

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE

Programa de Doctorado en Neurociencias



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

Papel de las vesículas extracelulares en el deterioro cognitivo y motor en hiperamonemia y encefalopatía hepática. Mecanismos moleculares e implicaciones terapéuticas.

Tesis doctoral

Autora: Paula Izquierdo Altarejos

Directores:

Vicente Felipo

Andrea Cabrera Pastor

Tutora académica:

Carmina Montoliu

Enero de 2022



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

INFORME FAVORABLE DE LOS DIRECTORES Y DEL TUTOR DE LA TESIS DOCTORAL

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 Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico de Valencia

CARMINA MONTOLIU FÉLIX, Doctora en Biología, profesora del Departamento de Patología de la Universidad de Valencia e Investigadora jefa del Laboratorio de Deterioro Neurológico del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico de Valencia

CERTIFICAN

Que la graduada en Biotecnología Paula Izquierdo Altarejos ha realizado, bajo su supervisión, el trabajo de tesis doctoral titulado “Papel de las vesículas extracelulares en el deterioro cognitivo y motor en hiperamonemia y encefalopatía hepática. Mecanismos moleculares e implicaciones terapéuticas” en el laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigación Príncipe Felipe y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Firmado por
FELIPO ORTS
VICENTE -
22665118K el
día 11/01/2022
con un
certificado
emitido por AC
FNMT Usuarios

CABRERA
PASTOR
ANDREA -
53216210Y
Firmado
digitalmente por
CABRERA PASTOR
ANDREA - 53216210Y
Fecha: 2022.01.12
09:02:04 +01'00'

MARIA DEL
CARMEN
MONTOLIU
FELIX
Firmado
digitalmente por
MARIA DEL
CARMEN
MONTOLIUFELIX
Fecha: 2022.01.12
09:42:03 +01'00'

Director

Dr. Vicente Felipo

Directora

Dra. Andrea Cabrera

Tutora académica

Carmina Montoliu

Valencia, enero de 2022

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Llega el momento de los agradecimientos, un apartado que quizá no es muy relevante académicamente y al que, sin embargo, creo que no le deberíamos restar importancia. A veces podemos pensar en la ciencia como un conjunto de números y datos, pero detrás de esto hay miles de personas, que son las que contribuyen a su desarrollo y a darle un sentido a todo el conocimiento que se genera. De igual manera, detrás de esta tesis hay muchas personas detrás que han contribuido en mayor o menor medida.

En primer lugar, agradecer a mis directores de tesis. Al Dr. Vicente Felipo, por darme la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio, por todo su conocimiento científico y por estar siempre presente en la organización de los experimentos. A la Dra. Andrea Cabrera Pastor, especialmente en los primeros años de tesis, por sumergirse conmigo en el campo de las vesículas extracelulares. También a mi tutora académica, Carmina Montoliu, porque fue la que me impulsó hacia el campo de la Neurociencia.

Quiero agradecer a todos mis compañeros del laboratorio de Neurobiología del CIPF, presentes y pasados, es difícil nombrarlos a todos porque ha pasado mucha gente por el laboratorio: compañeros de tesis, estudiantes de prácticas, TFGs, TFM, etc. Gracias a las técnicas Mar y Mari Carmen (también a Paqui en los inicios), por ser los pilares del laboratorio, la “copia de seguridad”, por enseñarme a trabajar en el laboratorio día a día, pero también por su compañerismo y por saber que siempre se puede contar con ellas. A Marta, por toda su experiencia y por estar siempre dispuesta a echar una mano a cualquiera del laboratorio. A los primeros “predocs”, ahora ya doctores Lucas y Raquel, con los que coincidí al principio de la tesis y fueron un referente para mí. Al “sector italiano”, Paola, Tiziano y Michele. A Yaiza, por compartir conmigo una etapa más del camino, muchos experimentos y dudas (y por ayudarme a amansar ratas). A María, por su capacidad de trabajo y su pasión por la ciencia. A Teresa, por la tranquilidad que transmite siempre y por su enfoque bioinformático, que intentamos seguir en las presentaciones. A Annie, otra compañera que transmite calma a pesar de estar siempre ocupada. A Fernando, por ayudarme en los experimentos este último año y por estar siempre dispuesto a enseñar. A Iván, el “predoc” más reciente, por compartir estos últimos experimentos conmigo. Formáis un gran equipo.

Gracias también a todo aquel personal del CIPF que, sin ser del laboratorio, ha colaborado conmigo. Alberto, del confocal, por formarme en este campo y ayudarme a conseguir mejores imágenes; Mario, del microscopio electrónico; Esther, experta en el Nanosight, y compañera en el congreso de Padua. A Hernán, por ayudarme con el aislamiento de vesículas al principio y ser el primero en explicarme qué son los exosomas. Mención especial al grupo de Vicky Moreno, por su colaboración con los experimentos con vesículas de células madre mesenquimales, pero también que siempre están ahí para comentar cualquier duda científica e intentar ayudar.

No podría olvidarme de Vicent Teruel y el grupo de Anatomía de la universidad, por darme la oportunidad de conocer de primera mano la faceta de la docencia. Ha sido toda una experiencia (con pandemia incluida de por medio). Pero no solo eso, también por ayudarme con cualquier tema y estar pendientes de mí.

AGRADECIMIENTOS

Gracias también al laboratorio de Juan Nácher, en el que realicé la estancia corta en otros laboratorios del programa del doctorado. Solo estuve unos días en su laboratorio, pero me sentí como en casa.

Siguiendo con las estancias en otros laboratorios, gracias a Sara Montagnese, por abrirme las puertas de su laboratorio en Padua al principio de la tesis e integrarme en su grupo. Puede que esta estancia no se haya plasmado en los resultados de la tesis, pero considero que me aportó una formación valiosa, permitiéndome ver el aspecto clínico y también aportándome nuevas ideas y planteamientos científicos. María, Lisa, Matteo, Michele, ... gracias por acompañarme durante esa etapa.

En la misma línea, gracias a Christian Humpel y su equipo en Innsbruck, por acogerme en un momento tan complejo durante la pandemia y por todo lo que me enseñaron en el laboratorio. *Vielen Dank für alles!* Karin, Buket, Faryal, Raquel...ha sido muy agradable y fácil trabajar con vosotras. Volveré cuando pueda a visitaros.

También quería agradecer a toda la comunidad de vesículas extracelulares, porque, aunque no nos conozcamos todos en persona, ha sido muy emocionante introducirme en este campo y todos los cursos y congresos organizados por esta comunidad siempre han sido muy enriquecedores, tanto a nivel técnico como humano. Me gustaría recordar aquí un proverbio que resaltó el anterior presidente de GEIVEX, Hernando del Portillo, *If you want to go fast, go alone. If you want to go far, go together.* Para mí, ilustra perfectamente el camino que debería seguir la ciencia.

En un ámbito más personal, gracias a mis amigos de siempre, especialmente a Carol, Diego y Lourdes, por todos esos ratos de desconexión, las videollamadas, los viajes...No siempre coincidimos todos en Valencia, pero sé que siempre estáis ahí. También a David, por todas las conversaciones científicas y no científicas.

Por supuesto, a mis padres, Gabriel y Teresa, por todo vuestro apoyo y por impulsarme siempre hacia delante en este camino. Porque siempre habéis creído en mí y me habéis ayudado a formarme. Podría extenderme más, pero solo diré que no podría pedir unos padres mejores. También al resto de mi familia, a la *iaia*, mis tíos y primos. Entre todos formáis una red maravillosa y especial, de la que es un privilegio formar parte.

Por último, a Juan Carlos, por acompañarme y apoyarme durante estos años, en lo bueno y en lo malo, por darme una perspectiva diferente y también por leerse buena parte de la tesis. La tesis en sí misma ha sido un viaje, pero nos esperan muchos más viajes juntos. *Moltes gràcies carinyet!*

¡GRACIAS A TODOS!



ÍNDICE

ÍNDICE

SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	53
1. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA	53
1.1 Concepto, tipos y diagnóstico.	53
1.2 Bases fisiopatológicas: sinergia entre hiperamonemia e inflamación periférica en la inducción de neuroinflamación y EH.	56
1.2.1 Metabolismo y toxicidad del amonio. Contribución de la hiperamonemia a la encefalopatía hepática.	57
1.2.2 Contribución de la inflamación periférica a la encefalopatía hepática.	60
1.2.3 Neuroinflamación en encefalopatía hepática.	61
1.3 Modelos animales de encefalopatía hepática.	62
1.4 Mecanismos por los que la hiperamonemia crónica induce deterioro cognitivo y motor.	65
1.4.1 Hipocampo.	65
1.4.2 Cerebelo.	67
1.5 Opciones terapéuticas actuales para el tratamiento de la EHM y tratamientos potenciales estudiados en modelos animales.	68
1.5.1 Opciones terapéuticas en clínica.	68
1.5.2 Tratamientos potenciales investigados en modelos animales.	69
2. VESÍCULAS EXTRACELULARES	72
2.1 Descubrimiento y estudios iniciales.	72
2.2 Clasificación y terminología.	73
2.3 Composición de las vesículas extracelulares y mecanismos de regulación de su contenido.	74
2.4 Mecanismos de biogénesis y liberación de vesículas extracelulares.	76
2.5 Interacción de las vesículas extracelulares con las células receptoras.	80
2.6 Funciones de las vesículas extracelulares: papel en la comunicación intercelular y relevancia en patologías.	82
2.6.1 EVs y sistema inmune. Patologías asociadas con inflamación crónica y enfermedades autoinmunes.	82
2.6.2 EVs y sistema nervioso. Enfermedades neurodegenerativas.	86
2.6.3 EVs como mecanismo de comunicación entre sangre periférica y cerebro.	88
2.7 Potencial terapéutico de las vesículas extracelulares: EVs derivadas de células madre mesenquimales.	89

2.7.1 Propiedades de las células madre mesenquimales.....	89
2.7.2 Ventajas de la utilización de EVs de MSCs frente a MSCs.....	89
2.7.3 MSC-EVs como terapia en patologías inflamatorias y neuroinflamatorias. Mecanismos implicados.	91
HIPÓTESIS.....	99
OBJETIVOS	101
MATERIALES Y MÉTODOS	105
1. Modelo animal de hiperamonemia crónica sin fallo hepático.	105
2. Diseño experimental.	105
2.1 Aproximación <i>in vivo</i> : estudio de los efectos.....	105
2.1.1 Diseño experimental 1: estudio del efecto de la inyección de vesículas extracelulares de ratas con hiperamonemia crónica a ratas control.....	105
2.1.2 Diseño experimental 2: estudio del efecto de la inyección de vesículas extracelulares de células madre mesenquimales en ratas con hiperamonemia crónica	106
2.2 Aproximación <i>ex vivo</i> : estudio de mecanismos.....	107
3. Aislamiento de vesículas extracelulares.	110
3.1 Extracción de plasma para la obtención de vesículas extracelulares.	110
3.2 Aislamiento de vesículas extracelulares de plasma.....	110
3.3 Aislamiento de vesículas extracelulares de células madre mesenquimales. ...	111
3.4 Marcaje fluorescente de las vesículas extracelulares.	111
3.5 Determinación de la presencia de vesículas extracelulares en cerebro tras su inyección intravenosa.	112
4. Caracterización de las vesículas extracelulares aisladas.....	113
4.1 Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	113
4.2 Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).	113
4.3 Proteómica de vesículas extracelulares de plasma.	114
4.4 Análisis del contenido proteico de las vesículas mediante inmunoblot.	115
5. Análisis de marcadores de neuroinflamación por inmunoblot o Western blot.....	117
6. Análisis de neuroinflamación mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.	119
6.1 Preparación del tejido.....	119
6.2 Inmunohistoquímica.....	119
6.3 Inmunofluorescencia.	121
6.4 Análisis de activación de microglía (Iba1 y CD68).	122
6.5 Análisis de activación de astrocitos (GFAP).....	122
6.6 Análisis de TNF α e IL-1 β en hipocampo.....	122

6.7. Análisis de expresión de NF-κB en microglía.	123
6.8. Análisis de la ratio núcleo/citosol del factor NF-κB.	123
7. Análisis de expresión en membrana.	123
8. Evaluación de las alteraciones cognitivas y motoras.	125
8.1 Test beam walking: coordinación motora.	125
8.2 Laberinto radial de 8 brazos.	125
8.3 Memoria de localización de objetos y memoria de reconocimiento de objetos.	127
8.4 Laberinto en Y.	128
9. Análisis estadístico.	129
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	133
SECCIÓN A. Papel de las vesículas extracelulares de plasma de ratas hiperamonémicas en la inducción de la neuroinflamación y los déficits cognitivos y motores.	133
Caracterización de las vesículas extracelulares (EVs) aisladas de plasma de ratas hiperamonémicas.....	133
1. Microscopía electrónica, análisis de seguimiento de nanopartículas y análisis de marcadores de superficie por Western blot.	133
2. Análisis del contenido proteico de las EVs mediante proteómica y Western blot.	135
CAPÍTULO 1. Las EVs de plasma de ratas hiperamonémicas inducen neuroinflamación en cerebelo e incoordinación motora en ratas control.	141
EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	141
1.1 Las vesículas inyectadas alcanzan el cerebelo.	141
1.2 Las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas inducen activación de microglía y astrocitos en cerebelo de ratas control.	142
1.3 Las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas alteran el contenido de marcadores de neuroinflamación en cerebelo.	144
1.4 Las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas inducen incoordinación motora en ratas control.	147
EXPERIMENTOS <i>EX VIVO</i>	148
1.5 La incubación <i>ex vivo</i> con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas induce activación de microglía y astrocitos en cortes de cerebelo de ratas control, en un proceso dependiente de TNFα.....	148
1.6 El TNFα de las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas activa la vía de NF-κB en cortes de cerebelo de ratas control.....	151
1.7 La incubación <i>ex vivo</i> con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas aumenta el contenido de proteínas relacionadas con la incoordinación motora en cortes de cerebelo de ratas control.	152

DISCUSIÓN	155
CAPÍTULO 2. Las EVs de plasma de ratas hiperamonémicas inducen neuroinflamación en el hipocampo y déficits de memoria en ratas control.	163
EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	163
2.1 Las vesículas inyectadas alcanzan el hipocampo.	163
2.2 Las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas inducen activación de microglía y astrocitos en hipocampo de ratas control.	163
2.3 Las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas alteran el contenido en marcadores de neuroinflamación en hipocampo.	164
2.4 Las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas inducen déficits cognitivos en ratas control.	166
EXPERIMENTOS <i>EX VIVO</i>	169
2.5 La incubación <i>ex vivo</i> con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas induce activación de microglía y astrocitos en cortes de hipocampo de ratas control.	169
2.6 La incubación <i>ex vivo</i> con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas aumenta el contenido de IL-1 β y TNF α en neuronas de cortes de hipocampo de ratas control.	171
2.7 La incubación <i>ex vivo</i> con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas induce una polarización en la microglía hacia un estado pro-inflamatorio en cortes de hipocampo de ratas control.	172
2.8 La incubación <i>ex vivo</i> con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas altera la expresión en membrana de receptores AMPA y NMDA en cortes de hipocampo de ratas control.	174
2.9 La incubación <i>ex vivo</i> con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas induce neuroinflamación y altera la neurotransmisión en cortes de hipocampo de ratas control activando la vía de señalización de NF- κ B mediante TNF α	175
DISCUSIÓN	181
SECCIÓN B. Evaluación del efecto del tratamiento con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales sobre la neuroinflamación y las alteraciones cognitivas y motoras en ratas hiperamonémicas	187
Caracterización de las vesículas extracelulares aisladas de células madre mesenquimales (MSC-EVs).	187
CAPÍTULO 3. Las EVs de células madre mesenquimales revierten la neuroinflamación en cerebelo y la incoordinación motora asociada en ratas hiperamonémicas.	189
EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	189
3.1 Las vesículas inyectadas alcanzan el cerebelo.	189
3.2 Las vesículas extracelulares de MSCs revierten la activación de microglía y astrocitos en cerebelo de ratas hiperamonémicas.	189

3.3 Las vesículas extracelulares de MSCs revierten las alteraciones en el contenido de marcadores de neuroinflamación en cerebelo de ratas hiperamonémicas.	191
3.4 Las vesículas extracelulares derivadas de MSCs restauran la coordinación motora en ratas hiperamonémicas.	195
EXPERIMENTOS <i>EX VIVO</i>	196
3.5 La incubación <i>ex vivo</i> con vesículas extracelulares de MSCs revierte la activación de microglía y astrocitos en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas, en un proceso dependiente de TGFβ.	196
3.6 La incubación <i>ex vivo</i> con vesículas extracelulares de MSCs normaliza el contenido de proteínas relacionadas con la incoordinación motora en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas.	199
3.7 El TGFβ de las vesículas extracelulares de MSCs reduce la activación de NF-κB en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas.	200
DISCUSIÓN	203
CAPÍTULO 4. Las EVs de células madre mesenquimales revierten la neuroinflamación en hipocampo y los déficits cognitivos asociados en ratas hiperamonémicas.	209
EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	209
4.1 Las vesículas inyectadas alcanzan el hipocampo.	209
4.2 Las vesículas extracelulares de MSCs revierten la activación de microglía y astrocitos en hipocampo de ratas hiperamonémicas.	210
4.3 Las vesículas extracelulares derivadas de MSCs revierten las alteraciones en el contenido de marcadores de neuroinflamación en hipocampo de ratas hiperamonémicas.	212
4.4 Las vesículas extracelulares de MSCs restauran la memoria y el aprendizaje en ratas hiperamonémicas.	215
EXPERIMENTOS <i>EX VIVO</i>	218
4.5 La administración <i>ex vivo</i> de EVs de MSCs revierte la activación de microglía y astrocitos en el hipocampo de ratas hiperamonémicas y normaliza el contenido de IL-1β y TNFα.	219
4.6 La administración <i>ex vivo</i> de EVs de MSCs induce un cambio en la polarización de la microglía en el hipocampo de ratas hiperamonémicas de un estado pro-inflamatorio a un estado anti-inflamatorio.	222
4.7 La administración <i>ex vivo</i> de EVs de MSCs normaliza la expresión en membrana de subunidades de receptores AMPA y NMDA en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.	224
4.8 La administración <i>ex vivo</i> de EVs de MSCs reduce la activación de NF-κB en cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas a través de la vía TGFβ-TGFβR2-Smad7-IκBα.	226
DISCUSIÓN	231

ÍNDICE

CONCLUSIONS	239
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	243



SUMMARY

SUMMARY

BACKGROUND

1. HEPATIC ENCEPHALOPATHY

Patients with liver cirrhosis may show hepatic encephalopathy (HE), a complex neuropsychiatric syndrome which may progress to coma and death. Many patients with cirrhosis who do not show evident symptoms of HE show minimal HE (MHE), with attention deficits, mild cognitive impairment, psychomotor slowing and motor incoordination. MHE is associated with reduced performance in daily tasks, quality of life and life span and increased risk of accidents, falls, hospitalizations and clinical HE. MHE is an important health, social and economic problem (Felipo, 2013). However, there are no specific treatments for the neurological alterations of MHE.

