat dentate gyrus. *Journal of Biological Chemistry*.
148. Kelly, R.J., Minogue, A.M., Lyons, A., Jones, R.S., Browne, T.C., Costello, D.A., Denieffe, S., O’Sullivan, C., Connor, T.J., and Lynch, M.A. (2013). Glial Activation in A β PP/PS1 Mice is Associated with Infiltration of IFN γ -Producing Cells. *J. Alzheimers Dis.* 37, 63–75.
149. Kesner, R.P., and Churchwell, J.C. (2011). An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiol Learn Mem* 96, 417–431.
150. Kim, C., Kroger, J.K., Calhoun, V.D., and Clark, V.P. (2015). The role of the frontopolar cortex in manipulation of integrated information in working memory. *Neuroscience Letters* 595, 25–29.
151. Klementiev, B., Li, S., Korshunova, I., Dmytriyeva, O., Pankratova, S., Walmod, P.S., Kjær, L.K., Dahllöf, M.S., Lundh, M., Christensen, D.P., *et al.* (2014). Anti-inflammatory properties of a novel peptide interleukin 1 receptor antagonist. *Journal of Neuroinflammation* 11, 27.
152. Kosenko, E., Kaminsky, Y., Grau, E., Miñana, M.D., Marcaida, G., Grisolia, S., and Felipo, V. (1994). Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *J. Neurochem.* 63, 2172–2178.
153. Kountouras, J., Billing, B.H., and Scheuer, P.J. (1984). Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 65, 305–311.
154. Kullmann, D.M. (1999). AMPA receptor attrition in long-term depression. *Neuron* 24, 288–290.

155. Lai, A.Y., Swayze, R.D., El-Husseini, A., and Song, C. (2006). Interleukin-1 beta modulates AMPA receptor expression and phosphorylation in hippocampal neurons. *Journal of Neuroimmunology* 175, 97–106.
156. Lan, K.-M., Tien, L.-T., Pang, Y., Bhatt, A.J., and Fan, L.-W. (2015). IL-1 receptor antagonist attenuates neonatal lipopolysaccharide-induced long-lasting learning impairment and hippocampal injury in adult rats. *Toxicology Letters* 234, 30–39.
157. Lee, H.-K., Kameyama, K., Huganir, R.L., and Bear, M.F. (1998). NMDA Induces Long-Term Synaptic Depression and Dephosphorylation of the GluR1 Subunit of AMPA Receptors in Hippocampus. *Neuron* 21, 1151–1162.
158. Lee, H.K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M.F., and Huganir, R.L. (2000). Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405, 955–959.
159. Lee, H.-K. (2006). Synaptic plasticity and phosphorylation. *Pharmacology & Therapeutics* 112, 810–832.
160. Lee, H.-K., Takamiya, K., He, K., Song, L., and Huganir, R.L. (2009). Specific roles of AMPA receptor subunit GluR1 (GluA1) phosphorylation sites in regulating synaptic plasticity in the CA1 region of hippocampus. *Journal of Neurophysiology* 103, 479–489.
161. Lehnardt, S. (2010). Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 58, 253–263.
162. Leke, R., Oliveira, D.L., Forgiarini, L.F., Escobar, T.D.C., Hammes, T.O., Meyer, F.S., Keiding, S., Silveira, T.R., and Schousboe, A. (2013). Impairment of short term memory in rats with hepatic encephalopathy due to bile duct ligation. *Metab Brain Dis* 28, 187–192.
163. Li, S., Tian, X., Hartley, D.M., and Feig, L.A. (2006). Distinct Roles for Ras-Guanine Nucleotide-Releasing Factor 1 (Ras-GRF1) and Ras-GRF2 in the Induction of Long-Term Potentiation and Long-Term Depression. *J. Neurosci.* 26, 1721–1729.
164. Li, Z.-Q., Rong, X.-Y., Liu, Y.-J., Ni, C., Tian, X.-S., Mo, N., Chui, D.-H., and Guo, X.-Y. (2013). Activation of the canonical nuclear factor- κ B pathway is involved in isoflurane-induced hippocampal interleukin-1 β elevation and the resultant cognitive deficits in aged rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438, 628–634.
165. Liao, G.-Y., Wagner, D.A., Hsu, M.H., and Leonard, J.P. (2001). Evidence for Direct Protein Kinase-C Mediated Modulation of N-Methyl-d-aspartate Receptor Current. *Mol Pharmacol* 59, 960–964.