Hyperammonemia is a main contributor to the cognitive and motor alterations of MHE (Shawcross et al., 2004 and 2007; Felipo et al., 2012), which are reproduced by animal models of chronic hyperammonemia (Rodrigo et al., 2010; Johansson et al., 2015; Hernandez-Rabaza et al., 2016a and 2016b; Cabrera-Pastor et al., 2019a; Malaguarnera et al., 2019; Taoro-Gonzalez et al., 2019).

There is increasing evidence that pathological situations leading to sustained peripheral inflammation result in mild cognitive impairment. This may occur in many different diseases including diabetes, rheumatoid arthritis, chronic hyperammonemia or liver cirrhosis (Montoliu et al., 2015). Peripheral inflammation also plays a key role in cognitive impairment in neurodegenerative diseases such as multiple sclerosis, Huntington's, Parkinson's or Alzheimer's diseases (Ferrari and Tarelli, 2011; Murta and Ferrari, 2016; Wood, 2018; Valadão et al., 2020).

In all these pathological situations, sustained peripheral inflammation triggers neuroinflammation, which alters neurotransmission, leading to mild cognitive impairment. However, the mechanisms by which peripheral signals associated to sustained inflammation are transmitted to the brain to induce neuroinflammation in each pathological situation may be different. Some classical mechanisms proposed for the transmission of peripheral signals to the brain are: a) infiltration of peripheral lymphocytes or monocytes into the brain, usually in more serious pathological situations such as multiple sclerosis or stroke (Lopes Pinheiro et al., 2016) and b) activation by pro-inflammatory interleukins such as IL-6, IL-1 β or TNF α of their receptors in endothelial cells and subsequent transmission of inflammatory signal into the brain, which may also occur in milder pathological situations such as fever (Rummel et al., 2006).

Studies in rats with chronic hyperammonemia and MHE show that the cognitive and motor alterations are a consequence of altered neurotransmission which, in turn, is a consequence of neuroinflammation (reviewed in Cabrera-Pastor et al. (2019a)). For example, hyperammonemia induces neuroinflammation in hippocampus, with activation

of microglia and astrocytes and increased pro-inflammatory factors such as IL-1 β and TNF α . This neuroinflammation alters membrane expression of NMDA and AMPA receptors leading to impairment of spatial learning and memory (Hernandez-Rabaza et al., 2016a; Taoro-Gonzalez et al., 2018 and 2019b; Cabrera-Pastor et al., 2019a and 2019b; Malaguarnera et al., 2019). These alterations may be reversed by reducing neuroinflammation and this can be done by increasing cGMP, with anti-inflammatories or modulating GABAergic neurotransmission (Hernandez-Rabaza et al., 2016a; Taoro-Gonzalez et al., 2018 and 2019b; Cabrera-Pastor et al., 2019a and 2019b; Malaguarnera et al., 2019). However, these treatments may have secondary effects in patients with liver cirrhosis and other procedures to reduce neuroinflammation would have more therapeutic utility.

2. EXTRACELLULAR VESICLES: PATHOLOGICAL ROLE

The study of extracellular vesicles has acquired a high relevance in the last years, since they play a key role in intercellular communication and there is increasing evidence of their contribution to the development of different pathologies.

The field of EVs comprises all the vesicles released by cells. The terminology in the literature can be confusing because at the beginning the vesicles were named depending on the cell type of origin in which they were discovered. Currently, the international society of extracellular vesicles defines EVs as “particles naturally released from the cell that are delimited by a lipid bilayer and cannot replicate, i.e. do not contain a functional nucleus” (Théry et al., 2018).

Regarding their size and biogenesis, EVs can be classified into three main types (Kalra et al., 2016):

- **Exosomes.** They are probably the most studied type in recent publications. They are vesicles about 30-150 nm of size that originate from inside the cell at the multivesicular body (MVB) by a specific process of sorting and are released to the extracellular space following the fusion of the MVB with the plasmatic membrane. Their composition depends on the exosome's cellular origin and it is generally enriched for certain molecules such as tetraspanins (CD9, CD63, CD81), Alix or Tsg101. EVs can contain proteins, nucleic acids and lipids.
- **Ectosomes or microvesicles.** They have a size of 100-1000 nm and are directly formed from the plasmatic membrane.
- **Apoptotic bodies.** They have a size 50-5000 nm and are formed by several mechanisms in apoptotic cells.

EVs are released by all the cells in the organism and they are present in different body fluids, such as blood, urine or cerebrospinal fluid (Yáñez-Mo et al., 2015).

After their release from the parent cell, EVs can interact with target cells in different ways (French et al., 2017): 1) through direct interaction between surface molecules, 2) fusing with the membrane of the receptor cell and releasing their content, 3) by internalization in the cell through phagocytosis, pinocytosis or 4) clathrin mediated endocytosis.

It was first believed that they were just cellular garbages, a way to get rid of debris and unwanted compounds. However, there were some papers that changed this vision. In 1996, Raposo et al. discovered that exosomes derived from B lymphocytes contained MHC type II and were able to activate T cells. These data suggested a role for exosomes in antigen presentation. In 2007, it was discovered that the vesicles contain both mRNA and microRNA, which can be delivered to another cell and can be functional in this new location (Ratajczak et al., 2006; Valadi et al., 2007).

After that, EVs have demonstrated to play a key role in cell to cell communication, being involved in a wide range of physiological and pathological functions, such as the liver or brain function (Isola and Chen, 2007). More specifically, EVs play an important role in inflammatory pathologies. EVs act on the innate immune system as paracrine messengers and have been mainly described as pro-inflammatory mediators in pathologies such as infections, sepsis, chronic inflammatory diseases or autoimmune diseases (Yáñez-Mo et al., 2015).

EVs may act as mediators of neuroinflammation and may transmit pathological effects from the periphery to the brain (Gupta and Pulliam, 2014). Under pathological situations, these EVs may contain proteins and microRNAs that transmit the pro-inflammatory signals into the brain triggering neuroinflammation and mild cognitive and/or motor impairment. For example, EVs are increased in serum of children with autism spectrum disorder and stimulate human microglia to secrete IL-1 β , which may explain what triggers inflammation in brain of these children (Tsiolini and Theoharides, 2018). EVs of sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients transport pathological proteins which might play a role in prion-like propagation of ALS disease (Sproviero et al., 2018). Li et al. (2018) gave evidence about the contribution of peripheral circulating inflammatory extracellular vesicles to neuroinflammation. In this study, inflammation was induced in mice by injection of LPS. Then, they isolated exosomes from serum of those mice and injected them to recipient mice without inflammation. It was observed that the exosomes were able to induce microglial and astrocyte activation in the hippocampus. They also labelled the exosomes with fluorescence and confirm that they reached the brain, mainly colocalizing with microglia. Han et al. (2019) showed that intravenous treatment of mice with exosomes from serum of patients with Parkinson's disease evoke protein aggregation, trigger dopamine neuron degeneration, induce microglial activation and cause movement defects.

3. EXTRACELLULAR VESICLES: THERAPEUTIC POTENTIAL

Recent reports show that extracellular vesicles (EVs) from mesenchymal stem cells (MSCs) reduce neuroinflammation in different pathological situations. MSCs are multipotent non-hematopoietic cells that present immunomodulatory, anti-inflammatory and regenerative properties (Squillaro et al., 2016; Galipeau and Sensébé, 2018; Trento et al., 2018). They exert their therapeutic effects mainly in a paracrine manner, secreting different chemokines, cytokines and growth factors (Deng et al., 2015; Wang et al., 2015; Yao et al., 2015; Gnecci et al., 2016). EVs released by MSCs can recapitulate the

beneficial effects of the parental MSCs, emerging as a promising alternative to whole cell therapy (Lou et al., 2017; Bagno et al., 2018). EVs released by MSCs act as mediators between the MSCs and the target cells, carrying bioactive proteins, microRNAs and lipids (Heldring et al., 2015). The use of EVs derived from MSCs presents several advantages for clinical use compared to whole cell therapy including higher safety profile and lower immunogenic capacity (Liew et al., 2017).

MSC-derived EVs therapy emerges as a promising strategy to treat diseases with an inflammatory component, such as inflammatory bowel disease, arthritis, sepsis, graft-versus-host disease, colitis, multiple sclerosis and type I diabetes (Le Blanc et al., 2004; Zappia et al., 2005; Lee et al., 2006; Augello et al., 2007; Gonzalez et al., 2009; Németh et al., 2009; Kim et al., 2013).

Riazifar et al. (2019) showed that EVs derived from MSCs activated with IFN γ reduce neuroinflammation and demyelination and improve functional outcomes in a chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) murine model.

Reza-Zaldivar et al. (2019) observed that MSC-derived EVs enhance neurogenesis and restore cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease established by injection of beta amyloid 1–42 aggregates into dentate gyrus.

In experimental stroke, intravenous administration of MSCs-derived EVs increases neurogenesis, neurite remodelling, and angiogenesis, improving animals' functional recovery (Xin et al., 2013). Similar results were observed in a traumatic brain injury model, showing an inflammation reduction and improved outcomes after MSCs-derived EVs administration (Zhang et al., 2015). Injection of MSCs-derived exosomes also reduced inflammation and promote neuro-regeneration in a rat model of spinal cord injury (Han et al., 2015; de Rivero Vaccari et al., 2016).

HYPOTHESES AND OBJECTIVES

Hepatic encephalopathy is a complex neuropsychiatric syndrome present in patients with liver disease. Hyperammonemia and inflammation act synergistically, inducing neuroinflammation and altering the neurotransmission, which leads to cognitive and motor alterations. Rats fed an ammonium containing diet reproduce the motor and cognitive deficits exhibited by patients with minimal hepatic encephalopathy, a milder stage of the pathology. The mechanisms by which peripheral alterations are transmitted to the brain are not fully understood.

Recent studies show that extracellular vesicles (EVs) play a pivotal role in intercellular communication, being involved in a wide range of inflammatory and immunological processes. Besides, they can cross the blood-brain barrier, emerging as a relevant communication mechanism between the periphery and the brain.

Hypothesis 1. These data lead us to hypothesize that extracellular vesicles contribute to the pathogenesis of hyperammonemia and hepatic encephalopathy, transmitting the systemic effects of hyperammonemia and peripheral inflammation to the brain.

Our **objectives** regarding this hypothesis are:

- **1.1.** To investigate whether chronic hyperammonemia alters the content and/or the quantity of extracellular vesicles in rat plasma.
- **1.2.** To assess whether extracellular vesicles isolated from plasma of hyperammonemic rats induce neuroinflammation in cerebellum and hippocampus when injected into control rats.
- **1.3.** To evaluate whether extracellular vesicles isolated from plasma of hyperammonemic rats impair motor and cognitive function when injected into control rats.
- **1.4.** To analyze the molecular mechanisms involved in the induction of neuroinflammation and motor and cognitive impairment in control rats by EVs from hyperammonemic rats.

On the other hand, several studies suggest a therapeutic potential for extracellular vesicles isolated from mesenchymal stem cells (MSCs), specially in pathologies with an inflammatory component.

Hypothesis 2. Our second main hypothesis is that treatment with EVs from mesenchymal stem cells could be useful to reverse the neuroinflammation and the motor and cognitive alterations found in hyperammonemia and hepatic encephalopathy.

Our **objectives** regarding this hypothesis are:

- **2.1.** To study whether the *in vivo* treatment with extracellular vesicles from MSCs reverses neuroinflammation in cerebellum and hippocampus of hyperammonemic rats.

- **2.2.** To evaluate whether the treatment with extracellular vesicles from MSCs restores cognitive and motor function in hyperammonemic rats.
- **2.3.** To investigate the molecular mechanisms by which the extracellular vesicles from MSCs reduce neuroinflammation and restore motor and cognitive function in hyperammonemic rats.

METHODS

1. Animal model of chronic hyperammonemia.

Male Wistar rats (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) of 6-7 weeks of age were made hyperammonemic by feeding them an ammonium-containing diet (30 % ammonium acetate) as in Felipo et al. (1988a). All the experiments were approved by the Comité de Experimentación y Bienestar Animal (CEBA) of our Center and by Conselleria de Agricultura of Generalitat Valenciana and were performed in accordance with guidelines of the Directive of the European Commission (2010/63/EU) for care and management of experimental animals.

2. Study design.

In vivo experiments

- **Injection of extracellular vesicles from hyperammonemic rats into control rats**

Our hypothesis is that extracellular vesicles (EVs) could play a role in the transmission of the effects of hyperammonemia and peripheral inflammation to the brain, inducing neuroinflammation and thus contributing to the pathogenesis of hepatic encephalopathy. To investigate the effects of EVs from hyperammonemic rats, the following experiment was designed:

Control rats were distributed into three groups (n = 22 rats per group): control rats injected with PBS, phosphate-buffered saline, PBS); control rats injected with extracellular vesicles from plasma of control rats (C-EVs); and control rats injected with extracellular vesicles from plasma of hyperammonemic rats (HA-EVs).

2-month old rats were intravenously injected in the tail vein either with 50 µg of protein of EVs from control or hyperammonemic rats in 300 µl of PBS, or the same volume of PBS as vehicle. A second injection was performed one week later. Behavioral tests (Y maze, novel object location and novel object recognition memory tests and beam walking test) were performed 9-16 days after first injection and rats were sacrificed at day 17 to extract the brain and dissect the cerebellum and hippocampus for further analyses as described below.

- **Injection of extracellular vesicles from mesenchymal stem cells into hyperammonemic rats**

The second main objective of this thesis was to evaluate the beneficial effect of extracellular vesicles from mesenchymal stem cells (MSC-EVs) as potential treatment to reverse the neuroinflammation and the neurological deficits in hyperammonemic rats. To address this goal, the following experiment was designed:

Animals were distributed into four groups (n = 18 rats per group): control rats injected with PBS, phosphate-buffered saline, (C+PBS); control rats treated with MSC-derived

extracellular vesicles (C+EVs); hyperammonemic rats injected with PBS (HA+PBS) and hyperammonemic rats treated with MSC-EVs (HA+EVs).

After 2 weeks of hyperammonemia, rats were intravenously injected in the tail vein either with 50 µg of protein of EVs from MSCs in 300 µl of PBS, or the same volume of PBS as vehicle. A second injection was performed one week later. Behavioral tests (Y maze, novel object location and novel object recognition memory tests, radial maze and beam walking test) were performed 10-20 days after the first injection and rats were sacrificed at day 25 to extract the brain and dissect the cerebellum and hippocampus for further analyzes as described below.

Ex vivo experiments

Once evaluated the in vivo effects induced by the EVs, both from plasma and from MSCs, the next step was to investigate the molecular mechanisms responsible for these effects. For that purpose, we decided to use an ex vivo approach, in which the tissue of interest (i.e. cerebellum and hippocampus) is dissected from the animal, cut into slices and kept alive during a short period of time in a specialized system.

Control and hyperammonemic rats after 4-5 weeks of hyperammonemia were used for the ex vivo experiments. Animals were sacrificed by decapitation and the brain was extracted. The hippocampi and cerebelli were dissected and immediately immersed into ice-cold Krebs buffer (NaCl 119 mM, NaHCO₃ 26.2 mM, glucose 11 mM, KCl 2.5 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KH₂PO₄ 1 mM aerated with 95% O₂ and 5% CO₂ at pH 7.4). After that, hippocampi were placed longitudinally on a manual chopper and cut to obtain transverse slices (400 µm) and cerebelli were cut on a vibratome to obtain transverse slices (400 µm). Slices were transferred to incubation wells in a perfusion system (Campden Instruments, Model 7450) and incubated for 15 min at 35.5 °C in Krebs buffer for stabilization. Once stabilized, the slices were incubated during 30 min at 35.5 °C with the following treatments, all of them dissolved in Krebs buffer and aerated:

Control slices

- C+Inflix: 10 µg/mL of infliximab (Remicade), an anti-TNF α
- C+rec TNF α : 10 ng/mL of recombinant TNF α (Abcam)
- C+HA-EVs: 10 µg/mL of extracellular vesicles from hyperammonemic rats
- C+HA-EVs+Inflix: 10 µg/mL of EVs from hyperammonemic rats previously incubated with 10 µg/mL of infliximab (Remicade) for 1 hour at 37 °C
- C+HAInflix-EVs: 10 µg/mL of extracellular vesicles from hyperammonemic rats treated in vivo with infliximab (see section 3)

Hyperammonemic slices

- HA+anti-TGF β : 2 µg/mL of anti-TGF β antibody (Abcam)
- HA+rec TGF β : 1 ng/mL of recombinant TGF β (Milteny Biotec)
- HA+EVs: 10 µg/mL of extracellular vesicles from MSCs

- HA+EVs+anti-TGF β : 10 μ g/mL of extracellular vesicles from MSCs previously treated with 1.2 μ g/mL of anti-TGF β antibody (Abcam) for 1 hour at 37 °C
- HA+EVs lacking TGF β : 10 μ g/mL of extracellular vesicles from MSCs lacking TGF β ;
- HA+EVs+anti-TGF β R: 10 μ g/mL of extracellular vesicles from MSCs plus 2 μ g/mL of Galunisertib, an antagonist of TGF β receptor.

Slices from control and hyperammonemic rats incubated in Krebs buffer without treatment were included as reference in each experiment (C and HA, respectively).

3. Extracellular vesicle isolation.

Plasma EVs

Plasma from hyperammonemic rats (at 5 weeks of hyperammonemic diet) and control rats of the same age was obtained. Rats were sacrificed by decapitation and total blood was collected from the neck in tubes with EDTA (7.5 mM). Blood was centrifuged at 3.000 g for 10 min at 20°C to separate the plasma, which was kept frozen at -80°C. Plasma from a previous study (Balzano et al., 2020b) in which hyperammonemic and control rats were treated with infliximab (an anti-TNF α antibody) was also used. In this study, infliximab (Remicade, Merck, Spain) was administered i.v. (5mg/kg) in the tail vein. infliximab treatment begun one day before starting the ammonia-diet and was maintained weekly for 4 weeks until sacrifice.