BIBLIOGRAFÍA

166. Liao, L.-M., Zhou, L.-X., Le, H.-B., Yin, J.-J., and Ma, S.-H. (2012). Spatial working memory dysfunction in minimal hepatic encephalopathy: an ethology and BOLD-fMRI study. *Brain Res. 1445*, 62–72.
167. Liaury, K., Miyaoka, T., Tsumori, T., Furuya, M., Hashioka, S., Wake, R., Tsuchie, K., Fukushima, M., Limoa, E., Tanra, A.J., *et al.* (2014). Minocycline improves recognition memory and attenuates microglial activation in Gunn rat: a possible hyperbilirubinemia-induced animal model of schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 50*, 184–190.
168. de Lima, M.N.M., Laranja, D.C., Bromberg, E., Roesler, R., and Schröder, N. (2005). Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav. Brain Res. 156*, 139–143.
169. Llansola, M., Montoliu, C., Cauli, O., Hernández-Rabaza, V., Agustí, A., Cabrera-Pastor, A., Giménez-Garzó, C., González-Usano, A., and Felipo, V. (2013). Chronic hyperammonemia, glutamatergic neurotransmission and neurological alterations. *Metab Brain Dis 28*, 151–154.
170. Llansola, M., Montoliu, C., Agusti, A., Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Gomez-Gimenez, B., Malaguarnera, M., Dadsetan, S., Belghiti, M., Garcia-Garcia, R., *et al.* (2015). Interplay between glutamatergic and GABAergic neurotransmission alterations in cognitive and motor impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Neurochemistry International 88*, 15–19.
171. Lockwood, A.H. (2000). “What’s in a name?” Improving the care of cirrhotics. *J. Hepatol. 32*, 859–861.
172. Lockwood, A.H., Murphy, B.W., Donnelly, K.Z., Mahl, T.C., and Perini, S. (1993). Positron-emission tomographic localization of abnormalities of brain metabolism in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology 18*, 1061–1068.
173. Lorenz-Guertin, J.M., and Jacob, T.C. (2018). GABA type a receptor trafficking and the architecture of synaptic inhibition. *Developmental Neurobiology 78*, 238–270.
174. Luscher, B., Fuchs, T., and Kilpatrick, C.L. (2011). GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron 70*, 385–409.
175. Lüscher, C., and Malenka, R.C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol 4*.
176. Lynch, M.A. (2015). Neuroinflammatory changes negatively impact on LTP: A focus on IL-1 β . *Brain Res. 1621*, 197–204.
177. Maia, S., Arlicot, N., Vierron, E., Bodard, S., Vergote, J., Guilloteau, D., and Chalon, S. (2015). Longitudinal and parallel monitoring of neuroinflammation and neurodegeneration in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson’s disease. *Synapse 66*, 573–583.

178. Malinow, R. (2003). AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 358, 707–714.
179. Mammen, A.L., Kameyama, K., Roche, K.W., and Huganir, R.L. (1997). Phosphorylation of the α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole4-propionic Acid Receptor GluR1 Subunit by Calcium/Calmodulin-dependent Kinase II. *J. Biol. Chem.* 272, 32528–32533.
180. Man, H.-Y., Sekine-Aizawa, Y., and Huganir, R.L. (2007). Regulation of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking through PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit. *PNAS* 104, 3579–3584.
181. Marcaggi, P., and Coles, J.A. (2001). Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Prog. Neurobiol.* 64, 157–183.
182. Marchi, M., and Raiteri, M. (1996). Nicotinic autoreceptors mediating enhancement of acetylcholine release become operative in conditions of “impaired” cholinergic presynaptic function. *J. Neurochem.* 67, 1974–1981.
183. Martin, H., Voss, K., Hufnagl, P., Wack, R., and Wassilew, G. (1987). Morphometric and densitometric investigations of protoplasmic astrocytes and neurons in human hepatic encephalopathy. *Exp Pathol* 32, 241–250.
184. Martinez-Hernandez, A., Bell, K.P., and Norenberg, M.D. (1977). Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195, 1356–1358.
185. Matsuda, S., Mikawa, S., and Hirai, H. (1999). Phosphorylation of Serine-880 in GluR2 by Protein Kinase C Prevents Its C Terminus from Binding with Glutamate Receptor-Interacting Protein. *Journal of Neurochemistry* 73, 1765–1768.
186. McQuail, J.A., Beas, B.S., Kelly, K.B., Simpson, K.L., Frazier, C.J., Setlow, B., and Bizon, J.L. (2016). NR2A-Containing NMDARs in the Prefrontal Cortex Are Required for Working Memory and Associated with Age-Related Cognitive Decline. *J. Neurosci.* 36, 12537–12548.
187. Méndez, M., Méndez-López, M., López, L., Aller, M.A., Arias, J., Cimadevilla, J.M., and Arias, J.L. (2008a). Spatial memory alterations in three models of hepatic encephalopathy. *Behav. Brain Res.* 188, 32–40.
188. Méndez, M., Méndez-López, M., López, L., Aller, M.A., Arias, J., and Arias, J.L. (2008b). Working memory impairment and reduced hippocampal and prefrontal cortex c-Fos expression in a rat model of cirrhosis. *Physiol. Behav.* 95, 302–307.
189. Mendiola, A.S., and Cardona, A.E. (2018). The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases. *J Neural Transm (Vienna)* 125, 781–795.

BIBLIOGRAFÍA

190. Michalak, A., and Butterworth, R.F. (1997). Ornithine transcarbamylase deficiency: pathogenesis of the cerebral disorder and new prospects for therapy. *Metab Brain Dis* 12, 171–182.
191. Miñana, M.D., Felipo, V., and Grisolia, S. (1988a). Protective effect of long term ammonium ingestion against acute ammonium intoxication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 979–983.
192. Miñana, M.D., Felipo, V., Wallace, R., and Grisolia, S. (1988b). High ammonia levels in brain induce tubulin in cerebrum but not in cerebellum. *J. Neurochem.* 51, 1839–1842.
193. Mínguez, B., García-Pagán, J.C., Bosch, J., Turnes, J., Alonso, J., Rovira, A., and Córdoba, J. (2006). Noncirrhotic portal vein thrombosis exhibits neuropsychological and MR changes consistent with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 43, 707–714.
194. Monaco, S.A., Gulchina, Y., and Gao, W.-J. (2015). NR2B subunit in the prefrontal cortex: A double-edged sword for working memory function and psychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 56, 127–138.
195. Monfort, P., Muñoz, M.-D., ElAyadi, A., Kosenko, E., and Felipo, V. (2002a). Effects of Hyperammonemia and Liver Failure on Glutamatergic Neurotransmission. *Metab Brain Dis* 17, 237–250.
196. Monfort, P., Muñoz, M.-D., Kosenko, E., and Felipo, V. (2002b). Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase, and cGMP-degrading phosphodiesterase. *J. Neurosci.* 22, 10116–10122.
197. Monfort, P., Muñoz, M.-D., and Felipo, V. (2005). Chronic hyperammonemia in vivo impairs long-term potentiation in hippocampus by altering activation of cyclic GMP-dependent-protein kinase and of phosphodiesterase 5. *J. Neurochem.* 94, 934–942.
198. Monfort, P., Erceg, S., Piedrafita, B., Llansola, M., and Felipo, V. (2007). Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2103–2111.
199. Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M.A., del Olmo, J.A., Urios, A., Rodrigo, J.M., and Felipo, V. (2009). IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *J. Clin. Gastroenterol.* 43, 272–279.
200. Montoliu, C., Rodrigo, R., Monfort, P., Llansola, M., Cauli, O., Boix, J., Elmlili, N., Agusti, A., and Felipo, V. (2010). Cyclic GMP pathways in hepatic encephalopathy. Neurological and therapeutic implications. *Metab Brain Dis* 25, 39–48.
201. Moore, A.H., Wu, M., Shaftel, S.S., Graham, K.A., and O'Banion, M.K. (2009). Sustained expression of interleukin-1beta in mouse hippocampus impairs spatial memory. *Neuroscience* 164, 1484–1495.