To isolate EVs from plasma, 3 mL of plasma were thawed on ice, diluted to 20 mL with sterile PBS and centrifuged at 2000 g for 20 min at 4°C. Supernatants were collected, filtered through 0.22 μ m sterile filters and centrifuged at 150.000 g for 16 hours at 4°C. Supernatants were removed and pellets were washed by ultracentrifugation at 150.000 g for 2 hours and 110.000 g for 70 min at 4°C. Pellets were resuspended in 100 μ L of PBS and stored at -80°C. 6 μ L were used for protein quantification by the bicinchoninic acid method.

MSC-EVs

Human adipocyte derived mesenchymal stem cells, kindly given by HistoCell Ltd. (Spain), obtained from subcutaneous fat as previously described (Castro et al., 2019), were expanded and grown in growth medium (GM: High glucose DMEM basal medium supplemented with 20% FBS (previously centrifuged at 100.000 g for 1 hour and then filtered through 0.2 μ m filter for EVs depletion), 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine)). To evaluate the role of TGF β , some of the MSC cultures were transfected with a lentiviral construction containing the sequence of a shRNA that binds to TGF β transcript and prevents its translation into protein. Subconfluent cells were incubated in GM for 48 hours and then media were collected and cleared from detached cells and cells fragments by centrifugation at 300 g and then, the supernatant at 2000 g for 10 min, respectively. Subsequently, apoptotic bodies and other cellular debris were pelleted by centrifugation of the resulting supernatant at 10.000 g for 30 min. EVs were then pelleted from the previous resulting supernatant at 100.000 g for

1 hour. The EV pellets were washed with PBS and centrifuged at 100.000 x g for 1 hour. The EVs were finally suspended into 100 µl PBS. Protein content was measured by the bicinchoninic acid method and samples were stored at -80°C.

Fluorescent labeling of extracellular vesicles. To check whether injected EVs reach the brain, we performed a parallel experiment in different rats (n = 4 for plasma EVs and n = 4 for MSC-EVs). Vesicles were labeled with the dye Dil (Sigma) as described by Jiang et al. (2018). Rats were intravenously injected with 100 µg of protein of fluorescently labeled vesicles and sacrificed under anesthesia by perfusion with paraformaldehyde at 72 h. Fixed brains were collected and immediately frozen in optimal cutting temperature compound (OCT). 10 µm sections were cut on a cryostat and counterstained with Calbindin (1:500, Abcam), Iba1 (1:300, WAKO), NeuN (1:200, Millipore), GFAP (1:400, Sigma) and Alix (1:200, Abcam), followed by goat anti-rabbit or goat anti-mouse Alexa 488 secondary antibody (1:400, Invitrogen) and DAPI staining of the nuclei. Images were acquired with a Leica TCS SP8 inverted laser scanning confocal microscope using oil objectives: 63X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N.A.

4. Extracellular vesicles characterization.

Nanoparticle Tracking Analysis. Distribution profile, size and quantity of vesicles were assessed by Nanoparticle Tracking Analysis with a NanoSight NS300 system (Malvern, UK) using a 1:100 dilution of exosome samples.

Transmission Electron Microscopy. Electron microscopy was performed as described by Théry et al. (2006). Briefly, isolated vesicles were loaded onto carbon-coated copper grids and contrasted with 1% uranyl acetate. Samples were examined with a transmission electron microscope and images were acquired using a digital camera.

Analysis of protein cargo of EVs by immunoblotting. Samples were subjected to electrophoresis and immunoblotting. Primary antibodies used were against Alix (1:1000, Abcam), Flotillin-2 (1:500, Fisher), Hsp70 (1:1000, Proteintech), CD9 (1:1000, Abcam), Glutamine Synthetase (1:5000, BD Biosciences), TIMP-3 (1:1000, Abcam), TNFα (1:500, RD systems), TNFR1 (1:500, Abcam), Galectin-3 (1:1000, Abcam), TGFβ (1:1000, Abcam), Calnexin (1:1000, Novus Biologicals), Lamin A/C (1:500, Santa Cruz) and Histone3 (1:1000, Abcam). Anti-actin (1:5000, Abcam) was used as protein loading control. Secondary antibodies were anti-rabbit, anti-rat or anti-goat IgG conjugated with alkaline phosphatase (1:4000, Sigma; 1:10.000 for actin). Membranes were scanned and band intensities were quantified using Alpha Imager 2200 version 3.1.3

Proteomic analysis. Differential expression of proteins was analyzed in the SCSIE University of Valencia using EVs isolated from plasma of 8 control and 8 hyperammonemic rats. An equivalent amount of all the samples were pooled to build the spectral library from a 1D SDS-PAGE gel. The run corresponding to the library was cut and digested with sequencing grade trypsin as described by Shevchenko et al. (1996). 5 µl of each digested pool were loaded onto a trap column (NanoLC Column, 3µ C18-CL, 75 µm x 15cm; Eksigent) and desalted with 0.1% trifluoroacetic acid at 3µL/min, 5 min.

Peptides were loaded onto an analytical column (LC Column, 3 μ C18-CL, 75 μ m x 12 cm, Nikkyo) equilibrated in 5% acetonitrile, 0.1% formic acid. Peptide elution was carried out with a linear gradient of 5 to 40% B in 60 min (A: 0.1% formic acid; B: acetonitrile, 0.1% formic acid) for at a flow rate of 300nl/min. Peptides were analyzed in a mass spectrometer nanoESI qTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX) and in ProteinPilot search engine (Sciex) to generate peak list. For individual SWATH analysis 20 μ g of protein was loaded in a 1D SDS-PAGE gel. Sample was digested with trypsin as above. Peptides were analyzed in the mass spectrometer and the tripleTOF was operated in swath mode, in which a 0.050 s TOF MS scan from 350–1250 m/z was performed, followed by 0.080 s product ion scans from 350–1250 m/z on the 32 defined windows (3.05 sec/cycle). The Swath windows used were: 15 Da window widths from 450 to 1000 Da, 37 windows. Individual SWATH injections were randomized and analyzed by Peak View 2.1. In the differently expressed proteins in HA-EVs, a category distribution analysis was performed using the platforms Paintomics and Gene Ontology.

5. Analysis of protein content by Western blot.

Injected animals were sacrificed by decapitation and the hippocampi and cerebelli were dissected and homogenized. Hippocampal and cerebellar slices from the ex vivo experiments were collected after the incubation with the treatments and homogenized by sonication for 20 s in a buffer (Tris-HCl 66 mM pH 7.4, SDS 1%, EGTA 1 mM, glycerol 10%, leupeptin 0.2 mg/mL, NaF 1 mM, Na orto-vanadate 1 mM). Samples were subjected to electrophoresis and Western blot. Primary antibodies used were against IL-6 (1:500, Invitrogen), IL-1 β (1:500, RD Systems), IL-18 (1:1000, Abcam), IL-4 (1:1000, Abcam), IL-10 (1:1000, Abcam), Arginase1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), TNF α (1:500 RD Systems), TGF β (1:1000, Abcam), TGF β R2 (1:1000, Millipore), Smad7 (1:100, Invitrogen), phospho-Smad2/3 (1:1000, Cell Signaling), I κ B α (1:10.000, Abcam), phospho-I κ B α (1:10.000, Sigma), CD68 (1:1000, Abcam), TNF α (1:500, RD systems), TNFR1 (1:250, Abcam), Glutaminase 1 (1:1000, Novus Biologicals), GAT3 (1:1000, Synaptic Systems), BDNF (1:1000, Abcam), CCL2 (1:1000, Proteintech), CCL20 (1:1000, Abcam), P2X4R (1:500, Invitrogen) and P2X7R (1:1000, Abcam). β -actin (1:5000, Abcam) or GAPDH (1:5000, Millipore) were used as protein loading control. Secondary antibodies were anti-rabbit or anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (1:4000, Sigma). Membranes were scanned using the ScanJet 5300C and band intensities were quantified using Alpha Imager 2200 version 3.1.3.

6. Neuroinflammation analysis by immunohistochemistry and immunofluorescence.

In the in vivo experiments, cerebelli and hippocampi were dissected after the sacrifice of the animals. Half of these areas were used for immunohistochemistry or immunofluorescence analysis. To do that, tissue was fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) at 4°C.

For the ex vivo approach, slices were fixed with the same solution. Paraffin-embedded sections (5 μ m) were cut and mounted onto coated slide glasses.

For immunohistochemistry, sections were sequentially incubated with 3% H₂O₂ for 15 min to quench endogenous peroxidase activity, blocking serum (normal goat serum or horse serum) and primary antibodies (4°C, overnight) against: Iba1 (1:300, Wako), GFAP (1:400, Sigma), IL-1 β (1:200, Abcam), TNF α (1:200, Abcam). Then, slides were incubated with biotinylated secondary antibodies (1:200, Vector Laboratories) goat anti-mouse, goat anti-rabbit and horse anti-goat for 1 hour, followed by incubation with VECTASTAIN ABC kit (Vector Laboratories) for 30 min and diaminobenzidine for 10 min. Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (DAKO) for 5 min. Sections were scanned with an Aperio Versa system (Leica Biosystems, Germany). From these scans, images of the regions of interest were acquired at different magnifications using ImageScope64 software.

For immunofluorescence, sections were incubated with primary antibody against CD68 (1:100, Abcam), rabbit anti-mouse Alexa 488 secondary antibody (1:400, Invitrogen) and DAPI to visualize cell nuclei. For double immunofluorescence, primary antibodies were NF- κ B p50 (1:200, Abcam) and Iba1 (1:300, Abcam), followed by donkey anti-mouse Alexa 488 and donkey anti-rabbit Alexa 647 secondary antibodies (1:400, Invitrogen) and DAPI. Eight images per rat were acquired with a confocal microscope using oil objectives: 63X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N.A.

Analysis of microglia and astrocytes activation

For each rat, 10-12 fields at 40x magnification were quantified. Microglial activation was analyzed in hippocampus and in white matter and molecular layer of the cerebellum. As microglia acquires an amoeboid morphology when the cells are activated, activation was analyzed by measuring the area of Iba1 stained cells with IpWin 32 software program and a reduction in the area was considered as activation. Microglial activation was also confirmed by manually counting the number of CD68 positive cells after immunofluorescence staining and the result was expressed as number of positive cells/mm².

Astrocytes activation was analyzed by measuring the GFAP stained area in hippocampus and in white matter of the cerebellum with ImageJ software. In this case, an increase in the percentage of GFAP stained area was interpreted as activation of the astrocytes.

Analysis of TNF α and IL-1 β

For each rat, at least 6 fields at 40x magnification were acquired. Intensity of IL1 β and TNF α staining in CA1 region of hippocampus was quantified using the ROI manager function in ImageJ: CA1 region was manually selected and four squared regions outside the granular layer were also taken and considered as background. Inverted values of Mean Gray value were recorded and the mean intensity of the four background regions was subtracted to the CA1 region intensity. Mean intensity of the different fields captured for each rat was calculated and results were expressed as a percentage of control group.

Analysis of NF-κB activation

The number of microglial cells expressing NF-κB in cerebellum or hippocampus was manually counted in the confocal images and expressed as number of positive cells/mm².

To calculate the ratio of Nuclear/Cytoplasmic NF-κB p50 intensity in CA1 region of hippocampus, we used ImageJ as previously described in Dadsetan et al. (2016b): nuclei in CA1 region were manually outlined using ROI manager function on DAPI blue channel and the selection was applied on green channel (p50) to measure nuclear fluorescence, measuring Mean Gray value intensity for each nucleus. Granular layer of CA1 region was also outlined and the green fluorescence was measured in this area. Cytoplasmic content of p50 was calculated as: [total green fluorescence in CA1] – [green fluorescence in CA1 nuclei]. Then, cytoplasmic/nuclear ratio of p50 intensity was calculated and values were expressed as percentage of the control group.

7. Membrane expression analysis.

Membrane expression of the GluA1 and GluA2 subunits of AMPA receptors, NR2B subunit of NMDA receptors and TGFβ receptor 2 was analyzed in hippocampal slices by cross-linking with BS3 (bis(sulfosuccinimidyl) suberate, Rockford). After the ex vivo treatments (see above), slices were added to tubes containing ice-cold Krebs buffer with or without 2 mM BS3 and incubated for 30 min at 4 °C with gentle shaking. Cross-linking was terminated by quenching the reaction with 100 mM glycine (10 min, 4 °C). The slices were transferred to tubes with buffer (Tris-HCl 66 mM pH 7.4, SDS 1%, EGTA 1 mM, glycerol 10%, leupeptin 0.2 mg/mL, NaF 1 mM, Na ortho-vanadate 1 mM) and homogenized by sonication for 20 s. Samples treated or not with BS3 were analyzed by Western blot as described above, using the following primary antibodies: GluA1 (1:1000, Millipore), GluA2 (1:2000, Millipore), NR2B (1:1000, Millipore), TGFβR2 (1:1000, Sigma). Secondary antibody was anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (1:4000, Sigma). The membrane expression was calculated as the difference between the intensity of the bands without BS3 (total protein) and with BS3 (non-membrane protein), using Alpha Imager 2200 version 3.1.3 (Alpha Innotech Corporation, San Francisco) to quantify the band intensities.

8. Cognitive and motor function assessment.

Beam walking test: motor coordination

Beam Walking Test was performed as described by Gonzalez-Usano et al. (2014). Rats were made to go through a 1-m-length wooden stick located approximately 1 m above the ground, and two observers counted the number of slips committed by the rats. The number of foot faults (slips) was recorded as a measure of incoordination.

8-Arms Radial Maze: spatial learning

Rats were kept under a caloric restricted diet during the test to maintain the motivation to seek for food. On the first day, rats were habituated to the maze (one session of 5 min

with reward pellets disseminated on the entire maze, followed by one session of 5 min with pellets in the end of the arms). The test was performed in the following 4 days with 5 trials per day. In each trial, the rat was placed in the center of the maze with reward food in four of the arms. Configurations of food location were specific for each rat and were kept invariable through the test. The trial ended after the rat found all the pellets or after a maximum of three minutes. The number of reference memory errors (unbaited arms visited) and working memory errors (entries to arms already visited in the same trial) were calculated. Learning index was defined as the difference between the number of right choices and reference errors as in (Hernández-Rabaza et al., 2016a).

Y-maze: short-term spatial recognition memory

This test is based on the rodents' innate curiosity to explore novel areas and presents no negative or positive reinforcement and very little stress for the rats. The protocol is a modification of the test used by Sarnyai et al. (2000) and Sanderson et al. (2009). The rat was placed into the start arm and allowed to explore the maze with one of the arms closed for 2 min (training trial) for three times, with 1 min of inter-trial interval. After that, the rat was placed again in the start arm and allowed to explore freely all three arms of the maze for 2 min (test trial). Time spent in each arm was recorded and the discrimination ratio was calculated as: $((\text{Time spent in the novel arm} - \text{Time spent in the familiar arm}) / \text{Total time in the two arms})$ were registered.

Novel Object Recognition (NOR) and Novel Object Location (NOL) Memory

NOR and NOL memory tests were performed as in Taoro-Gonzalez et al. (2019b) in an open-field arena (70 x 70 x 40 cm) of black painted wood with visuospatial cues on the walls. Rats were habituated during 3 days in 2 sessions of 5 min per day, allowing them to explore the empty arena. NOL test was performed on day 4. It consists of a sample phase and a test phase. During the sample phase, 2 identical objects were placed in the cage and the rat was allowed to explore them for 3 min. After 2 hours, one of the objects was moved to a different location and the rat was allowed to explore the cage again for 3 min. NOR test was performed on day 5. During the sample phase 2 identical objects were placed in the cage and the rat was allowed to explore them for 3 min. Test phase was performed after 6 hours, with the objects located in the same position but exchanging one of the objects for an unexplored one and allowing the rat to freely explore again for 3 min. Sessions were recorded with a digital camera and the time exploring the familiar stimulus and the novel stimulus (object with different location in the case of NOL and unexplored object in the case of NOR) was counted. Discrimination ratio for each test was calculated as: $((\text{Time exploring novel stimulus} - \text{Time exploring familiar stimulus}) / \text{Total exploration time})$

9. Statistical analysis.

Data are expressed as mean \pm SEM. For immunohistochemistry and immunofluorescence analysis, the average of all the fields for each rat was calculated. All statistical analyzes were performed using GraphPad Prism software 8.1.2 version. Data were analyzed by

parametric T-test when comparing two groups or by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc test when comparing more than two groups. A confidence level of 95% was accepted as significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Section A. Role of extracellular vesicles from plasma of hyperammonemic rats in the induction of neuroinflammation and motor and cognitive deficits

Chronic hyperammonemia alters the amount and protein cargo of EVs in plasma

We first characterized the EVs isolated from plasma of control and hyperammonemic rats. The EVs exhibited properties compatible with exosomes regarding to morphology, size and surface markers. The presence of surface markers typical of exosomes was evaluated by Western blot, revealing that the isolated EVs were positive for Hsp70, Flotillin-2 and CD9. Size distribution profile was analyzed by Nanoparticle Tracking Analysis, showing that the mean diameter of EVs was 143 ± 4 nm.

The amount of EVs was increased in hyperammonemic rats compared with control rats. Different markers of EVs are differentially altered by hyperammonemia. EVs from hyperammonemic rats show increased levels of Flotillin-2 and Hsp70, while the levels of Alix and CD9 are reduced compared to control rats.

Proteomic analysis of the samples revealed differences in the protein cargo of EVs from plasma of hyperammonemic rats compared to EVs from plasma of control rats. Proteomic category distribution analysis using the PaintOmics 3 application showed that 32 % of the differentially expressed proteins were related to Human Disease, 22 % to Metabolism and Organismal Systems, 13 % to Environmental Information Processing, 8 % to Cellular Processes and 2.5 % to Genetic Information Processing. To gain insight into the potential biological function of proteins differentially expressed we applied Gene Ontology (GO) analysis. GO annotations are classified in five categories: cellular component, molecular function, biological process, pathway and protein class. Significant differences in EVs content were related with proteins activated in the extracellular region and cell surface and with binding and catalytic activity. The differences in EVs proteins are mainly associated with biological processes of immune system, response to stimulus, metabolic processes, glutamine/glutamate conversion, integrin and FAS signalling pathways. Defence/immunity proteins, enzymes modulator and receptors are some protein classes differentially expressed in EVs from hyperammonemic rats

We confirmed by Western blot the changes in some of the proteins identified as up-regulated or down-regulated in hyperammonemia by the proteomic analysis. The contents of glutamine synthetase, TIMP-3 and Hsp70 were increased in EVs from hyperammonemic rats compared to controls. The contents of the heavy and light chains of IgG and of CD9 were reduced in EVs from hyperammonemic rats compared to controls. We also analyzed the content of proteins which could mediate some of the hyperammonemia-induced alterations in cerebellum by Western blot. The content of TNF α and of its receptor TNFR1 were increased in EVs from hyperammonemic rats compared to controls. EVs from hyperammonemic rats treated in vivo with infliximab show levels of TNF α and of TNFR1 similar to controls.