202. Morici, J.F., Bekinschtein, P., and Weisstaub, N.V. (2015). Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents. *Behav. Brain Res.* 292, 241–251.
203. Moriguchi, S., Yabuki, Y., and Fukunaga, K. (2012). Reduced calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in the hippocampus is associated with impaired cognitive function in MPTP-treated mice. *J. Neurochem.* 120, 541–551.
204. Morris, R.G.M., Garrud, P., Rawlins, J.N.P., and O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683.
205. Morris, R.G. (1989). Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J. Neurosci.* 9, 3040–3057.
206. Morris, R.G.M. (2006). Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *European Journal of Neuroscience* 23, 2829–2846.
207. Morris, R.G.M., Steele, R.J., Bell, J.E., and Martin, S.J. (2013). N-methyl-d-aspartate receptors, learning and memory: chronic intraventricular infusion of the NMDA receptor antagonist d-AP5 interacts directly with the neural mechanisms of spatial learning. *Eur. J. Neurosci.* 37, 700–717.
208. Moser, E.I. (1995). Learning-related changes in hippocampal field potentials. *Behavioural Brain Research* 71, 11-IN1.
209. Moser, H. (1987). Electrophysiological evidence for ammonium as a substitute for potassium in activating the sodium pump in a crayfish sensory neuron. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 141–145.
210. Msall, M., Batshaw, M.L., Suss, R., Brusilow, S.W., and Mellits, E.D. (1984). Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. Outcome of urea-cycle enzymopathies. *N. Engl. J. Med.* 310, 1500–1505.
211. Mumby, D.G., Gaskin, S., Glenn, M.J., Schramek, T.E., and Lehmann, H. (2002). Hippocampal Damage and Exploratory Preferences in Rats: Memory for Objects, Places, and Contexts. *Learn. Mem.* 9, 49–57.
212. Muñoz, M.D., Monfort, P., Gaztelu, J.M., and Felipo, V. (2000). Hyperammonemia impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the CA1 of rat hippocampus in vitro. *Neurochem. Res.* 25, 437–441.
213. Murray, C.A., and Lynch, M.A. (1998). Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. *J. Neurosci.* 18, 2974–2981.

BIBLIOGRAFÍA

214. Murray, A.J., Sauer, J.-F., Riedel, G., McClure, C., Ansel, L., Cheyne, L., Bartos, M., Wisden, W., and Wulff, P. (2011). Parvalbumin-positive CA1 interneurons are required for spatial working but not for reference memory. *Nat. Neurosci.* *14*, 297–299.
215. Murugappan, S., Chari, R., Palli, V.M., Jin, J., and Kunapuli, S.P. (2009). Differential regulation of threonine and tyrosine phosphorylations on protein kinase Cdelta by G-protein-mediated pathways in platelets. *Biochem. J.* *417*, 113–120.
216. Neugebauer, N.M., Miyauchi, M., Sato, T., Tadano, J., Akal, H., Ardehali, H., and Meltzer, H.Y. (2018). Hippocampal GABAA antagonism reverses the novel object recognition deficit in sub-chronic phencyclidine-treated rats. *Behav. Brain Res.* *342*, 11–18.
217. Nillert, N., Pannangrong, W., Welbat, J.U., Chaijaroonkhanarak, W., Sripanidkulchai, K., and Sripanidkulchai, B. (2017). Neuroprotective Effects of Aged Garlic Extract on Cognitive Dysfunction and Neuroinflammation Induced by β -Amyloid in Rats. *Nutrients* *9*.
218. Nishimura, K.J., Ortiz, J.B., and Conrad, C.D. (2017). Antagonizing the GABAA receptor during behavioral training improves spatial memory at different doses in control and chronically stressed rats. *Neurobiol Learn Mem* *145*, 114–118.
219. Norenberg, M.D., and Martinez-Hernandez, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* *161*, 303–310.
220. Norenberg, M.D. (1987). The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol* *6*, 13–33.
221. Norman, G., and Eacott, M.J. (2005). Dissociable effects of lesions to the perirhinal cortex and the postrhinal cortex on memory for context and objects in rats. *Behav. Neurosci.* *119*, 557–566.
222. Odeh, M., Sabo, E., Srugo, I., and Oliven, A. (2004). Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver Int.* *24*, 110–116.
223. Oeckl, P., Steinacker, P., Lehnert, S., Jesse, S., Kretschmar, H.A., Ludolph, A.C., Otto, M., and Ferger, B. (2012). CSF Concentrations of cAMP and cGMP Are Lower in Patients with Creutzfeldt-Jakob Disease but Not Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLOS ONE* *7*, e32664.
224. O'Keefe, J., and Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* *34*, 171–175.
225. O'keefe, J., and Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map* (Oxford: Clarendon Press).