CHAPTER 1. Extracellular vesicles from plasma of hyperammonemic rats induce neuroinflammation in cerebellum and motor incoordination when injected to control rats.**1. Injected EVs reach the cerebellum.**

We confirmed that injected EVs reached the cerebellum following intravenous injection to control rats. Dil-labeled EVs co-localized with Purkinje neurons, neurons in white matter and microglial cells in molecular layer and in white matter. No co-localization with astrocytes was observed. The fluorescence signal of Dil-labeled EVs co-localized with Alix, a marker of EVs, confirming that it corresponds to injected labeled EVs.

2. Injection of EVs from hyperammonemic rats induce neuroinflammation in cerebellum of control rats.

We then assessed if injection of EVs from plasma of hyperammonemic rats may transmit deleterious effects to the brain of normal rats. EVs from hyperammonemic rats induced activation of microglia in the molecular layer of cerebellum, reducing the area of microglial cells compared to rats injected with PBS. This effect was specific for EVs from hyperammonemic rats and was not induced by EVs from control rats. Similar microglial activation was observed in white matter. This was further supported by the increased number of microglial cells expressing CD68, a marker of activated microglia.

EVs from hyperammonemic rats also induced astrocytic activation in white matter, increasing the GFAP stained area compared to rats injected with PBS or EVs from control rats.

We also analyzed the content of pro-inflammatory markers in cerebellum by Western blot. The content of CD68, IL-1 β and TNF α was increased in cerebellum of rats injected with EVs from hyperammonemic rats compared to rats injected with PBS or EVs from control rats.

Induction of motor incoordination in hyperammonemic rats is mediated by increased content of TNF α in cerebellum, which activates TNFR1, leading to increased NF- κ B in microglia and glutaminase, which increases GAT3 in activated astrocytes and GABAergic neurotransmission, leading to motor incoordination (Cabrera-Pastor et al., 2018).

We therefore analyzed the parameters involved in this mechanism in cerebellum of rats injected with EVs from control or hyperammonemic rats. The content of TNF α , TNFR1, glutaminase 1 and GAT3 were increased in cerebellum of rats injected with EVs from hyperammonemic rats compared to rats injected with PBS or EVs from control rats. Injection of EVs from hyperammonemic rats also increased expression of NF- κ B in microglia, while EVs from control rats did not.

3. Injection of EVs from hyperammonemic rats induce motor incoordination in control rats.

The effects of EVs injection on motor coordination were assessed using the beam walking test. Injection of EVs from hyperammonemic rats induced motor incoordination, increasing the number of slips compared to rats injected with PBS or EVs from control rats. As a reference, we also included data of control and hyperammonemic rats. These data show that injection of EVs from hyperammonemic rats induces a lack of motor coordination similar to that induced by hyperammonemia per se.

4. Ex vivo incubation of cerebellar slices from control rats with EVs from plasma of hyperammonemic rats induces microglia and astrocytes activation via TNF α .

To better understand the mechanisms leading to neuroinflammation in cerebellum and motor incoordination induced by HA-EVs, we designed an ex vivo experiment, in which cerebelli from control and hyperammonemic rats were cut into slices and these slices were incubated with different solutions, as described in the Methods section.

We confirmed by immunohistochemistry that the ex vivo incubation of cerebellum from control rats with EVs from plasma of hyperammonemic rats reproduced the effects on microglia and astrocytes activation found in vivo. Moreover, this activation was dependent on the TNF α of the vesicles, as HA-EVs pre-treated with an anti-TNF α (infliximab) or EVs isolated from hyperammonemic rats treated with infliximab did not induce these effects, whereas the incubation with recombinant TNF α reproduced the microglia and astrocytes activation.

5. TNF α of EVs from hyperammonemic rats activate NF- κ B signalling in cerebellar slices from control rats.

Since NF- κ B activation in cerebellum is a key step in the induction of motor incoordination in hyperammonemic rats, we investigated whether HA-EVs activated NF- κ B in cerebellar slices from control rats and whether this effect was dependent on the TNF α of the EVs.

Incubation of cerebellar slices from control rats with EVs from hyperammonemic rats induced NF- κ B activation in microglia, increasing the number of microglial cells in white matter expressing the p50 NF- κ B subunit, as assessed by double immunofluorescence. This activation was dependent on the TNF α of the vesicles, as it was prevented if slices were incubated with HA-EVs pre-treated with an anti-TNF α or with EVs isolated from hyperammonemic rats treated with infliximab, whilst incubation with recombinant TNF α reproduced NF- κ B activation.

6. Ex vivo incubation of cerebellar slices from control rats with EVs from plasma of hyperammonemic rats increases the content of proteins related to motor incoordination.

As previously mentioned, some of the proteins involved in the induction of motor incoordination in hyperammonemic rats and which are increased in the cerebellum of hyperammonemic rats are TNF α , its receptor TNFR1, the enzyme glutaminase 1 and the GABA transporter GAT3.

Incubation of cerebellar slices from control rats with EVs from hyperammonemic rats produced a similar increase in the content of these proteins to that found in cerebellar slices from hyperammonemic rats. The incubation of cerebellar slices from control rats with HA-EVs pre-treated with an anti-TNF α or with EVs isolated from hyperammonemic rats treated with infliximab did not increase TNF α , TNFR1, glutaminase 1 and GAT3, whereas the incubation with recombinant TNF α increase them, indicating that the TNF α in the vesicles was mediating these effects.

CHAPTER 2. Extracellular vesicles from plasma of hyperammonemic rats induce neuroinflammation in hippocampus and impair cognition when injected to control rats.

1. Injected EVs reach the hippocampus.

Injected EVs reached the hippocampus following intravenous injection to control rats. Dil-labeled EVs were detected mainly in granular layer neurons and microglia, and to a lesser extent in astrocytes.

2. Injection of EVs from hyperammonemic rats activates microglia and astrocytes in hippocampus of control rats and increases IL-1 β and TNF α .

Hyperammonemic rats show neuroinflammation, with activation of microglia and astrocytes in hippocampus. Activated microglia acquire an amoeboid shape and reduce their processes, thus presenting a reduction in their area. Injection of HA-EVs induced microglial activation in hippocampus of control rats, reducing the area of the microglia. Control rats injected with HA-EVs also exhibited astrocytic activation in hippocampus, with a higher percentage of area stained with GFAP.

The content of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF α is increased in neurons of the CA1 region of hippocampus of hyperammonemic rats. Control rats injected with HA-EVs also showed an increase in IL-1 β and TNF α content in CA1 neurons, as assessed by immunohistochemistry. The total content of IL-1 β and TNF α in hippocampus homogenates was also increased in control rats injected with HA-EVs, as analyzed by Western blot.

3. Extracellular vesicles from hyperammonemic rats impair memory when injected into control rats.

Hyperammonemic rats showed impaired cognitive function, with reduced discrimination ratio both in Novel Object Location (NOL) and Novel Object Recognition (NOR) memory tests. Injection of EVs from hyperammonemic rats to control rats reproduced those effects, reducing the discrimination ratios in NOL and NOR tests compared to the control rats injected with PBS. Hyperammonemic rats also showed impaired short-term memory as measured in the Y Maze, which was also reproduced by injection of HA-EVs to control rats. No significant effects were observed in any of those parameters by the injection of EVs from control rats.

4. Ex vivo incubation of hippocampal slices from control rats with EVs from plasma of hyperammonemic rats induces microglia and astrocytes activation and increases IL-1 β and TNF α content in neurons.

To better understand the mechanisms leading to neuroinflammation in hippocampus and cognitive impairment induced by HA-EVs, we designed an ex vivo experiment, in which hippocampi of control and hyperammonemic rats were cut into slices and these slices were incubated with different solutions, as described in Methods section.

The area of microglial cells was reduced in hippocampal slices from hyperammonemic rats, indicating microglial activation. Ex vivo incubation of hippocampal slices from control rats with HA-EVs produces a similar activation of microglia, which did not occur if the EVs were pre-incubated with infliximab, or if they were isolated from HA rats treated with infliximab. Incubation of control slices with recombinant TNF α also induced microglial activation.

The area stained with GFAP increased in hippocampal slices from hyperammonemic rats, reflecting an astrocytes activation. This was mimicked by ex vivo incubation of slices from control rats with HA-EVs, but not if the EVs were pre-incubated with infliximab or if they were isolated from HA rats treated with Infliximab. Incubation of control slices with recombinant TNF α also induced microglial activation.

The content of IL-1 β and TNF α was increased in neurons of the CA1 region of hippocampus in hyperammonemic rats. Ex vivo incubation with HA-EVs induces a similar increase of IL-1 β and TNF α in slices from control rats, prevented by the pre-incubation of EVs with infliximab.

5. Ex vivo incubation of hippocampal slices from control rats with EVs from plasma of hyperammonemic rats induces a shift in microglia polarization to a pro-inflammatory state.

The content of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF α was increased in hippocampal slices of hyperammonemic rats compared to control rats. On the other hand, the content of the anti-inflammatory factors IL-4, IL-10 and arginase 1 was reduced in

hippocampal slices from HA rats. These results indicate a polarization of the microglia to a pro-inflammatory state in hippocampal slices from HA rats.

Ex vivo incubation of control slices with HA-EVs induced similar effects, increasing the amount of IL-1 β , IL-6 and TNF α and reducing the amount of IL-4, IL-10 and arginase 1 in hippocampi homogenates. Pre-incubation of the HA-EVs with infliximab or incubation with EVs from infliximab treated HA rats did not induce these effects. Incubation with recombinant TNF α also reproduced most of the changes induced by hyperammonemia or HA-EVs: IL-1 β , IL-6, TNF α and arginase 1.

6. Ex vivo incubation of hippocampal slices from control rats with HA-EVs alters membrane expression of NMDA and AMPA receptors

Hyperammonemia increases membrane expression of the NR2B subunit of NMDA receptors and of the GluA2 subunit of AMPA receptors and reduces membrane expression of the GluA1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. Ex vivo incubation of hippocampal slices from control rats with HA-EVs induced similar alterations, increasing the membrane expression of NR2B and GluA2 subunits and reducing the membrane expression of GluA1 subunit. These effects were absent if the EVs were pre-incubated with infliximab or if they were isolated from HA rats treated with infliximab. Incubation of control slices with recombinant TNF α also increased membrane expression of NR2B and GluA2, and reduced membrane expression of GluA1.

7. TNF α in EVs from hyperammonemic rats activates NF- κ B signalling in hippocampal slices from control rats

To further advance in the understanding of the mechanisms by which EVs from hyperammonemic rats induce neuroinflammation in hippocampus, we assessed whether NF- κ B was activated in hippocampal slices from hyperammonemic rats and if this increase was reproduced ex vivo by adding HA-EVs to slices from control rats.

The nuclear content of the p50 subunit of NF- κ B is increased in hippocampal neurons of the granular layer in hyperammonemic rats and the number of microglial cells expressing p50 was also increased. Addition of HA-EVs to slices from control rats induces both an increase in nuclear p50 in neurons and in microglia expressing p50. The increase of p50 was not induced if EVs were pre-treated with infliximab or if EVs were from infliximab treated rats. Incubation with recombinant TNF α also increased p50 nuclear content and microglia expressing p50.

DISCUSSION OF SECTION A

The results reported show that EVs from plasma of hyperammonemic rats reach the cerebellum and the hippocampus when injected into control rats and trigger the mechanisms that lead to neuroinflammation and motor and cognitive impairment in hyperammonemic rats. This supports the idea that EVs would play a key role in the transmission to brain of the deleterious effects of chronic hyperammonemia, a main contributor to the cognitive and motor impairment in cirrhotic patients with minimal or clinical hepatic encephalopathy (Shawcross et al., 2004; Felipo et al., 2012; Felipo, 2013). This cognitive impairment is not induced by injection of EVs from plasma of control rats. This indicates that chronic hyperammonemia induces changes in the content of peripheral EVs which are responsible for the induction of cognitive impairment. Hyperammonemia also increases the amount of EV in plasma. This suggests that hyperammonemia alters the biogenesis of EVs in some peripheral tissue, leading to increased amount and altered content of the EVs, which are transmitted into the brain, leading to cognitive impairment.

The analysis of differentially expressed proteins shows that the differences in EVs proteins are mainly associated with biological processes of the immune system, response to stimulus and metabolic processes and that defense/immunity proteins, enzymes modulators and receptors are differentially expressed in EVs from hyperammonemic rats. It is noteworthy that the contents of the pro-inflammatory TNF α and of its receptor TNFR1 are increased in EVs in hyperammonemia. The results also show that chronic hyperammonemia increases the number of EVs in plasma. Similar increases have been reported in other pathological situations, mostly associated to inflammation. The amount of EVs is increased in serum of patients with alcoholic hepatitis (Momen-Heravi et al., 2015), β -thalassemia (Manakeng et al., 2019), endometrial (Dziechciowski et al., 2018) or lung cancer, correlating with tumor stage (Liu et al., 2018), obesity and diabetes mellitus (Pardo et al., 2018) and chronic obstructive pulmonary disease, associated with systemic inflammation (Tan et al., 2017) and in serum of children with autism spectrum disorder (Tsiolini and Theoharides, 2018). Inflammation seems to trigger the increased amount of EVs in most of these situations.

Once injected, EVs reach the cerebellum and the hippocampus, in agreement with previous studies showing that EVs can cross the blood-brain barrier (Ridder et al., 2014; Gupta and Pulliam, 2014; Li et al., 2018). Into the cerebellum, EVs enter Purkinje neurons, other types of neurons and microglia. In hippocampus, the EVs were detected mainly in microglia and neurons of the granular layer. The cargo of EVs from hyperammonemic rats would alter the function of these cell types. This results in induction of neuroinflammation, with microglia and astrocytes activation.

Injection of EVs from hyperammonemic rats also induces motor incoordination, which is modulated by the **cerebellum**, pointing that EVs are enough to induce the neurological alterations associated to hyperammonemia. As we have recently identified the mechanism by which chronic hyperammonemia induces motor incoordination in rats, we analyzed

whether this mechanism is induced by injection of EVs from hyperammonemic rats and we found that this is the case.

Induction of motor incoordination by chronic hyperammonemia is due to increased TNF α in cerebellum, which activates its receptor TNFR1, leading to increased NF- κ B in microglia and glutaminase, which increases GAT3 in activated astrocytes and GABAergic neurotransmission, leading to motor incoordination (Cabrera-Pastor et al., 2018).

We show here that injection of EVs from hyperammonemic rats also induces this mechanism in cerebellum of normal rats, with similar increases in TNF α , TNFR1, NF- κ B in microglia, glutaminase and GAT3. This shows that these plasma EVs carry the molecules necessary to induce this mechanism and motor incoordination in hyperammonemia and MHE. It is noteworthy that EVs from hyperammonemic rats show increased amounts of TNF α and TNFR1, which trigger the mechanism leading to motor incoordination. The *ex vivo* experiments demonstrate that the increase in the proteins involved in this mechanism is mediated by the TNF α of the EVs from HA rats, since the increases in TNF α , TNFR1, NF- κ B in microglia, glutaminase and GAT3 did not occur if cerebellar slices from control rats were incubated with HA-EVs pre-treated with an anti-TNF α (infliximab) or with EVs isolated from infliximab treated rats.

The injection of EVs from hyperammonemic rats also induce cognitive impairment in control rats, reducing their performance in memory tests. These functions are mainly modulated by the **hippocampus**.

The induction of cognitive impairment by EVs from hyperammonemic rats would be a consequence of the alterations induced in the membrane expression of the GluA1 and GluA2 subunits of AMPA receptors, as previously described for hyperammonemic rats (Hernandez-Rabaza et al., 2016a; Balzano et al., 2020b). These changes in AMPA receptors are a consequence of the increased membrane expression of the NR2B subunit of NMDA receptors, which in turn is a consequence of increased activation of the IL-1 receptor by the increased levels of IL-1 β in hippocampus (Taoro-Gonzalez et al., 2018). All these changes occurring in hippocampus of hyperammonemic rats are reproduced by adding EVs from hyperammonemic rats to hippocampal slices from control rats.

The increase of IL-1 β is therefore a main contributor to the cognitive impairment induced by both hyperammonemia and by EVs from hyperammonemic rats. We therefore analyzed whether EVs from hyperammonemic rats increase IL-1 β in hippocampus from control rats. HA-EVs increase IL-1 β both in microglia and neurons and this would be due to the increased expression and translocation to the nucleus of NF- κ B, respectively, which promotes transcription of IL-1 β and TNF α (Dadsetan et al., 2016b).

In microglia, a main mechanism by which EVs increase the production of IL-1 β is by activating the microglia. EVs from hyperammonemic rats induce microglial activation and induce a switch in the phenotype of microglia in hippocampus of hyperammonemic rats to a classically activated phenotype with increased levels of IL-1 β , IL-6 and TNF α

and reduced levels of IL-4, IL-10 and arginase 1. This would be associated with the activation of NF- κ B, which enhances the transcription of pro-inflammatory proteins.

We also show that the EVs from hyperammonemic rats show increased content of TNF α and of its receptor TNFR1. The increase in TNF α is responsible for the alterations induced in hippocampus by these EVs-HA as demonstrated by the facts that all their effects are prevented if the EVs from hyperammonemic rats are pre-incubated with anti-TNF α (infliximab) and are reproduced *ex vivo* by addition of recombinant TNF α to hippocampal slices from control rats.

It is noteworthy that the induction of neuroinflammation and the other alterations in hippocampus of control rats induced by EVs from hyperammonemic rats did not occur if the EVs are isolated from plasma of hyperammonemic rats peripherally treated with infliximab. These EVs do not show increased content of TNF α . It has been shown that infliximab prevents the induction of peripheral inflammation in hyperammonemic rats, preventing the increase in IL-6, prostaglandin 2 and the reduction of the anti-inflammatory IL-10, but not the increase in blood ammonia levels (Balzano et al., 2020b). This suggests that the peripheral inflammation induced by hyperammonemia is responsible for the increased amount and altered content of EVs in plasma of hyperammonemic rats.

It has been shown that preventing peripheral inflammation in hyperammonemic rats prevents the induction of neuroinflammation in hippocampus and of cognitive impairment (Balzano et al., 2020b). The results reported here suggest that the normalization of the amount and of the content of EVs in plasma by the treatment with infliximab may contribute to the prevention of neuroinflammation and cognitive impairment by infliximab in hyperammonemic rats.

A role for EVs in the transmission of deleterious effects from peripheral blood to brain has been recently proposed in a few studies in other pathological situations and models, mostly associated to sustained inflammation. Ridder et al. (2014) purified EVs from blood cells of transgenic mice expressing Cre recombinase specifically in the hematopoietic lineage and injected it into brain of normal mice. These EVs transfer functional RNA to different neuronal types in brain, including Purkinje neurons. This EVs transfer is strongly promoted by peripheral inflammation and induces physiologically relevant changes as indicated by the fact that Purkinje neurons that receive EVs RNA display a different miRNA profile compared to their non-recombined counterparts. These observations reveal the existence of a mechanism by which EVs communicate signals between the hematopoietic system and brain in response to inflammation.

Peripheral EVs may also trigger neuroinflammation. Li et al. (2018) purified serum EVs from a mice model of endotoxemia induced by treatment with LPS and injected them to normal mice. They found that this induced microglial activation, astrogliosis, and increased expression of pro-inflammatory IL-6 and TNF α in hippocampus and cerebral cortex of recipient mice. This supports that during systemic inflammation, circulating EVs may transmit to the brain signals that trigger neuroinflammation.

Intravenous injection to mice of exosomes from serum of patients with Parkinson's disease evoke symptoms similar to those suffered by the patients, including protein aggregation, dopaminergic neurons degeneration, microglial activation and movement defects (Han et al., 2019).

These reports, together with the present results, suggest that EVs may play a relevant role in the transmission of deleterious effects from peripheral blood to brain in different pathological situations, including hyperammonemia and minimal hepatic encephalopathy. We show here that EVs also contribute to the induction of neuroinflammation and motor and cognitive impairment in hyperammonemia and likely MHE.

The cargo of EVs is altered differently in different pathologies and would be responsible for the transmission of the specific pathological mechanisms. The identification of the components of the cargo of EVs responsible for triggering neuroinflammation and the effects induced by the EVs will allow to understand in great detail the pathological events responsible for neurological impairment. This may permit to design more effective treatments to improve motor coordination and cognitive function in hyperammonemia and MHE.

Section B. Evaluation of the effects of treatment with extracellular vesicles from mesenchymal stem cells on the neuroinflammation and cognitive and motor alterations in hyperammonemic rats

Characterization of EVs from mesenchymal stem cells.

Negative staining of the isolated vesicles and visualization by transmission electron microscopy confirmed the presence of small concave-shaped extracellular vesicles (< 200 nm) in the samples. Mode size diameter of EVs was 126 ± 8 nm measured by nanoparticle tracking analysis in three replicates, with a concentration of $1.14 \pm 0.09 \times 10^{11}$ particles/mL. Western blot analysis shows that EVs isolated from MSCs contain the EV markers Alix, Hsp70, Flotillin-2 and CD9, as well as TGF β . These data confirm that the samples contain true EVs.

CHAPTER 3. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells reduce neuroinflammation in cerebellum and restore motor coordination in hyperammonemic rats.

1. Injected EVs from MSCs reach the cerebellum.

EVs from MSCs reached the cerebellum following intravenous injection into hyperammonemic rats. Dil-labeled EVs co-localized with Purkinje neurons, neurons in white matter, microglial cells in molecular layer and in white matter and astrocytes.

2. In vivo administration of EVs from MSCs reverse microglia and astrocytes activation in cerebellum of hyperammonemic rats.

Hyperammonemic rats show activation of microglia and astrocytes in hippocampus. Activated microglial cells acquire an amoeboid shape and reduce their processes, thus presenting a reduction in their area. The area of microglial cells was reduced in cerebellum of hyperammonemic rats and the injection of MSC-EVs reversed this effect. The percentage of area stained with GFAP increased in cerebellum of hyperammonemic rats, reflecting an increase in astrocyte activation, which was also reversed by injection of MSC-EVs. None of these parameters was significantly altered in control rats injected with MSC-EVs compared to control rats injected with PBS.

3. Injection of EVs from MSCs induce a shift in microglia polarization in cerebellum of hyperammonemic rats from pro-inflammatory to anti-inflammatory.

The content of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-18 and IL-1 β was increased in cerebellum of hyperammonemic rats compared to control rats. The injection of MSC-EVs normalized the levels of these cytokines.

In contrast, the levels of anti-inflammatory factors IL-4, IL-10 and arginase 1 were reduced in cerebellum of hyperammonemic rats and the injection of MSC-EVs reversed this effect, normalizing IL-4, IL-10 and arginase 1 content. None of these parameters was

significantly altered in control rats injected with MSC-EVs compared to control rats injected with PBS.

4. Injection of EVs from MSCs restore motor coordination in hyperammonemic rats and normalizes the content of proteins related to motor incoordination.

The effects of MSC-EVs injection on motor coordination were assessed using the beam walking test. Hyperammonemic rats show motor incoordination, committing a higher number of slips during the test compared to control rats. Intravenous administration of EVs from mesenchymal stem cells normalized motor coordination in hyperammonemic rats. Injection of MSC-EVs to control rats did not affect motor coordination.

Induction of motor incoordination in hyperammonemic rats is mediated by increased content of TNF α in cerebellum, which activates TNFR1, leading to increased NF- κ B in microglia and glutaminase, which increases GAT3 in activated astrocytes and GABAergic neurotransmission, leading to motor incoordination (Cabrera-Pastor et al., 2018).

We therefore analyzed whether the injection of EVs from MSCs normalizes the levels of these proteins. The content of TNF α , TNFR1, glutaminase 1 and GAT3 was increased in cerebellum of hyperammonemic rats and the administration of EVs from MSCs reduced the content of these proteins, to a similar level of that of control rats.

5. Ex vivo incubation of cerebellar slices from hyperammonemic rats with EVs from MSCs reverses microglia and astrocytes activation and this effect is mediated by TGF β .

To better understand the mechanisms by which MSC-EVs reverse neuroinflammation in cerebellum and motor incoordination in hyperammonemic rats, we designed an ex vivo experiment, in which cerebelli of control and hyperammonemic rats were cut into slices and these slices were incubated with different solutions, as described in Methods section.

We confirmed by immunohistochemistry that the ex vivo incubation of cerebellum from hyperammonemic rats with EVs from MSCs reverses the microglia and astrocytes activation, similar to the reversal found in vivo. Moreover, this reversal of glial activation was dependent on the TGF β of the vesicles, as EVs pre-treated with an anti-TGF β or EVs isolated from MSCs lacking TGF β did not reverse glial activation. In contrast, incubation with recombinant TGF β reversed the microglia and astrocytes activation.

5. TGF β of EVs from MSCs reduces the activation of NF- κ B signalling in cerebellar slices from hyperammonemic rats.

Since NF- κ B activation in cerebellum is a key step in the induction of motor incoordination in hyperammonemic rats, we investigated whether MSC-EVs reduced NF- κ B activation in cerebellar slices from hyperammonemic rats and whether this effect was dependent on the TGF β of the EVs.

Cerebellar slices from hyperammonemic rats showed NF- κ B activation in microglia, with an increase in the number of microglial cells in white matter expressing p50 NF- κ B subunit, as assessed by double immunofluorescence. Incubation with EVs from MSCs reversed this activation. This beneficial effect was dependent on the TGF β of the vesicles, as it was prevented if slices were incubated with EVs pre-treated with an anti-TGF β or EVs isolated from MSCs lacking TGF β , whilst incubation with recombinant TGF β reduced NF- κ B activation.

6. Ex vivo incubation of cerebellar slices from hyperammonemic rats with EVs from MSCs normalizes the content of proteins related to motor incoordination.

As previously mentioned, some of the proteins involved in the induction of motor incoordination in hyperammonemic rats and which are increased in the cerebellum of hyperammonemic rats are TNF α , its receptor TNFR1, the enzyme glutaminase 1 and the GABA transporter GAT3.

The incubation of cerebellar slices from hyperammonemic rats with EVs from MSCs normalized the content of TNF α , TNFR1, glutaminase 1 and GAT3, as assessed by Western blot. This normalization did not occur if the cerebellar slices from hyperammonemic rats were incubated with EVs pre-treated with an anti-TGF β or EVs isolated from MSCs lacking TGF β and was mimicked by incubation with recombinant TGF β , indicating that the TGF β of the vesicles was mediating these effects.

CHAPTER 4. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells reduce neuroinflammation in hippocampus and restore cognitive function in hyperammonemic rats.

1. EVs from MSCs reach the hippocampus.

EVs from MSCs reached the hippocampus following intravenous injection into hyperammonemic rats. Dil-labeled EVs were detected mainly in microglia and granular layer neurons. The red fluorescence signal of Dil-labeled EVs co-localized with Alix, a marker of EVs, confirming that it corresponds to injected labeled EVs.

2. In vivo administration of EVs from MSCs reverses microglia and astrocytes activation in hippocampus of hyperammonemic rats and normalizes TNF α and IL-1 β content.

Hyperammonemic rats show neuroinflammation, with activation of microglia and astrocytes in hippocampus. Activated microglial cells acquire an amoeboid shape and reduce their processes, thus presenting a reduction in their area. The area of microglial cells was reduced in hippocampus of hyperammonemic rats and the injection of MSC-EVs reversed this effect. The percentage of area stained with GFAP increased in hippocampus of hyperammonemic rats, reflecting an increase in astrocyte activation, which was also reversed by injection of MSC-EVs. The content of the pro-inflammatory cytokines TNF α and IL-1 β was increased in neurons of the CA1 region of hippocampus

of hyperammonemic rats. Injection of MSC-EVs normalized the amount of both cytokines.

None of these parameters was significantly altered in control rats injected with MSC-EVs compared to control rats injected with PBS.

3. In vivo injection of EVs induces a shift in microglia polarization in hippocampus of hyperammonemic rats from pro-inflammatory to anti-inflammatory.

The content of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-1 β was increased in hippocampi of hyperammonemic rats compared to control rats. The injection of MSC-EVs normalized the levels of both cytokines.

In contrast, the levels of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 was reduced in hyperammonemic rats and the injection of MSC-EVs reversed this effect, normalizing IL-4 and IL-10 content. The content of arginase 1, a marker of anti-inflammatory microglia, was reduced in hippocampi of hyperammonemic rats and was also normalized by injection of MSC-EVs.

None of these parameters was significantly altered in control rats injected with MSC-EVs compared to control rats injected with PBS.

4. EVs from MSCs restore memory and learning in hyperammonemic rats.

Hyperammonemic rats show impaired cognitive function, with reduced discrimination ratio both in Object Location and Object Recognition Memory tests. Injection of MSC-EVs to hyperammonemic rats reverses this impairment. Hyperammonemic rats injected with MSC-EVs show a discrimination ratio in the OLM similar to control rats and even better than control rats in ORM.

Hyperammonemic rats also show impaired short-term memory as measured by the discrimination ratio in the Y Maze, which was also reversed by injection of EVs.

Learning, reference memory and working memory were assessed in the 8-arm Radial Maze. Learning index was significantly lower in hyperammonemic than in control rats at day 4 of the test and was normalized by injection of EVs. Hyperammonemic rats showed impaired reference memory, with increased reference memory errors at day 4 of the test and total number of reference memory errors. Both parameters were normalized by injection of MSC-EVs. No significant differences were found in working memory errors among experimental groups, although a tendency towards an increased total number of working memory errors in hyperammonemic rats can be observed.

The above results show that i.v. injection of EVs from MSCs reduces neuroinflammation in hippocampus and restores cognitive function in hyperammonemic rats. To advance in the understanding of the mechanisms involved in the beneficial effects of EVs from MSCs we used an ex vivo system allowing to analyze in detail the mechanisms involved. Freshly isolated hippocampal slices from hyperammonemic rats were treated ex vivo with EVs

from MSCs. We first assessed if this ex vivo system reproduces the effects on neuroinflammation found in vivo.

5. Ex vivo administration of EVs from MSCs reverses microglial and astrocytic activation in hippocampus of hyperammonemic rats and normalizes TNF α and IL-1 β content.

The area of microglial cells was reduced in hippocampal slices of hyperammonemic rats and ex vivo treatment with MSC-EVs reversed this effect. The area stained with GFAP increased in hippocampal slices from hyperammonemic rat, reflecting an astrocytes activation. This was reversed ex vivo by MSC-EVs. The content of TNF α and IL-1 β were increased in neurons of the CA1 region of hippocampus of hyperammonemic rats. Treatment with MSC-EVs normalized the amount of TNF α and IL-1 β . The ex vivo system reproduces therefore the effects of EVs from MSCs on neuroinflammation found in vivo.

6. Ex vivo treatment with EVs induces a shift in microglia polarization in hippocampus of hyperammonemic rats from pro-inflammatory to anti-inflammatory.

The contents of IL-6, IL-1 β and TNF α were increased in hippocampal slices of hyperammonemic rats compared to control rats. Treatment with MSC-EVs normalized the levels of these pro-inflammatory cytokines.

The contents of IL-4 and IL-10 and arginase 1 were reduced in hyperammonemic rats and addition of MSC-EVs normalized them. These results show that the ex vivo system reproduces the effects on microglia polarization found in vivo in hyperammonemic rats injected with EVs from MSCs and it is therefore adequate to analyze the underlying mechanisms.

7. TGF β mediates the beneficial effects of MSC-EVs observed ex vivo.

It has been proposed that MSCs modulates microglia activation via TGF β secretion and also that EVs from MSCs contain TGF β on their surface which mediates some beneficial effects of these EVs (Noh et al., 2016; Wada et al., 2010; Yu et al., 2013; Shelke et al., 2019; Yao et al., 2019). On the basis of these reports we hypothesized that the beneficial effects of EVs from MSCs on neuroinflammation in hyperammonemic rats would be mediated by TGF β present in their membranes. To assess this possibility, we tested if the beneficial effects of EVs from MSCs in the ex vivo system are prevented by blocking TGF β action by co-incubating with anti-TGF β or by adding an antagonist of TGF β receptor along with the EVs.

We also prepared MSCs lacking TGF β and assessed if the EVs from these MSCs lacking TGF β loss their beneficial effects. Finally, we also assessed if the direct addition of recombinant TGF β to the hippocampal slices from hyperammonemic rats reproduces the beneficial effects of EVs from MSCs.

Incubation with anti-TGF β or depletion of TGF β from the MSCs completely eliminated the capacity of EVs from MSCs to reverse microglia and astrocytes activation, thus supporting that TGF β in the surface of the EVs is inducing these effects. This is further supported by the fact that addition of recombinant TGF β to the hippocampal slices from hyperammonemic rats also reduces microglia and astrocytes activation similarly to MSCs EVs.

Similar results were obtained for inflammatory markers. Anti-TGF β prevented the reduction by EVs of IL-1 β and TNF α in hippocampal neurons of hyperammonemic rats as assessed by immunohistochemistry.

TGF β also is responsible for the shift of microglia polarization from pro-inflammatory to anti-inflammatory induced by EVs from MSCs in hippocampus of hyperammonemic rats. Co-incubation with anti-TGF β or depletion of TGF β from the MSCs prevented the reduction by EVs of the levels of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β and TNF α as well as the increase of the anti-inflammatory IL-4, IL-10 and arginase 1. Moreover, addition of recombinant TGF β is also able to induce the shift to the anti-inflammatory form of microglia, reducing IL-6, IL-1 β and TNF α and increasing IL-4, IL-10 and arginase 1. These data indicate that TGF β in the surface of the EVs is responsible for the reduction of glial activation and neuroinflammation induced by EVs from MSCs.

8. Ex vivo administration of MSC-EVs reverses the alterations in membrane expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal slices from hyperammonemic rats.

Hernandez-Rabaza et al. (2016a), Taoro-Gonzalez et al. (2018 and 2019a) and Balzano et al. (2020b) have shown that neuroinflammation induces alterations in the membrane expression of AMPA (GluA1 and GluA2) and NMDA (NR2B) receptor subunits in hippocampus, which are responsible for the impairment of spatial learning in hyperammonemic rats and that treatments that normalize membrane expression of these subunits restore cognitive function.

We therefore assessed if addition of EVs from MSCs to hippocampal slices from hyperammonemic rats normalizes membrane expression of AMPA and NMDA receptors subunits. Hyperammonemia increases membrane expression of the NR2B subunit of NMDA receptors and of the GluA2 subunit of AMPA receptors and reduces membrane expression of the GluA1 subunit of AMPA receptors. Treatment with EVs from MSCs normalized the membrane expression of NR2B, GluA1 and GluA2 subunits. This normalization of membrane expression of AMPA and NMDA receptor subunits would mediate the restoration of cognitive function. The normalization of membrane expression of NR2B, GluA1, and GluA2 did not occur in the presence of anti-TGF β or when EVs lacking TGF β were used and was mimicked by addition of recombinant TGF β . This indicates that TGF β in the surface of MSCs EVs is responsible for the normalization of membrane expression of NMDA and AMPA receptor subunits, which in turn would be responsible for restoration of learning and memory in hyperammonemic rats.

9. MSC-EVs reduce NF- κ B activation in hippocampal slices from hyperammonemic rats through the TGF β -TGF β R2-Smad7-I κ B α pathway.

Dadsetan et al. (2016b) reported that in rats with porta-cava shunts, another model of MHE, the increased levels of IL-1 β and TNF α in hippocampus are a consequence of increased activation and nuclear translocation of NF- κ B. To further advance in the understanding of the mechanisms by which EVs from MSCs reduce neuroinflammation in hippocampus of hyperammonemic rats, we assessed whether nuclear translocation of NF- κ B is increased in hippocampal slices from hyperammonemic rats and if this is reversed by MSCs EVs.

The nuclear content of the p50 subunit of NF- κ B is increased in hippocampal neurons in hyperammonemic rats and also the NF- κ B content is increased in microglia and these increases are reversed by EVs from MSCs. The normalization of nuclear NF- κ B does not occur if EVs from MSCs are added in the presence of anti-TGF β or if the EVs are depleted of TGF β . Moreover, addition of recombinant TGF β reproduces the effects of EVs, indicating that TGF β in the EVs is responsible for this effect.

We then tried to understand how TGF β reduces NF- κ B signalling. It has been shown that TGF β may inhibit NF- κ B signalling by inducing Smad7, which enhances the transcription of I κ B α , a key inhibitor of NF- κ B signalling pathway. Smad7 may also disrupt the TRAF–TAK1–TAB2/3 complex, thus inhibiting NF- κ B signalling (Yan et al., 2009). We therefore assessed if the Smad7-I κ B α pathway could be mediating the effects of EVs TGF β on NF- κ B signalling in hippocampal slices of hyperammonemic rats. We found that hyperammonemia reduces Smad7 content in hippocampus and this is associated with a parallel reduction of the I κ B α content. Moreover, hyperammonemia also increased the phosphorylation of I κ B α . All these factors would contribute to enhanced nuclear translocation of NF- κ B and activation of NF- κ B signalling, including transcription of IL-1 β and TNF α .