226. Osaka, M., Osaka, N., Kondo, H., Morishita, M., Fukuyama, H., Aso, T., and Shibasaki, H. (2003). The neural basis of individual differences in working memory capacity: an fMRI study. *NeuroImage* 18, 789–797.
227. Owen, A.M., McMillan, K.M., Laird, A.R., and Bullmore, E. (2005). N-back working memory paradigm: A meta-analysis of normative functional neuroimaging studies. *Human Brain Mapping* 25, 46–59.
228. Palmer, C.L., Cotton, L., and Henley, J.M. (2005). The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacol. Rev.* 57, 253–277.
229. Paxinos, G., and Watson, C. (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates Qingchuan Zhuge translate. People's Medical Publishing House, Beijing, China 1998, 32.
230. Perez, J.L., Khatri, L., Chang, C., Srivastava, S., Osten, P., and Ziff, E.B. (2001). PICK1 targets activated protein kinase Calpha to AMPA receptor clusters in spines of hippocampal neurons and reduces surface levels of the AMPA-type glutamate receptor subunit 2. *J. Neurosci.* 21, 5417–5428.
231. Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W., and Sperk, G. (2000). GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101, 815–850.
232. Pofantis, H., and Papatheodoropoulos, C. (2014). The α 5GABAA receptor modulates the induction of long-term potentiation at ventral but not dorsal CA1 hippocampal synapses. *Synapse* 68, 394–401.
233. Prasad, S., Dhiman, R.K., Duseja, A., Chawla, Y.K., Sharma, A., and Agarwal, R. (2007). Lactulose improves cognitive functions and health-related quality of life in patients with cirrhosis who have minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 45, 549–559.
234. Puca, F.M., Antonaci, F., Panella, C., Guglielmi, F.W., Barone, M., Francavilla, A., and Cerutti, R. (1989). Psychomotor dysfunctions in alcoholic and post-necrotic cirrhotic patients without overt encephalopathy. *Acta Neurol. Scand.* 79, 280–287.
235. Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.S., McNamara, J.O., and White, L.E. (2014). *Neuroscience*, 2008. De Boeck, Sinauer, Sunderland, Mass.
236. Qin, Y., Zhu, Y., Baumgart, J.P., Stornetta, R.L., Seidenman, K., Mack, V., van Aelst, L., and Zhu, J.J. (2005). State-dependent Ras signaling and AMPA receptor trafficking. *Genes Dev.* 19, 2000–2015.
237. Rahimi, R.S., and Rockey, D.C. (2015). Novel Ammonia-Lowering Agents for Hepatic Encephalopathy. *Clinics in Liver Disease* 19, 539–549.

BIBLIOGRAFÍA

238. Ramirez, M., Fernandez, R., and Malnic, G. (1999). Permeation of NH₃/NH₄⁺ and cell pH in colonic crypts of the rat. *Pflugers Arch.* 438, 508–515.
239. Ramos, J.M.J. (2013). Differential contribution of hippocampus, perirhinal cortex and postrhinal cortex to allocentric spatial memory in the radial maze. *Behavioural Brain Research* 247, 59–64.
240. Rehnström, S., Simert, G., Hansson, J.A., Johnson, G., and Vang, J. (1977). Chronic hepatic encephalopathy. A psychometrical study. *Scand. J. Gastroenterol.* 12, 305–311.
241. Reisel, D., Bannerman, D.M., Schmitt, W.B., Deacon, R.M.J., Flint, J., Borchardt, T., Seeburg, P.H., and Rawlins, J.N.P. (2002). Spatial memory dissociations in mice lacking GluR1. *Nat. Neurosci.* 5, 868–873.
242. Richter-Levin, G., Canevari, L., and Bliss, T.V. (1995). Long-term potentiation and glutamate release in the dentate gyrus: links to spatial learning. *Behav. Brain Res.* 66, 37–40.
243. Roche, K.W., O'Brien, R.J., Mammen, A.L., Bernhardt, J., and Huganir, R.L. (1996). Characterization of Multiple Phosphorylation Sites on the AMPA Receptor GluR1 Subunit. *Neuron* 16, 1179–1188.
244. Rodrigo R, Jover R, Candela A, Compan A, Saez-Valero J, Erceg S, Felipo V. (2005). Bile duct ligation plus hyperammonemia in rats reproduces the alterations in the modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in brain of cirrhotic patients. *Neuroscience* 130: 435-443
245. Rodrigo, R., Erceg, S., Rodriguez-Diaz, J., Saez-Valero, J., Piedrafita, B., Suarez, I., and Felipo, V. (2007). Glutamate-induced activation of nitric oxide synthase is impaired in cerebral cortex in vivo in rats with chronic liver failure. *J. Neurochem.* 102, 51–64.
246. Rodrigo, R., and Felipo, V. (2007). Control of brain glutamine synthesis by NMDA receptors. *Front. Biosci.* 12, 883–890.
247. Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez-Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Garcia-Verdugo, J.-M., and Felipo, V. (2010). Hyperammonemia Induces Neuroinflammation That Contributes to Cognitive Impairment in Rats With Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology* 139, 675–684.
248. Romero-Gómez, M., Córdoba, J., Jover, R., del Olmo, J.A., Ramírez, M., Rey, R., de Madaria, E., Montoliu, C., Nuñez, D., Flavia, M., *et al.* (2007). Value of the critical flicker frequency in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 45, 879–885.
249. Rosi, S., Ramirez-Amaya, V., Hauss-Wegrzyniak, B., and Wenk, G.L. (2004). Chronic brain inflammation leads to a decline in hippocampal NMDA-R1 receptors. *J Neuroinflammation* 1, 12.
250. Rosi, S., Vazdarjanova, A., Ramirez-Amaya, V., Worley, P.F., Barnes, C.A., and Wenk, G.L. (2006). Memantine protects against LPS-induced neuroinflammation, restores behaviorally-induced gene expression and spatial learning in the rat. *Neuroscience* 142, 1303–1315.

251. Ross, F.M., Allan, S.M., Rothwell, N.J., and Verkhratsky, A. (2003). A dual role for interleukin-1 in LTP in mouse hippocampal slices. *Journal of Neuroimmunology* 144, 61–67.
252. Roughneen, P.T., Gouma, D.J., Kulkarni, A.D., Fanslow, W.F., and Rowlands, B.J. (1986). Impaired specific cell-mediated immunity in experimental biliary obstruction and its reversibility by internal biliary drainage. *J. Surg. Res.* 41, 113–125.
253. Rougier, H., Milota, S., Rodrigo, R., Gherase, M., Sarcina, L., Moldovan, O., Zilhão, J., Constantin, S., Franciscus, R.G., Zollikofer, C.P.E., *et al.* (2007). Peștera cu Oase 2 and the cranial morphology of early modern Europeans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 1165–1170.
254. Ruby, N.F., Fernandez, F., Garrett, A., Klima, J., Zhang, P., Sapolsky, R., and Heller, H.C. (2013). Spatial memory and long-term object recognition are impaired by circadian arrhythmia and restored by the GABA Antagonist pentylentetrazole. *PLoS ONE* 8, e72433.
255. Saavedra, A., Giralt, A., Arumí, H., Alberch, J., and Pérez-Navarro, E. (2013). Regulation of Hippocampal cGMP Levels as a Candidate to Treat Cognitive Deficits in Huntington’s Disease. *PLOS ONE* 8, e73664.
256. Salmon, D.P., and Butters, N. (1995). Neurobiology of skill and habit learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 184–190.
257. Sanderson, D.J., McHugh, S.B., Good, M.A., Sprengel, R., Seeburg, P.H., Rawlins, J.N.P., and Bannerman, D.M. (2010). Spatial working memory deficits in GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice reflect impaired short-term habituation: evidence for Wagner’s dual-process memory model. *Neuropsychologia* 48, 2303–2315.
258. Sauvage, M.M., Nakamura, N.H., and Beer, Z. (2013). Mapping memory function in the medial temporal lobe with the immediate-early gene Arc. *Behav. Brain Res.* 254, 22–33.
259. Schiapparelli, L., Simón, A.M., Del Río, J., and Frechilla, D. (2006). Opposing effects of AMPA and 5-HT_{1A} receptor blockade on passive avoidance and object recognition performance: correlation with AMPA receptor subunit expression in rat hippocampus. *Neuropharmacology* 50, 897–907.
260. Schiff, S., D’Avanzo, C., Cona, G., Goljahani, A., Montagnese, S., Volpato, C., Gatta, A., Sparacino, G., Amodio, P., and Bisiacchi, P. (2014). Insight into the relationship between brain/behavioral speed and variability in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Clinical Neurophysiology* 125, 287–297.
261. Schmitt, W.B., Deacon, R.M.J., Seeburg, P.H., Rawlins, J.N.P., and Bannerman, D.M. (2003). A within-subjects, within-task demonstration of intact spatial reference memory and impaired spatial working memory in glutamate receptor-A-deficient mice. *J. Neurosci.* 23, 3953–3959.

BIBLIOGRAFÍA

- 262.** Schneider, H., Pitossi, F., Balschun, D., Wagner, A., Del Rey, A., and Besedovsky, H.O. (1998). A neuromodulatory role of interleukin-1 β in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *95*, 7778–7783.
- 263.** Schoenbaum, G., Setlow, B., and Ramus, S.J. (2003). A systems approach to orbitofrontal cortex function: recordings in rat orbitofrontal cortex reveal interactions with different learning systems. *Behav. Brain Res.* *146*, 19–29.
- 264.** Schomerus, H., and Hamster, W. (2001). Quality of life in cirrhotics with minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* *16*, 37–41.
- 265.** Schultz, V., and Lowenstein, J.M. (1978). The purine nucleotide cycle. Studies of ammonia production and interconversions of adenine and hypoxanthine nucleotides and nucleosides by rat brain in situ. *J. Biol. Chem.* *253*, 1938–1943.
- 266.** Scoville, W.B., and Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *20*, 11–21.
- 267.** Seidenman, K.J., Steinberg, J.P., Haganir, R., and Malinow, R. (2003). Glutamate receptor subunit 2 Serine 880 phosphorylation modulates synaptic transmission and mediates plasticity in CA1 pyramidal cells. *J. Neurosci.* *23*, 9220–9228.
- 268.** Serantes, R., Arnalich, F., Figueroa, M., Salinas, M., Andrés-Mateos, E., Codoceo, R., Renart, J., Matute, C., Cavada, C., Cuadrado, A., *et al.* (2006). Interleukin-1 β enhances GABAA receptor cell-surface expression by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: relevance to sepsis-associated encephalopathy. *J. Biol. Chem.* *281*, 14632–14643.
- 269.** Shaftel, S.S., Griffin, W.S.T., and O'Banion, M.K. (2008). The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *Journal of Neuroinflammation* *5*, 7.
- 270.** Sharma, P., Sharma, B.C., Puri, V., and Sarin, S.K. (2008). Minimal hepatic encephalopathy in patients with extrahepatic portal vein obstruction. *Am. J. Gastroenterol.* *103*, 1406–1412.
- 271.** Shawcross, D.L., Davies, N.A., Williams, R., and Jalan, R. (2004). Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J. Hepatol.* *40*, 247–254.
- 272.** Shen, X., Sun, Y., Wang, M., Shu, H., Zhu, L.-J., Yan, P.-Y., Zhang, J.-F., and Jin, X. (2018). Chronic N-acetylcysteine treatment alleviates acute lipopolysaccharide-induced working memory deficit through upregulating caveolin-1 and synaptophysin in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* *235*, 179–191.
- 273.** Sherlock, S., Summerskill, W.H.J., White, L., and Phear, E. (1954). PORTAL-SYSTEMIC ENCEPHALOPATHY NEUROLOGICAL COMPLICATIONS OF LIVER DISEASE. *The Lancet* *264*, 453–457.