Treatment of the hippocampal slices from hyperammonemic rats with EVs from MSCs normalized the levels of Smad7 and I κ B α , as well as the phosphorylation of I κ B α , which returned to values similar to control rats. Normalization of these parameters did not occur in EVs are added in the presence of anti-TGF β or if TGF β -depleted EVs are used. Moreover, the levels of Smad7 and I κ B α , and phosphorylation of I κ B α are also normalized if recombinant TGF β is added to the hippocampal slices from hyperammonemic rats.

These data support the idea that TGF β in the surface of EVs from MSCs reverses the enhanced NF- κ B signalling in hippocampus of hyperammonemic rats by normalizing the levels of Smad7 and I κ B α .

We then assessed if the reduced levels of Smad7 and I κ B α in hippocampus of hyperammonemic rats could be due to reduced levels of TGF β , or to reduced content or membrane expression of its receptors. The content of TGF β was reduced in hippocampal slices from hyperammonemic rats and was restored to normal levels by treatment with

EVs from MSCs or with recombinant TGF β , but not by EVs lacking TGF β . Hyperammonemia also reduced the total content and membrane expression of the TGF β receptor 2, which were also normalized by treatment with EVs from MSCs or with recombinant TGF β but not by EVs in the presence of anti-TGF β or by EVs lacking TGF β .

To confirm that the beneficial effects of EVs from MSCs are mediated by activation of TGF β receptors by TGF β present in the membrane surface of EVs, we assessed if these beneficial effects are prevented by blocking TGF β receptors 1 and 2 with a selective antagonist. The results show that this is the case. Blocking TGF β receptors also prevents the beneficial effects of EVs from MSCs on neuroinflammation, preventing the reduction of NF- κ B activation in neurons and microglia, the normalization of Smad7, I κ B α and p-I κ B α , of TGF β levels and of TGF β receptor 2 amount and membrane expression. Blocking TGF β receptors also prevents the reversal of microglial and astrocytes activation and the shift of microglia from pro- to anti-inflammatory form induced by EVs, preventing the changes in IL-6, IL-1 β , TNF α , IL-4, IL-10 and arginase 1.

DISCUSSION OF SECTION B

The data obtained in this section show that EVs from MSCs injected to hyperammonemic rats reach the cerebellum and the hippocampus, reduce glial activation and neuroinflammation and restore cognitive and motor function in hyperammonemic rats. Moreover, as discussed below, the results also unveil the underlying mechanisms involved in these beneficial effects of EVs from MSCs and support the idea that these EVs may be a good therapeutic agent to reverse cognitive impairment in cirrhotic patients with minimal or clinical hepatic encephalopathy.

Hyperammonemia is a main contributor to the neurological (both cognitive and motor) alterations in patients with MHE or clinical HE (Shawcross et al., 2004; Felipo et al., 2012; Felipo, 2013). In fact, in the last decades the main treatments of these patients aim to reduce ammonia levels using lactulose, reducing protein intake or by other means (Gluud et al., 2016; Zucker and Redulla, 2019). In the last decade, it has been shown that the deleterious effects of hyperammonemia on cognitive and motor function are mediated by induction of neuroinflammation, which alters neurotransmission, leading to the impairment of cognitive and motor function (reviewed by Cabrera-Pastor et al. (2019a)). Studies in animal models of hyperammonemia and MHE show that cognitive and motor function may be restored by different pharmacological approaches acting on different steps of pathways involved in inflammation, neuroinflammation or GABAergic neurotransmission (Cauli et al., 2009; Rodrigo et al., 2010; Agusti et al., 2011; Johansson et al., 2015; Hernández-Rabaza et al., 2015, 2016a and 2016b; Dadsetan et al., 2016a and 2016b; Cabrera-Pastor et al., 2017 and 2018; Malaguarnera et al., 2019). However, most of these treatments would have secondary effects if used in patients with liver cirrhosis and MHE or clinical HE. For example, non-steroidal anti-inflammatory drugs such as ibuprofen may induce serious renal problems in cirrhotic patients or inhibitors of phosphodiesterase 5 could aggravate hemodynamic problems in advanced cirrhosis. Therefore, safe procedures to reduce neuroinflammation without inducing secondary effects are needed to treat patients with hyperammonemia and MHE or clinical HE.

A promising approach to reduce neuroinflammation in different types of pathologies is the use of EVs from MSCs. EVs are natural carrier systems that transfer information from the original cells to the recipient cells mainly through transmission of proteins and microRNAs. A main advantage of EVs as therapeutic agents is that they can cross the blood-brain barrier and transfer the information to brain cells, thus avoiding the problems of transport restriction through the blood-brain barrier presented by many pharmacological drugs.

Mesenchymal stem cells modulate the innate and adaptive immune system and show potent anti-inflammatory properties which have motivated their use in many clinical trials to treat different pathologies (Martin-Rufino et al., 2019). Recent studies indicate that EVs from MSCs may induce similar beneficial effects with lower immunogenic response and easier transport to brain (Liew et al., 2017; Otero-Ortega et al., 2018; Baek et al., 2019; Mendt et al., 2019; Seo et al., 2019).

EVs from MSCs have been shown to attenuate neuroinflammation evoked by ischemic brain injury (Dabrowska et al., 2019; Go et al., 2019; Kang et al., 2019), perinatal brain injury (Thomi et al., 2019) and may be also useful in models of Alzheimer's disease (Reza-Zaldivar et al., 2019), Parkinson's disease (Vilaça-Faria et al., 2019) or multiple sclerosis (Shamili et al., 2019).

We show here that EVs from MSCs also reduce neuroinflammation in cerebellum and hippocampus and restore cognitive function in rats with chronic hyperammonemia. The mechanisms involved in these beneficial effects of EVs from MSCs are also described.

In hyperammonemic rats, motor incoordination is due to alterations in the **cerebellum** involving an increase of the GABAergic tone. TNF α is increased in the cerebellum of hyperammonemic rats, which activates its receptor TNFR1, leading to the activation of NF- κ B. This enhances glutaminase production, extracellular glutamate, GAT3 and extracellular GABA, leading to motor incoordination (Cabrera-Pastor et al., 2018).

We show here that injection of EVs from mesenchymal stem cells to hyperammonemic rats reduce microglia and astrocytes activation and the levels of TNF α , TNFR1, glutaminase and GAT3 in cerebellum. These effects were reproduced ex vivo. The ex vivo experiments show that incubation of cerebellar slices from hyperammonemic rats with EVs from mesenchymal stem cells reduce NF- κ B activation in microglia, which is one of the key steps of the pathway leading to motor incoordination. We also demonstrate ex vivo that these beneficial effects are mediated by the TGF β of the vesicles, since the incubation with EVs pre-treated with anti-TGF β or with EVs from MSCs lacking TGF β did not reduce the microglia and astrocytes activation, the levels of TNF α , TNFR1, glutaminase and GAT3 or NF- κ B activation. In contrast, these effects were mimicked by the incubation of the cerebellar slices from hyperammonemic rats with recombinant TGF β .

Impairment of cognitive functions modulated by **hippocampus** in hyperammonemic rats are a consequence of altered membrane expression of the GluA1 and GluA2 subunits of AMPA receptors, which in turn are due to increased membrane expression of the NR2B subunit of NMDA receptors (Hernandez-Rabaza et al., 2015 and 2016a; Taoro-Gonzalez et al. 2018 and 2019a; Balzano et al., 2020b; Cabrera-Pastor et al., 2019a). We show here that EVs from MSCs restore learning and memory of hyperammonemic rats in different tasks modulated by hippocampus (object location and object recognition memory test, short term memory in the Y maze and learning and reference memory in the radial maze). Restoration of learning and memory was associated with a normalization of membrane expression of the GluA1 and GluA2 subunits of AMPA receptors, which would be the cause for the recovery of learning and memory.

The altered membrane expression of GluA1, GluA2 and NR2B in hippocampus of hyperammonemic rats is a consequence of increased activation of the IL-1 receptor by the increased levels of IL-1 β (Taoro-Gonzalez et al., 2018). EVs from MSCs normalize membrane expression of AMPA and NMDA receptors by normalizing IL-1 β levels.

The increase in IL-1 β in hippocampus of hyperammonemic rats has a dual origin. Part of the IL-1 β is synthesized in activated microglia and part in neurons. EVs from MSCs normalize IL-1 β production both in microglia and in neurons.

We show that hyperammonemia increases the levels of mRNA for IL-1 β likely due to increased transcription promoted by NF- κ B as well as the level of IL-1 β protein. Treatment with EVs from MSCs reduce to normal levels NF- κ B activation and both mRNA and protein for IL-1 β . In microglia, a main mechanism by which EVs reduce IL-1 β levels is by reducing microglia activation. EVs from MSCs reduce microglial activation and induce a switch in the phenotype of microglia in hippocampus of hyperammonemic rats, from a classically activated phenotype with increased levels of IL-1 β and IL-6 and reduced levels of IL-4 and arginase 1 to an anti-inflammatory phenotype with normalized levels of these cytokines. This is associated with a reduction of NF- κ B levels, which would reduce transcription of pro-inflammatory proteins. This effect is similar to the phenotype switch described by Noh et al. (2016), who reported that MSCs modulate the functional properties of microglia via TGF β secretion, switching them from a classically activated phenotype to an inflammation-resolving phenotype. This suggests that TGF β in the surface of EVs would mediate the switch in the phenotype of microglia in hippocampus of hyperammonemic rats. This is further supported by the fact that deactivation of microglia by EVs from MSCs is prevented by anti-TGF β or in EVs lacking TGF β and is reproduced by direct addition of TGF β to the hippocampal slices. Activation of TGF β receptors in microglia by TGF β in the surface of EVs from MSCs would therefore trigger the shift to reduce the pro-inflammatory phenotype of microglia in hyperammonemic rats. This is further supported by the fact that blocking TGF β receptors with a selective antagonist prevents the induction of the shift. This shift would be associated with a reduced synthesis of IL-1 β in microglia.

Concerning neurons, the increased transcription of IL-1 β in hyperammonemia and MHE is due to increased nuclear translocation of NF- κ B, which promotes transcription of IL-1 β , TNF α and other pro-inflammatory factors (Dadsetan et al., 2016b). EVs from MSCs reduces activation of NF- κ B signalling in neurons in hippocampal slices from hyperammonemic rats by reducing the nuclear translocation of NF- κ B, thus reducing to normal levels the amounts of IL-1 β , TNF α and other pro-inflammatory factors which transcription is promoted by NF- κ B.

The normalization of IL-1 β levels in microglia and neurons reverses the enhanced activation of IL-1 receptor in hippocampus of hyperammonemic rats, thus normalizing membrane expression of GluA1, GluA2 and NR2B and cognitive function.

We assessed how EVs reduces NF- κ B translocation to the nucleus and, therefore, all subsequent events mentioned above.

Noh et al. (2016) proposed that MSCs can modulate the functional properties of microglia via TGF β secretion, switching them from a classically activated phenotype to an inflammation-resolving phenotype. EVs from MSCs and from other cell types contain TGF β on their surfaces (Wada et al., 2010; Yu et al., 2013; Shelke et al., 2019). This

TGF β seems to mediate some of the beneficial effects of EVs. Exosomes expressing TGF β in their membranes show a potent immunosuppressive activity and inhibit murine experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a model for multiple sclerosis (Yu et al., 2013). Exosomes derived from MSCs reverse epithelial-mesenchymal transition via TGF β /Smad pathway and promote repair of damaged endometrium (Yao et al., 2019).

On the basis of these reports we hypothesized that the reversal by EVs from MSCs of increased nuclear translocation of NF- κ B in hippocampal neurons of hyperammonemic rats would be mediated by TGF β present in the EVs membranes. We performed experiments showing that the reversal of nuclear translocation of NF- κ B by EVs is prevented by anti-TGF β or by blocking TGF β receptors, is not induced by EVs from MSCs lacking TGF β and is mimicked by addition of recombinant TGF β . This supports that the reversal of increased nuclear translocation of NF- κ B in neurons by EVs from MSCs is mediated by TGF β in the surface of the EVs. This would be associated with a reduced synthesis of IL-1 β and other pro-inflammatory markers in hippocampal neurons of hyperammonemic rats.

We then tried to understand how TGF β reduces NF- κ B signalling. Noh et al. (2016) reported that MSC-secreted TGF β inhibits the NF- κ B pathway in LPS-activated microglia by modulating Smad2/3 phosphorylation through the TGF β 1 receptor. Activation of the TGF β -Smad2 pathway is also involved in the differentiation of umbilical cord derived MSCs to carcinoma-associated fibroblasts induced by gastric cancer exosomes (Gu et al., 2012). We therefore tested if the Smad2/3 pathway could be mediating the effects of EVs TGF β on NF- κ B signalling in hippocampal slices of hyperammonemic rats, but, as indicated in the results section, this was not the case.

TGF β may also inhibit NF- κ B signalling by inducing Smad7, which enhances the transcription of I κ B α , a key inhibitor of NF- κ B signalling pathway. Smad7 may also disrupt the TRAF-TAK1-TAB2/3 complex, thus inhibiting NF- κ B signalling (Yan et al., 2009). We show that hyperammonemia reduces the content of Smad7 and I κ B α in hippocampus, which are restored by treatment with EVs from MSCs and also by treatment with recombinant TGF β . This suggests that normalization of the Smad7-I κ B α pathway would be mediating the effects of TGF β on EVs on NF- κ B signalling in neurons in hippocampal slices of hyperammonemic rats.

We also found that hyperammonemia reduces TGF β levels in hippocampus as well as the total content and membrane expression of TGF β receptor 2. This should result in reduced function of pathways modulated by TGF β and its receptors and may explain the reduction in the content of Smad7 and I κ B α in hyperammonemic rats.

In summary, this work shows that hyperammonemic rats show reduced levels of TGF β and membrane expression of TGF β receptors in hippocampus. This leads to activation of microglia to a pro-inflammatory phenotype and to reduced Smad7-I κ B α pathway, which induces nuclear translocation of NF- κ B in neurons. Both microglia activation and NF- κ B translocation induce an increase in IL-1 β synthesis in microglia and neurons. The increased levels of IL-1 β lead to enhanced activation of the IL-1 receptor which, in turn,

alters membrane expression of AMPA and NMDA receptor subunits, leading to cognitive impairment.

EVs from MSCs injected i.v. to hyperammonemic rats reach the hippocampus and restore cognitive function. This improvement of cognitive function is mediated by TGF β in the surface of EVs, which activates TGF β receptors in microglia and neurons. This leads to a shift in the microglia phenotype from a pro-inflammatory to a non-inflammatory form, reducing IL-1 β production in microglia. Moreover, TGF β also reduces nuclear translocation of NF- κ B in neurons by normalizing the Smad7-I κ B α pathway. This also normalizes IL-1 β production in neurons, reducing IL-1 β in hippocampus to normal levels. This normalizes activation of IL-1 receptor and membrane expression of NR2B, GluA1 and GluA2 and, therefore, cognitive function.

We show here that EVs from MSCs reduce neuroinflammation and restore cognitive and motor function in rats with chronic hyperammonemia, a main contributor to MHE and clinical HE. The results reported support the idea that EVs from MSCs would also improve cognitive function in patients with liver cirrhosis and MHE or clinical HE. Currently, no specific treatments are available to reverse the neurological alterations in patients with MHE, that affects more than 5 million people affected in USA (Leevy and Phillips, 2007) and many more millions around the World. Only the use of rifaximin, a non-absorbable antibiotic, has been approved for prevention of appearance of clinical HE episodes (Bass et al., 2010; Mullen et al., 2014; Bajaj et al., 2015). There is therefore a need for safe and efficient treatment of the neurological alterations on patients with MHE. The results presented in this thesis support that the use of EVs from MSCs may cover this need and improve cognitive function in patients with MHE or clinical HE.

CONCLUSIONS

Section A. Extracellular vesicles from plasma of hyperammonemic rats induce neuroinflammation and motor and cognitive deficits when injected to control rats

1. Hyperammonemia increases the amount of extracellular vesicles in plasma of rats and alters the protein cargo of these vesicles, increasing the content of TNF α and of its receptor TNFR1.
2. Extracellular vesicles (EVs) from plasma of hyperammonemic rats reach the cerebellum and the hippocampus following intravenous injection to control rats.
3. EVs from plasma of hyperammonemic rats induce neuroinflammation, with microglia and astrocytes activation in cerebellum and hippocampus of control rats, both *in vivo* and *ex vivo*. They also increase pro-inflammatory factors (TNF α , IL-1 β and IL-6) and reduce anti-inflammatory factors (IL-4, IL-10 and arginase 1) in these brain areas.
4. EVs from plasma of hyperammonemic rats induce motor and cognitive impairment when injected to control rats, eliciting motor incoordination and deficits in short term, object location and object recognition memory.
5. The mechanism leading to motor incoordination would be as follows: the TNF α contained in the vesicles would interact with its receptor TNFR1 in cerebellum, increasing NF- κ B activation, which enhances transcription of glutaminase. This increases glutamate, leading to increased extracellular GABA, which induces motor incoordination.
6. The mechanism leading to cognitive deficits would be as follows: the TNF α contained in the vesicles would interact with its receptor TNFR1 in hippocampus, increasing NF- κ B activation in CA1 neurons and microglia, which enhances IL-1 β production. IL-1 β alters membrane expression of AMPA and NMDA receptors, increasing that of NR2B and GluA2 subunits and reducing that of GluA1 subunit, which would be responsible for the cognitive alterations.
7. Extracellular vesicles from plasma play a key role in the communication between the periphery and the brain in hyperammonemic rats. Plasma EVs contribute to the induction of neuroinflammation and of motor and cognitive deficits in hyperammonemic rats. This knowledge may allow to design new treatments to improve neurological function in hyperammonemia and minimal hepatic encephalopathy.

Section B. Treatment with extracellular vesicles from mesenchymal stem cells reverses neuroinflammation and cognitive and motor impairment in hyperammonemic rats

8. Extracellular vesicles (EVs) from mesenchymal stem cells (MSCs) reach the cerebellum and the hippocampus following intravenous injection to hyperammonemic rats.

9. EVs from MSCs reverse neuroinflammation in cerebellum and hippocampus of hyperammonemic rats, reducing microglia and astrocytes activation, both *in vivo* and *ex vivo*. They also normalize the content of pro-inflammatory factors (TNF α , IL-1 β and IL-6) and anti-inflammatory factors (IL-4, IL-10 and arginase 1) in these brain areas.