- 274.** Shimshek, D.R., Jensen, V., Celikel, T., Geng, Y., Schupp, B., Bus, T., Mack, V., Marx, V., Hvalby, Seeburg, P.H., *et al.* (2006). Forebrain-specific glutamate receptor B deletion impairs spatial memory but not hippocampal field long-term potentiation. *J. Neurosci.* *26*, 8428–8440.
- 275.** Shinohara, K., and Hata, T. (2014). Post-acquisition hippocampal NMDA receptor blockade sustains retention of spatial reference memory in Morris water maze. *Behav. Brain Res.* *259*, 261–267.
- 276.** Siapas, A.G., Lubenov, E.V., and Wilson, M.A. (2005). Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations. *Neuron* *46*, 141–151.
- 277.** Silvestre de Ferron, B., Vilpoux, C., Kervern, M., Robert, A., Antol, J., Naassila, M., and Pierrefiche, O. (2017). Increase of KCC2 in hippocampal synaptic plasticity disturbances after perinatal ethanol exposure. *Addict Biol* *22*, 1870–1882.
- 278.** Singh, S., and Trigun, S.K. (2014). Low grade cirrhosis induces cognitive impairment and motor dysfunction in rats: could be a model for minimal hepatic encephalopathy. *Neurosci. Lett.* *559*, 136–140.
- 279.** Słowik, A., Ciećko-Michalska, I., Bogdał, J., and Szczudlik, A. (2001). [The diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy]. *Prz. Lek.* *58*, 1059–1062.
- 280.** Smith, S.S. (2013). $\alpha 4\beta\delta$ GABAA receptors and tonic inhibitory current during adolescence: effects on mood and synaptic plasticity. *Front Neural Circuits* *7*, 135.
- 281.** Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* *119*, 7–35.
- 282.** Solitare, G.B. (1972). The astrocyte in liver disease. *Lancet* *1*, 319–320.
- 283.** Song, C., Phillips, A.G., and Leonard, B. (2003). Interleukin 1 beta enhances conditioned fear memory in rats: possible involvement of glucocorticoids. *European Journal of Neuroscience* *18*, 1739–1743.
- 284.** Sparkman, N.L., Buchanan, J.B., Heyen, J.R.R., Chen, J., Beverly, J.L., and Johnson, R.W. (2006). Interleukin-6 facilitates lipopolysaccharide-induced disruption in working memory and expression of other proinflammatory cytokines in hippocampal neuronal cell layers. *J. Neurosci.* *26*, 10709–10716.
- 285.** Spulber, S., Mateos, L., Oprica, M., Cedazo-Minguez, A., Bartfai, T., Winblad, B., and Schultzberg, M. (2009). Impaired long term memory consolidation in transgenic mice overexpressing the human soluble form of IL-1ra in the brain. *Journal of Neuroimmunology* *208*, 46–53.
- 286.** Srinivasan, D., Yen, J.-H., Joseph, D.J., and Friedman, W. (2004). Cell type-specific interleukin-1beta signaling in the CNS. *J. Neurosci.* *24*, 6482–6488.

BIBLIOGRAFÍA

- 287.** Steindl, P.E., Coy, D.L., Finn, B., Zee, P.C., and Blei, A.T. (1996). A low-protein diet ameliorates disrupted diurnal locomotor activity in rats after portacaval anastomosis. *Am. J. Physiol.* *271*, G555-560.
- 288.** Stellwagen, D., Beattie, E.C., Seo, J.Y., and Malenka, R.C. (2005). Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . *J. Neurosci.* *25*, 3219–3228.
- 289.** Strack, S., McNeill, R.B., and Colbran, R.J. (2000). Mechanism and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II targeting to the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* *275*, 23798–23806.
- 290.** van Strien, N.M., Cappaert, N.L.M., and Witter, M.P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal–hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience* *10*, 272–282.
- 291.** Stuss, D.T., and Alexander, M.P. (2000). Executive functions and the frontal lobes: a conceptual view. *Psychol Res* *63*, 289–298.
- 292.** Szodorai, E., Bampali, K., Romanov, R.A., Kasper, S., Hökfelt, T., Ernst, M., Lubec, G., and Harkany, T. (2018). Diversity matters: combinatorial information coding by GABAA receptor subunits during spatial learning and its allosteric modulation. *Cell. Signal.* *50*, 142–159.
- 293.** Takeda, S., Sato, N., and Morishita, R. (2014). Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Front Aging Neurosci* *6*, 171.
- 294.** Tenorio-Laranga, J., Montoliu, C., Urios, A., Hernández-Rabaza, V., Ahabrach, H., García-Horsman, J.A., and Felipo, V. (2015). The expression levels of prolyl oligopeptidase responds not only to neuroinflammation but also to systemic inflammation upon liver failure in rat models and cirrhotic patients. *J Neuroinflammation* *12*, 183.
- 295.** Thiel, A., Radlinska, B.A., Paquette, C., Sidel, M., Soucy, J.-P., Schirmacher, R., and Minuk, J. (2010). The Temporal Dynamics of Poststroke Neuroinflammation: A Longitudinal Diffusion Tensor Imaging—Guided PET Study with ^{11}C -PK11195 in Acute Subcortical Stroke. *Journal of Nuclear Medicine* *51*, 1404.
- 296.** Thinschmidt, J.S., Walker, D.W., and King, M.A. (2003). Chronic ethanol treatment reduces the magnitude of hippocampal LTD in the adult rat. *Synapse* *48*, 189–197.
- 297.** Tiwari, V., and Chopra, K. (2013). Protective effect of curcumin against chronic alcohol-induced cognitive deficits and neuroinflammation in the adult rat brain. *Neuroscience* *244*, 147–158.
- 298.** Touyz, R.M., Picard, S., Schiffrin, E.L., and Deschepper, C.F. (1997). Cyclic GMP inhibits a pharmacologically distinct Na^+/H^+ exchanger variant in cultured rat astrocytes via an extracellular site of action. *J. Neurochem.* *68*, 1451–1461.

299. Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* *62*, 405–496.
300. Tulving, E., and Donaldson, W. (1972). *Organisation of Memory* Academic Press. New York.
301. Ugarte, A., Gil-Bea, F., García-Barroso, C., Cedazo-Minguez, Á., Ramírez, M.J., Franco, R., García-Osta, A., Oyarzabal, J., and Cuadrado-Tejedor, M. (2011). Decreased levels of guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP) in cerebrospinal fluid (CSF) are associated with cognitive decline and amyloid pathology in Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology* *41*, 471–482.
302. Vann, S.D., Brown, M.W., Erichsen, J.T., and Aggleton, J.P. (2000). Fos Imaging Reveals Differential Patterns of Hippocampal and Parahippocampal Subfield Activation in Rats in Response to Different Spatial Memory Tests. *J. Neurosci.* *20*, 2711–2718.
303. Vann, S.D., and Albasser, M.M. (2011). Hippocampus and neocortex: recognition and spatial memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* *21*, 440–445.
304. Vithlani, M., Terunuma, M., and Moss, S.J. (2011). The dynamic modulation of GABA(A) receptor trafficking and its role in regulating the plasticity of inhibitory synapses. *Physiol. Rev.* *91*, 1009–1022.
305. Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M.M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., Di Luca, M., Galli, C.L., *et al.* (2003). Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J. Neurosci.* *23*, 8692–8700.
306. Viviani, B., Gardoni, F., Bartesaghi, S., Corsini, E., Facchi, A., Galli, C.L., Luca, M.D., and Marinovich, M. (2006). Interleukin-1 β Released by gp120 Drives Neural Death through Tyrosine Phosphorylation and Trafficking of NMDA Receptors. *J. Biol. Chem.* *281*, 30212–30222.
307. Viviani, B., Gardoni, F., and Marinovich, M. (2007). Cytokines and neuronal ion channels in health and disease. *International Review of Neurobiology* *82*, 247–263.
308. Vorhees, C.V., and Williams, M.T. (2014). Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR J* *55*, 310–332.
309. Wagner, J.J., and Alger, B.E. (1995). GABAergic and developmental influences on homosynaptic LTD and depotentiation in rat hippocampus. *J. Neurosci.* *15*, 1577–1586.
310. Walberer, M., Rueger, M.A., Simard, M.-L., Emig, B., Jander, S., Fink, G.R., and Schroeter, M. (2010). Dynamics of neuroinflammation in the macrosphere model of arterio-arterial embolic focal ischemia: an approximation to human stroke patterns. *Exp Transl Stroke Med* *2*, 22.