10. EVs from mesenchymal stem cells restore motor and cognitive function when injected to hyperammonemic rats, normalizing motor coordination, memory and learning.

11. EVs from mesenchymal stem cells would restore motor coordination in hyperammonemic rats by reducing the content of TNF α and activation of TNFR1 in cerebellum of hyperammonemic rats, thus reducing the activation of NF- κ B and the production of glutaminase. This would reduce the content of glutamate and extracellular GABA in cerebellum to normal levels, thus restoring motor coordination in hyperammonemic rats.

12. The improvement of memory and learning would be mediated by TGF β in the surface of EVs. Hyperammonemic rats show reduced levels of TGF β , TGF β R2, Smad7 and I κ B α ; and an increased phosphorylation of I κ B α in hippocampus. The alteration of this pathway leads to enhanced activation of NF- κ B in neurons and microglia, increasing the production of IL-1 β . The higher levels of IL-1 β alter the membrane expression of NR2B, GluA1 and GluA2 subunits of NMDA and AMPA receptors, leading to memory and learning deficits. EVs from mesenchymal stem cells normalize this pathway, restoring cognitive function in hyperammonemic rats.

13. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells could improve cognitive and motor function in patients with minimal hepatic encephalopathy or clinical hepatic encephalopathy and are a promising therapeutic option to be investigated in patients.

ABREVIATURAS

LISTADO DE ABREVIATURAS

ABC:	Complejo avidina/biotina
ACN:	Acetonitrilo
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADP:	Adenosín difosfato
AGO2:	Proteína argonauta 2
AHR:	Receptor de hidrocarburos de arilos
AMP:	Adenosín monosfosfato
AMPA:	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropiónico
ANOVA:	Análisis de la varianza de una vía
APS:	Persulfato de amonio
ARF:	Factor de ribosilación de ADP
Arg1:	Arginasa 1
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNasa:	Ribonucleasa
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ARRCD1:	Proteína con dominio de arrestina 1
ATP:	5'-trifosfato de adenosina
ATPasa:	Adenosintrifosfatasa
BACE1:	Enzima beta-secretasa 1
BCA:	Ácido bicinconínico
BCIP:	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BCL6:	Proteína 6 del linfoma de células B
BDL:	Ligadura del conducto biliar
BDNF:	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BS3:	Bis(sulfosuccinimidil)suberato 3
BSA:	Albúmina de suero bovino
CA1:	Asta de Amón, capa 1
CaCl₂:	Cloruro de calcio
CAMKII:	Proteína quinasa II dependiente de calmodulina
CCL:	Ligando de quimiocina
CCl₄	Tetracloruro de carbono
CCM:	Medio de cultivo celular
CD:	Cúmulo de diferenciación (del inglés <i>cluster of differentiation</i>)
CEBA:	Comité de Experimentación y Bienestar Animal
COVID-19:	Enfermedad por coronavirus de 2019
COX:	Ciclooxigenasa
CX3CL1:	Fractalquina
CXCL:	Ligando de quimiocina con motivo C-X-C
CXCR:	Receptor de quimiocina con motivo C-X-C
DAB:	Diaminobenzidina
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
DC:	Célula dendrítica
DGKα:	Diacilglicerol quinasa alfa
Dil:	1,1'-Dioctadecil-3,3',3'-Tetrametolindocarbocianina perclorato
DMEM:	Medio esencial mínimo de Dulbecco
DSS:	Dextrano sódico
EAE:	Encefalitis autoinmune
ECM:	Matriz extracelular

EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA:	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético
EH:	Encefalopatía hepática
EHM:	Encefalopatía hepática mínima
EHPVO:	Obstrucción de la vena porta extra-hepática
EPOC:	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERK:	Quinasa regulada por señales extracelulares
ESCRT:	Complejo de clasificación endosomal necesario para el transporte
EVs:	Vesículas extracelulares
FA:	Ácido fórmico
FasL:	Ligando Fas
FBS:	Suero bovino fetal
FC:	del inglés <i>fold change</i>
FDR:	del inglés <i>False Discovery Rate</i>
Foxp3:	del inglés <i>forkhead box p3</i>
GABA:	Ácido gamma-aminobutírico
GABA_A:	Receptor de GABA tipo A
GADPH:	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
Gal-3:	Galectina 3
GAT:	Transportador de GABA
GC:	Guanilato ciclasa
G-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GDP:	Guanosín difosfato
GFAP:	Proteína ácida fibrilar glial
GLAST:	Transportador glutamato aspartato
GLT1:	Transportador glial de glutamato de tipo 1
GluA1:	Subunidad 1 del receptor AMPA
GluA2	Subunidad 2 del receptor AMPA
GluA2/3	Subunidad 2/3 del receptor AMPA
GM:	Medio de crecimiento
GMPC:	Guanosín 3',5' –monofosfato cíclico
GO:	del inglés <i>Gene Ontology</i>
GTP:	Guanosín trifosfato
GTPasa:	Guanosina trifosfatasa de guanosina
H⁺:	Ion de hidrógeno
H₂O:	Agua
H₂O₂:	Peróxido de hidrógeno
HA:	Hiperamonemia
HCl:	Ácido clorhídrico
HIF:	Factor inducido por la hipoxia
HLA-DR:	Antígeno leucocitario humano, isotipo DR
HLA-II	Antígeno leucocitario humano de tipo II
HMGB1:	Proteína de la caja 1 del grupo de alta movilidad
hnRNPA2B1:	Ribonucleoproteína A2B1
HRP:	Peróxidasa de rábano
Hsp:	Proteína de choque térmico
HUVEC:	Células endoteliales de cordón umbilical
Iba1:	del inglés <i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
ICAM-1:	Molécula de adhesión intercelular 1
IFNγ:	Interferón gamma

IGF1R:	Receptor de factor de crecimiento insulínico tipo 1
IgG:	Inmunoglobulina G
IκBα:	Inhibidor del factor NF-kappaB
IKK:	Quinasa del factor IkappaB
IL:	Interleucina
IMP:	Inosina monofosfato
iNOS:	Óxido nítrico sintasa inducible
IRAK:	Quinasa 1 asociada al receptor de interleucina-1
ISCT:	Sociedad Internacional de Terapia Celular
ISEV:	Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares
KCl:	Cloruro de potasio
KEGG:	Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto
KH₂PO₄:	Fosfato monopotásico
Lamp:	Proteína de membrana asociada a lisosomas
LC-MS/MS:	Cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem
LPS:	Lipopolisacárido
MAP:	Proteína quinasa activada por mitógeno
MAP1B:	Proteína asociada a microtúbulos 1b
MCP-1:	Proteína quimiotáctica de monocitos
MFGE8:	Lactadherina
MgCl₂:	Cloruro de magnesio
MHC:	Complejo mayor de histocompatibilidad
miARN/mi-R:	Micro ácido ribonucleico
MIP-1β:	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta
MMP-1:	Metaloproteasa de matriz 1
mNSS:	Escala Modificada de Severidad Neurológica
MSCs:	Células madre mesenquimales
MT1MMP	Metaloproteasa de matriz de membrana de tipo 1
MUC1:	Glicoproteína de transmembrana mucina 1
MVB:	Cuerpo multivesicular
MVs:	Microvesículas
MyD88:	Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
MYLK	Quinasa de cadena ligera de miosina
Na⁺:	Ion sodio
Na₂HPO₄:	Fosfato disódico
NaCl:	Cloruro sódico
NAD(P)⁺:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NAD(P)H:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NaF:	Fluoruro sódico
NAFLD:	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
NaH₂PO₄:	Fosfato sódico
NaHCO₃:	Bicarbonato de sodio
NASH:	Esteatohepatitis no alcohólica
NBT:	Nitroazul de tetrazolio
NeuN:	Proteína nuclear neuronal
NF-κB:	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NH₃:	Amoniacó
NH₄⁺:	Ion amonio
NK:	Células asesinas naturales

NKG2D:	Receptor activador de células NK grupo 2, miembro D
NMDA:	Ácido N-metil-D-aspartato
NO:	Óxido nítrico
NOL/OLM:	Reconocimiento de localización espacial novedosa
NOR/ORM:	Reconocimiento de objeto novedoso
NR1:	Subunidad 1 del receptor NMDA
NR2A:	Subunidad 2A del receptor NMDA
NR2B:	Subunidad 2B del receptor NMDA
Nrf2:	Factor nuclear 2 derivado del eritroide 2
NSF:	N-etilmaleimida
nSMasa2:	Esfingomielinasa neutra de tipo 2
NTA:	Análisis de seguimiento de nanopartículas
OCT:	Medio de temperatura de corte óptima
OH:	Anión hidroxilo
p-:	Proteína fosforilada
P2X:	Purinoreceptor
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAMPs:	Patrones moleculares asociados a patógenos
PB:	Tampón fosfato
PBMCs:	Células mononucleares de sangre periférica
PBS:	Tampón fosfato salino
PCS:	Anastomosis porta-cava
PET:	Tomografía de emisión de positrones
PGE:	Prostaglandina
PHES:	del inglés <i>Psychometric Hepatic Encephalopathy Score</i>
PI(3)I:	Fosfatidilinositol 3-fosfato
Pi:	Fosfato inorgánico
PKCδ	Isoforma delta de la proteína-quinasa C
PKCζ	Isoforma zeta de la proteína-quinasa C
PLP:	Proteolipoproteínas
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PS:	Fosfatidilserina
PSE:	Encefalopatía porto-sistémica
PVDF:	Polifluoruro de vinilideno
RAB:	Proteína de unión asociada a Ras
RANTES:	Quimiocina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T
RVG:	Glicoproteína del virus de la rabia
S1P:	Esfingosina 1-fosfato
S1PR1:	Receptor 1 de la esfingosina 1 fosfato
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SEM:	Error estándar de la media
Ser:	Residuo de serina
SH:	Esteatohepatitis
Smad:	del inglés <i>Suppressor of Mothers against Decapentaplegic</i>
SNARE:	Receptores de proteínas de fijación soluble de NSF
SOD1:	Superóxido dismutasa
SP:	Sobrenadante
STAT3:	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TAB:	Proteína de unión a la quinasa TAK1

TAK1:	Quinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante beta
TAR:	Proteína transactiva
TBS:	Solución salina tamponada con Tris
TCR:	Receptor de células T
TDP-43:	Proteína TAR de unión al ADN 43
TEMED:	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TFA:	Ácido trifluoroacético
Tfh	Linfocitos T foliculares
TGFβ:	Factor de crecimiento transformante beta
TGFβR:	Receptor del factor de crecimiento transformante beta
TGM2:	Glutamina gamma-glutamyltransferasa 2
Th:	Linfocitos T efectoros (del inglés <i>T helper</i>)
Thr:	Residuo de treonina
TIM4:	Inmunoglobulina de células T que contiene dominio de mucina 4
TIMP3:	Inhibidor de metaloproteinasa 3
TLR:	Receptores de tipo toll
TNFR:	Receptor del factor de necrosis tumoral alfa
TNFα:	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF6:	Factor asociado al receptor de TNFalfa
TRAIL:	Ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNFalfa
Treg	Linfocitos T reguladores
Tsg101:	Proteína 101 de susceptibilidad tumoral
Tyr:	Residuo de tirosina
VAMP:	Proteína de membrana asociada a vesículas
VCAM-1:	Molécula de adhesión vascular 1
Vps:	Proteína de clasificación vacuolar
YM1:	Quitinasa

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

1.1 Concepto, tipos y diagnóstico.

La encefalopatía hepática (EH) es un trastorno neuropsiquiátrico complejo derivado de fallo hepático, agudo o crónico, que se manifiesta como un amplio espectro de anomalías neurológicas y/o psiquiátricas, desde alteraciones subclínicas hasta llegar al coma y, eventualmente, la muerte de los pacientes (Felipo, 2013; Vilstrup, 2014). Incluye problemas de atención, déficits cognitivos, una menor coordinación motora y alteraciones en los ritmos circadianos (ciclos de sueño-vigilia) y en la personalidad, asociándose con peor pronóstico y menor supervivencia de los pacientes (Bustamante *et al.*, 1999; Weissenborn *et al.*, 2005a; Felipo, 2013). Existen 3 tipos de EH clínica (Ferenci *et al.*, 2002):

- **EH tipo A:** EH aguda, se produce en casos de fallo hepático fulminante, con necrosis masiva del hígado, y los síntomas progresan rápidamente. Puede ser causada por hepatitis virales agudas, reacción a fármacos o intoxicación por paracetamol. Aunque puede ser reversible, presenta riesgo de causar edema cerebral, lo que aumenta la presión intracraneal y se asocia al elevado grado de mortalidad de este tipo de EH.
- **EH tipo B:** EH crónica, causada por derivación porto-sistémica, en ausencia de enfermedad hepatocelular intrínseca. Entre la población de Japón se han dado muchos casos de este tipo de EH (Watanabe, 2000). Las derivaciones porto-sistémicas pueden ocurrir de forma espontánea, como, por ejemplo, cuando se obstruye la vena porta extra-hepática (EHPVO) siendo una causa común de hipertensión portal en niños (Yachha *et al.*, 1996). En estos pacientes encontramos un menor flujo de sangre en el hígado, un aumento de la concentración de amonio en sangre, mayor ratio glutamina/creatinina y, en ocasiones, anastomosis porta-cava espontánea. Otra causa que también puede originar EH tipo B es la ausencia congénita de vena porta, aunque es poco habitual. En este caso, los pacientes presentan una malformación, debido a la cual las venas mesentéricas drenan su sangre directamente a la circulación sistémica (Grazioli *et al.*, 2000). Esta patología se suele detectar en edades tempranas, debido a que la función hepática está dañada, aunque los niños no presenten síntomas de encefalopatía hepática, que se manifiestan en la edad adulta, junto con el desarrollo del daño hepático y renal (Wojcicki *et al.*, 2004).
- **EH tipo C:** EH crónica, con presencia de cirrosis hepática e hipertensión portal. Esta es la encefalopatía hepática más común. La enfermedad crónica del hígado, la cirrosis, genera derivaciones porto-sistémicas que desvían un volumen considerable de sangre de la vena porta a la circulación sistémica (encefalopatía porto-sistémica, PSE). Existen factores desencadenantes (infección, estreñimiento, alta ingesta de proteínas, hemorragia digestiva) que pueden

conducir a que los pacientes sufran episodios de EH clínica. Estos episodios de EH generalmente se revierten cuando se elimina el factor desencadenante. La derivación de sangre de la vena porta a la circulación sistémica también es un procedimiento utilizado en los hospitales como tratamiento de hemorragias digestivas producidas a causa de la ruptura de várices esófago-gástricas, una complicación severa que suele darse en los pacientes que padecen cirrosis hepática e hipertensión portal.

Según el patrón temporal de manifestación, la encefalopatía hepática clínica puede clasificarse en ocasional, recurrente y persistente (Ferenci *et al.*, 2002). La EH ocasional se caracteriza por uno o varios episodios aislados de alteraciones neuropsiquiátricas causados como consecuencia de un factor desencadenante. Una vez superado el episodio, generalmente que generalmente no se detectan alteraciones en los test psicométricos ni en el electroencefalograma. En el caso de la EH recurrente, los episodios de encefalopatía son múltiples y se intercalan con periodos en los que la función neurológica del paciente no está alterada. Por último, la EH persistente cursa con alteraciones neuropsiquiátricas continuas y evidentes, aunque de duración variable en el tiempo y sin que haya un factor desencadenante definido.

La gravedad de la encefalopatía hepática puede evaluarse mediante los criterios de West-Haven, distinguiéndose 4 grados de EH clínica en función de las manifestaciones neuropsicológicas de los pacientes (Conn, 1979; Weissenborn *et al.*, 2005a): el grado I es el más leve, caracterizado por falta de atención leve e incapacidad para mantenerla, dificultad para realizar operaciones matemáticas sencillas (sumas y sustracciones de pocos números) y alternancia entre estados de euforia y ansiedad; en el grado II se detectan estados de letargo, apatía, desorientación temporal y espacial y cambios evidentes en la personalidad; en el grado III, los pacientes presentan somnolencia, confusión y semiestupor, pero con respuesta a estímulos, presentando una desorientación importante; finalmente, el grado IV corresponde al coma, un estado en el que no hay respuesta a estímulos y en el que no es posible realizar test para evaluar la función mental.

La cuestión de si existe o no deterioro en la memoria en los pacientes con EH es controvertida (Weissenborn *et al.*, 2003). La memoria se evalúa principalmente utilizando test psicométricos centrados en la memoria semántica y la memoria de trabajo (Weissenborn *et al.*, 2005b). El problema estriba en que en muchos test de memoria los resultados dependen en gran medida de la atención y es complejo discernir entre los déficits de memoria y los de atención. No obstante, existen algunos test que permiten distinguir entre estas dos alteraciones. Por ejemplo, el test de retención de dígitos (Tewes, 1991), que evalúa la memoria a corto plazo, en el cual se le pide al sujeto que repita una serie de dígitos tras haberla leído o escuchado, cuantificando el número de dígitos que recuerda correctamente. La lista de palabras de Luria es otro ejemplo de test que evalúa la memoria a corto plazo, en el que se le pide al sujeto que repita todas las palabras que recuerde de una lista de diez palabras tras haberlas escuchado, repitiendo el proceso varias veces (Christensen, 1984). Los pacientes que sufren EH obtienen peores puntuaciones que los sujetos control en estos dos tipos de test (Weissenborn *et al.*, 2005a). En los

pacientes con EH también se han encontrado alteraciones en la memoria a largo plazo, evaluada con el test de memoria de fotografías o dibujos, en el que se le muestran al sujeto varias imágenes duplicadas de forma desordenada y este tiene que recordar dónde estaban las imágenes repetidas para emparejarlas (Weissenborn *et al.*, 2005b).

Los pacientes con EH también presentan alteraciones en el aprendizaje, reflejadas en la dificultad de aprender tareas nuevas. Asimismo, la percepción visuo-espacial es deficiente, lo que se manifiesta en trastornos como la apraxia (trastorno neurológico en el que el individuo pierde la capacidad de realizar movimientos voluntarios, a pesar de tener capacidad física para llevarlos a cabo). Los pacientes cirróticos con EH obtienen peores resultados en pruebas de memoria, inteligencia, aprendizaje y percepción motora y espacial, en comparación con individuos control (Puca *et al.*, 1989). En cambio, la capacidad verbal es normal. No se ha descrito que los resultados obtenidos en estas pruebas dependan de la etiología de la cirrosis (Rehnstrom *et al.*, 1977).