BIBLIOGRAFÍA

311. Wang, W.-F., Wu, S.-L., Liou, Y.-M., Wang, A.-L., Pawlak, C.R., and Ho, Y.-J. (2009). MPTP lesion causes neuroinflammation and deficits in object recognition in Wistar rats. *Behav. Neurosci.* *123*, 1261–1270.
312. Wang, D.-S., Zurek, A.A., Lecker, I., Yu, J., Abramian, A.M., Avramescu, S., Davies, P.A., Moss, S.J., Lu, W.-Y., and Orser, B.A. (2012). Memory Deficits Induced by Inflammation Are Regulated by α 5-Subunit-Containing GABAA Receptors. *Cell Reports* *2*, 488–496.
313. Wang, J.Q., Guo, M.-L., Jin, D.-Z., Xue, B., Fibuch, E.E., and Mao, L.-M. (2014). Roles of subunit phosphorylation in regulating glutamate receptor function. *European Journal of Pharmacology* *728*, 183–187.
314. Wang, S., Zhang, X., Zhai, L., Sheng, X., Zheng, W., Chu, H., and Zhang, G. (2018). Atorvastatin Attenuates Cognitive Deficits and Neuroinflammation Induced by A β 1-42 Involving Modulation of TLR4/TRAF6/NF- κ B Pathway. *J. Mol. Neurosci.* *64*, 363–373.
315. Ward, M.T., Stoelzel, C.R., and Markus, E.J. (1999). Hippocampal dysfunction during aging II: Deficits on the radial-arm maze ☆. *Neurobiology of Aging* *20*, 373–380.
316. Watanabe, A. (2000). Portal-systemic encephalopathy in non-cirrhotic patients: classification of clinical types, diagnosis and treatment. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *15*, 969–979.
317. Weiner, I.D. (2004). The Rh gene family and renal ammonium transport. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* *13*, 533–540.
318. Weissenborn, K., Ennen, J.C., Schomerus, H., Rückert, N., and Hecker, H. (2001). Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J. Hepatol.* *34*, 768–773.
319. Weissenborn, K., Heidenreich, S., Giewekemeyer, K., Rückert, N., and Hecker, H. (2003). Memory function in early hepatic encephalopathy. *J. Hepatol.* *39*, 320–325.
320. Weissenborn, K., Bokemeyer, M., Krause, J., Ennen, J., and Ahl, B. (2005a). Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease. *AIDS* *19 Suppl 3*, S93-98.
321. Weissenborn, K., Giewekemeyer, K., Heidenreich, S., Bokemeyer, M., Berding, G., and Ahl, B. (2005b). Attention, memory, and cognitive function in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* *20*, 359–367.
322. Wen, S., Schroeter, A., and Klöcker, N. (2013). Synaptic plasticity in hepatic encephalopathy - a molecular perspective. *Arch. Biochem. Biophys.* *536*, 183–188.
323. Whissell, P.D., Avramescu, S., Wang, D.-S., and Orser, B.A. (2016). δ GABAA Receptors Are Necessary for Synaptic Plasticity in the Hippocampus: Implications for Memory Behavior. *Anesth. Analg.* *123*, 1247–1252.
324. Wincott, C.M., Abera, S., Vunck, S.A., Tirko, N., Choi, Y., Titcombe, R.F., Antoine, S.O., Tukey, D.S., DeVito, L.M., Hofmann, F., *et al.* (2014). cGMP-dependent protein kinase type II knockout

mice exhibit working memory impairments, decreased repetitive behavior, and increased anxiety-like traits. *Neurobiol Learn Mem* 114, 32–39.

325. Winters, B.D., Forwood, S.E., Cowell, R.A., Saksida, L.M., and Bussey, T.J. (2004). Double Dissociation between the Effects of Peri-Postrhinal Cortex and Hippocampal Lesions on Tests of Object Recognition and Spatial Memory: Heterogeneity of Function within the Temporal Lobe. *J. Neurosci.* 24, 5901–5908.
326. Wojcicki, M., Haagsma, E.B., Gouw, A.S.H., Slooff, M.J.H., and Porte, R.J. (2004). Orthotopic liver transplantation for portosystemic encephalopathy in an adult with congenital absence of the portal vein. *Liver Transpl.* 10, 1203–1207.
327. Wu, Y.-B., Zhang, L., Li, W.-T., Yang, Y., and Zhao, J.-M. (2016). Artesunate restores spatial learning of rats with hepatic encephalopathy by inhibiting ammonia-induced oxidative damage in neurons and dysfunction of glutamate signaling in astroglial cells. *Biomed. Pharmacother.* 84, 972–978.
328. Xie, M., Yan, J., He, C., Yang, L., Tan, G., Li, C., Hu, Z., and Wang, J. (2015). Short-term sleep deprivation impairs spatial working memory and modulates expression levels of ionotropic glutamate receptor subunits in hippocampus. *Behav. Brain Res.* 286, 64–70.
329. Yachha, S.K., Khanduri, A., Sharma, B.C., and Kumar, M. (1996). Gastrointestinal bleeding in children. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 903–907.
330. Yadav, S.K., Srivastava, A., Srivastava, A., Thomas, M.A., Agarwal, J., Pandey, C.M., Lal, R., Yachha, S.K., Saraswat, V.A., and Gupta, R.K. (2010). Encephalopathy assessment in children with extra-hepatic portal vein obstruction with MR, psychometry and critical flicker frequency. *J. Hepatol.* 52, 348–354.
331. Yamada, K., Shimizu, M., Kawabe, K., and Ichitani, Y. (2015). Hippocampal AP5 treatment impairs both spatial working and reference memory in radial maze performance in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 758, 137–141.
332. Yen, C.L., and Liaw, Y.F. (1990). Somatosensory evoked potentials and number connection test in the detection of subclinical hepatic encephalopathy. *Hepatogastroenterology* 37, 332–334.
333. Yirmiya, R., Winocur, G., and Goshen, I. (2002). Brain interleukin-1 is involved in spatial memory and passive avoidance conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory* 78, 379–389.
334. Yoon, T., Okada, J., Jung, M.W., and Kim, J.J. (2008). Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. *Learn. Mem.* 15, 97–105.

BIBLIOGRAFÍA

- 335.** Yoshihara, T., and Ichitani, Y. (2004). Hippocampal N-methyl-D-aspartate receptor-mediated encoding and retrieval processes in spatial working memory: delay-interposed radial maze performance in rats. *Neuroscience* *129*, 1–10.
- 336.** Zarezadeh, M., Baluchnejadmojarad, T., Kiasalari, Z., Afshin-Majd, S., and Roghani, M. (2017). Garlic active constituent s-allyl cysteine protects against lipopolysaccharide-induced cognitive deficits in the rat: Possible involved mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* *795*, 13–21.
- 337.** Zhang, J., Guo, J., Zhao, X., Chen, Z., Wang, G., Liu, A., Wang, Q., Zhou, W., Xu, Y., and Wang, C. (2013). Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil prevents neuroinflammation, lowers beta-amyloid levels and improves cognitive performance in APP/PS1 transgenic mice. *Behav. Brain Res.* *250*, 230–237.
- 338.** Zhu, J.J., Qin, Y., Zhao, M., Van Aelst, L., and Malinow, R. (2002). Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* *110*, 443–455.