Las alteraciones en la coordinación motora son frecuentes en pacientes con encefalopatía hepática crónica. Algunas de las alteraciones motoras más comunes son:

- **Bradiquinesia:** enlentecimiento o reducción progresiva de la amplitud y la velocidad de los movimientos repetitivos. Uno de los síntomas más tempranos de la encefalopatía hepática es el enlentecimiento psicomotor. Los pacientes con EH presentan debilidad y cansancio al repetir movimientos, dificultad para iniciar el movimiento y un enlentecimiento general al realizar tareas cotidianas. Este tipo de alteraciones dificulta muchas tareas de la vida diaria, como vestirse, comer, lavarse, realizar actividades manuales, etc., de forma que los pacientes requieren mucho más tiempo que antes para ejecutar estas actividades (Spahr *et al.*, 1996; Jones y Weissenborn, 1997).
- **Aquinesia:** menor número de actos motores. La aquinesia altera la expresión facial, el balanceo de los brazos al andar y los movimientos que se realizan al hablar o escribir. (Ferenci *et al.*, 2002).
- **Asterixis:** conocido como “*flapping tremor*” es el temblor más típico en pacientes con EH (Uribe *et al.*, 1980; Jones y Weissenborn, 1997; Timmermann *et al.*, 2002, 2004 y 2005; Paul *et al.*, 2004). Se caracteriza por sacudidas involuntarias y repentinas de uno o varios músculos, provocadas por una contracción muscular repentina que los pacientes no pueden controlar.
- **Rigidez:** es otro síntoma típico en los pacientes que presentan EH (Jones y Weissenborn, 1997; Jover *et al.*, 2003). Los pacientes sufren dificultad para mover las articulaciones debido a una contractura permanente de los músculos, que se va agravando con el tiempo.
- **Alteraciones posturales:** los trastornos en la postura y en la marcha también se han descrito en pacientes con EH (Burkhard *et al.*, 2003; Mechtcheriakov *et al.*, 2005).

Entre un 30 y un 50% de los pacientes con enfermedades hepáticas crónicas (cirrosis, hepatitis) sin síntomas clínicos de encefalopatía detectables en un examen médico rutinario, pueden presentar una variante más leve de la enfermedad denominada

Encefalopatía Hepática Mínima (EHM), que disminuye la capacidad intelectual de los pacientes, produce un enlentecimiento psicomotor y disminuye la coordinación motora y la atención, afectando a su capacidad para realizar tareas rutinarias, elevando su riesgo de padecer (y de provocar) accidentes domésticos, de tráfico y laborales (Córdoba, 2011; Felipo, 2013; Wein *et al.*, 2004). La EHM se corresponde con el primer estadio del espectro de la encefalopatía hepática (Das *et al.*, 2001; Romero-Gómez *et al.*, 2001), disminuye la calidad de vida de los pacientes y de sus familiares, y conlleva menor supervivencia y mayor riesgo de padecer EH clínica (Gröneweg *et al.*, 1998; Slowik *et al.*, 2001).

Las alteraciones en la capacidad de atención, en la capacidad de procesar la información, en la coordinación motora, etc., afectan significativamente la vida diaria de los pacientes (Dhiman y Chawla, 2009). Los pacientes que padecen encefalopatía hepática mínima presentan alteraciones en funciones de la vida diaria como realizar tareas domésticas, trabajar, dormir, el comportamiento emocional o la interacción social (Gröneweg *et al.*, 1998; Prasad *et al.*, 2007). Otra de las capacidades que se ve afectada en la mayoría de los pacientes cirróticos con EHM es la conducción de vehículos, pudiendo resultar en accidentes de tráfico (Schomerus *et al.*, 1981; Bajaj *et al.*, 2009; Felipo *et al.*, 2013).

En consecuencia, evaluar la presencia de EHM en pacientes cirróticos tiene valor pronóstico y podría mejorar la calidad de vida de los pacientes, así como prolongar su supervivencia. Actualmente, la realización de una batería de 5 test psicométricos denominada PHES (*Psychometric Hepatic Encephalopathy Score*) se considera como procedimiento de referencia para la detección de EHM (Ferenci *et al.*, 2002). No obstante, su uso no está extendido en clínica debido al consumo de tiempo que supone y a que los resultados deben ajustarse al nivel de estudios y la edad de los pacientes para ser analizados correctamente.

1.2 Bases fisiopatológicas: sinergia entre hiperamonemia e inflamación periférica en la inducción de neuroinflamación y EH.

La hiperamonemia y la inflamación periférica actúan de forma sinérgica para inducir las alteraciones neurológicas en enfermedades hepáticas crónicas (Shawcross *et al.*, 2007; Montoliu *et al.*, 2015). Tal y como se muestra en la Figura 1, el daño hepático induce tanto hiperamonemia como inflamación periférica, lo que conduce a neuroinflamación, alterando la neurotransmisión y, en última instancia, induciendo el deterioro cognitivo y motor característico de la encefalopatía hepática.

En los siguientes apartados se detalla la contribución de la hiperamonemia, la inflamación periférica y la neuroinflamación a la encefalopatía hepática.

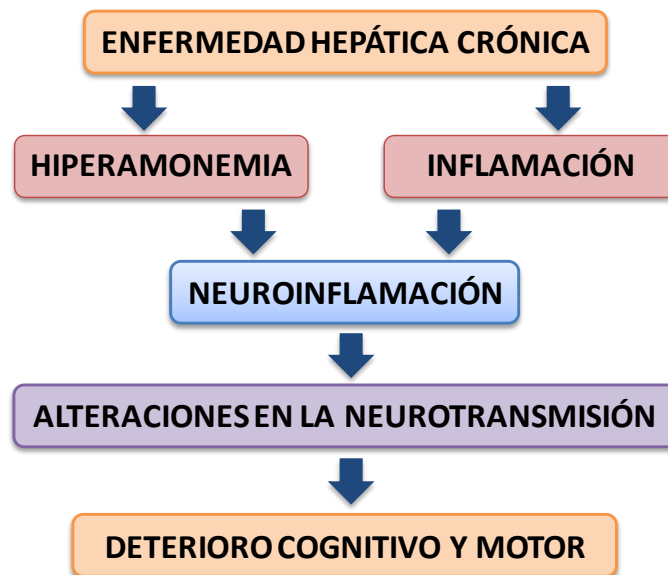


Figura 1. Mecanismos por los que se produce el deterioro cognitivo y motor en enfermedades hepáticas. *Imagen modificada de Montoliu et al. (2015).*

1.2.1 Metabolismo y toxicidad del amonio. Contribución de la hiperamonemia a la encefalopatía hepática.

El amonio se produce a partir del metabolismo del nitrógeno mediante la degradación de nucleótidos, aminoácidos y otros compuestos nitrogenados. Estos procesos metabólicos ocurren en todas las células del organismo. En solución acuosa, hay un equilibrio entre el amoniaco (NH_3) y el ion amonio (NH_4^+). Esta reacción se encuentra desplazada hacia la producción de NH_4^+ en condiciones de pH fisiológico:

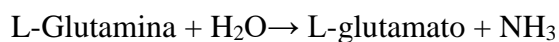


Mientras que el NH_3 es un gas que puede difundirse a través de las membranas celulares libremente, el ion NH_4^+ requiere transportadores para ser importado o exportado a las células. Tanto en hígado como en cerebro existen transportadores que permiten el paso del ion amonio (Amlal y Soleimani, 1997; Ramírez *et al.*, 1999; Marcaggi y Coles, 2001; Weiner, 2004).

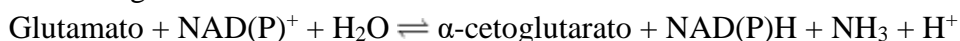
El amonio es necesario para sintetizar compuestos esenciales para el correcto funcionamiento del organismo (por ejemplo, glutamina y glutamato), por lo que es clave en la homeóstasis del nitrógeno. No obstante, cuando se encuentra en concentraciones elevadas en sangre y cerebro, resulta tóxico y causa alteraciones en la función cerebral (Gerok y Häussinger, 1984; Felipe y Butterworth, 2002). Por este motivo, la concentración de amonio en sangre ($50 \mu\text{M}$ en humanos y unos $150 \mu\text{M}$ en rata) y en cerebro está estrictamente controlada en condiciones fisiológicas. Distintas reacciones bioquímicas mantienen un equilibrio la producción y la eliminación de amonio en el organismo.

Las enzimas encargadas de catalizar la formación del amonio en mamíferos son (1) la glutaminasa, (2) la glutamato deshidrogenasa y (3) enzimas del ciclo de los nucleótidos de purina:

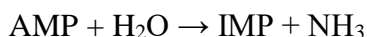
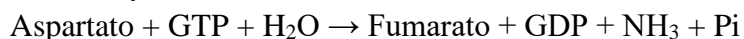
1. Glutaminasa: localizada principalmente en hígado, cerebro, riñón e intestino. En el cerebro, abunda en las terminaciones sinápticas de las neuronas glutamatérgicas y participa en el ciclo glutamato-glutamina (Figura 2), catalizando la siguiente reacción:



2. Glutamato deshidrogenasa: localizada mayormente en hígado y en cerebro. Cataliza la siguiente reacción:



3. Enzimas del ciclo de los nucleótidos de purinas: presentan niveles elevados en músculo y cerebro. Estas enzimas producen una parte relevante del amonio cerebral (Schultz y Lowenstein, 1978):



En los seres humanos, la eliminación del amonio se produce principalmente en el hígado, mediante ciclo de la urea, en el que el amonio se excreta por la orina. En cerebro y músculo, la principal responsable de detoxificar el amonio es la enzima glutamina sintetasa. Esta enzima, que se encuentra en los astrocitos, es fundamental en el sistema nervioso central (Martinez-Hernandez *et al.*, 1977; Norenberg y Martinez-Hernandez, 1979), y forma parte del ciclo glutamato-glutamina entre astrocitos y neuronas. En el cerebro, el ion amonio se incorpora al glutamato para formar glutamina, que se transporta al hígado por el torrente circulatorio. En el hígado, la glutaminasa produce de nuevo glutamato a partir de la glutamina, liberando el ion amonio, que posteriormente se elimina en el ciclo de la urea.

Cuando la función hepática está dañada, la concentración de amonio en sangre y en cerebro se eleva, ya que el hígado no es capaz de detoxificarlo correctamente. La hiperamonemia altera la función cerebral, siendo responsable en gran medida de los déficits cognitivos y motores característicos de la EH.

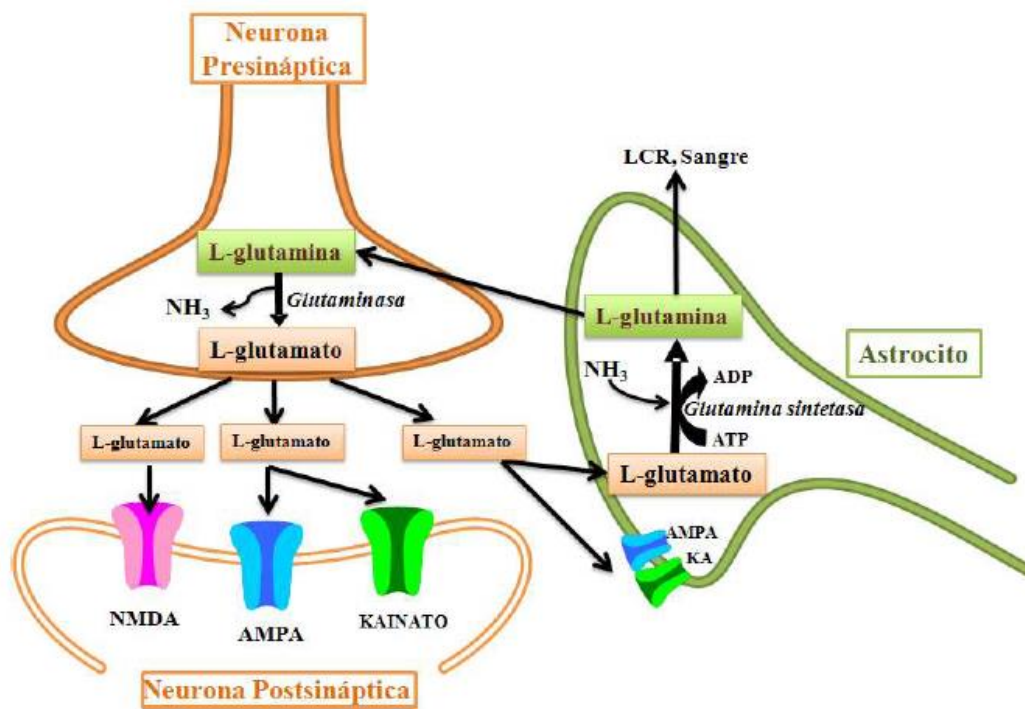


Figura 2. Ciclo glutamato-glutamina en las sinapsis glutamatérgicas del cerebro. El glutamato es liberado a la hendidura sináptica por la neurona presináptica, activando receptores en la neurona post-sináptica. Estos receptores son, principalmente, receptores AMPA, NMDA y kainato). Los astrocitos recaptan el glutamato sobrante que queda en la hendidura sináptica y lo transforman en glutamina mediante la acción de la glutamina-sintetasa, que incorpora amonio al glutamato. La glutamina se libera de nuevo al medio extracelular y vuelve a las neuronas, donde la enzima glutaminasa convierte la glutamina en glutamato, disponible para ser liberado de nuevo por las neuronas. *Imagen extraída de: Cabrera-Pastor (2014).*

La neurotransmisión se ve afectada por el exceso de amonio. Esto se debe, en parte, a que el ion NH_4^+ presenta características parecidas al potasio y puede interferir en la función de canales de iones y enzimas que utilizan potasio, como, por ejemplo, la ATPasa intercambiadora de en neuronas, que regula la despolarización/repolarización de la membrana y, por lo tanto, es fundamental para mantener y regular el potencial de membrana en la transmisión sináptica (Moser, 1987). Se ha descrito que algunos de los efectos perjudiciales causados por altos niveles de amonio en casos de hiperamonemia aguda están causados por alteraciones en la ATPasa Na^+/K^+ (Kosenko *et al.*, 1994).

El aumento de los niveles de amonio también puede afectar al ciclo glutamato-glutamina, que tiene lugar entre astrocitos y neuronas y es necesario para que la neurotransmisión de las neuronas glutamatérgicas funcione correctamente.

Además, la hiperamonemia altera la homeóstasis del GMP cíclico (GMPc), modulando la vía óxido nítrico (NO) – guanilato ciclasa (GC) – GMPc. Se ha sugerido que las alteraciones en esta vía son responsables en parte del deterioro cognitivo y de la aparición de EHM en pacientes cirróticos, ya que la activación de la guanilato ciclasa por óxido

nítrico se ve alterada en el cerebro de pacientes fallecidos con EH (Corbalán *et al.*, 2002) y que normalizar la concentración de GMPc en cerebro en ratas hiperamonémicas restaura su capacidad de aprendizaje (Erceg *et al.*, 2005; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a y 2016b).

La hiperamonemia per se también es capaz de alterar la neurotransmisión y la función cognitiva (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a y 2016b) y de inducir neuroinflamación en modelos animales (Rodrigo *et al.*, 2010). El tratamiento de ratas hiperamonémicas con fármacos que reducen la neuroinflamación es útil para revertir algunos de los déficits neurológicos (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a y 2016b).

La hiperamonemia contribuye significativamente al desarrollo de los déficits neurológicos característicos de la encefalopatía hepática. Algunas de las evidencias obtenidas en clínica y en modelos animales son las siguientes:

- Los desencadenantes de encefalopatía hepática (hemorragia gastrointestinal, ingesta elevada de proteínas...) en pacientes cirróticos son factores que elevan la concentración de amonio.
- Algunos de los tratamientos clínicos que se han mostrado eficaces para revertir o disminuir los déficits cognitivos en pacientes con EH se dirigen a reducir los niveles de amonio.
- Algunos pacientes sin cirrosis, pero con deficiencias congénitas en enzimas que participan en el ciclo de la urea presentan alteraciones compatibles con la encefalopatía hepática, aunque no muestran otras alteraciones relacionadas con el fallo hepático. En estos pacientes, el amonio no se detoxifica correctamente debido a un metabolismo incorrecto, por lo que el exceso de amonio sería el responsable de los déficits cognitivos observados. Además, la gravedad de los síntomas está correlacionada a los niveles de amonio (Msall *et al.*, 1984).
- Otros estudios muestran que las alteraciones neurológicas van en paralelo con los niveles de amonio en sangre de los pacientes cirróticos (Clemmesen *et al.*, 1999).
- El modelo animal de hiperamonemia crónica, en el cual el funcionamiento del hígado no está afectado, reproduce muchas de las alteraciones presentes en fallo hepático a nivel metabólico, neuroquímico y neurológico, presentando alteraciones motoras, menor capacidad de aprendizaje y un ritmo circadiano alterado.

1.2.2 Contribución de la inflamación periférica a la encefalopatía hepática.

Como se ha descrito, la hiperamonemia es uno de los principales factores que contribuyen al desarrollo de la EH crónica. No obstante, la sinergia entre hiperamonemia e inflamación es lo que desencadena las principales alteraciones neuropsiquiátricas.

En distintos estudios se sugiere que la inflamación exagera las alteraciones neuropsicológicas causadas por la hiperamonemia. Shawcross *et al.* (2004) observaron que, al inducir hiperamonemia en pacientes cirróticos, estos obtenían peores resultados en los test neuropsicológicos durante el estado inflamatorio, pero no tras la resolución del

mismo. Felipo *et al.* (2012) evaluaron el deterioro cognitivo mediante la batería PHES en pacientes con diferentes patologías: 1) Cirrosis hepática, con hiperamonemia e inflamación; 2) Enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), con inflamación, pero sin hiperamonemia; 3) Esteatohepatitis no alcohólica (NASH), con inflamación e hiperamonemia leve; 4) Psoriasis, con inflamación, pero sin hiperamonemia; 5) Queloides, con inflamación e hiperamonemia; y 6) Controles sin inflamación ni hiperamonemia. En este estudio se concluyó que el deterioro cognitivo puede aparecer antes de que la enfermedad progrese a cirrosis si los niveles de hiperamonemia e inflamación son lo suficientemente elevados. Además, se vio que la combinación de hiperamonemia e inflamación era suficiente para inducir el deterioro cognitivo, aun en ausencia de daño hepático.

Varios estudios han relacionado la severidad de la EH en pacientes con un aumento en los niveles de diversas citocinas en plasma o suero. Odeh *et al.* (2004) mostraron que los niveles de la citocina proinflamatoria TNF α en suero correlacionaban con la gravedad de la encefalopatía hepática. Montoliu *et al.* (2009) analizaron los niveles de citocinas inflamatorias IL-6 e IL-18 en suero en pacientes cirróticos, observando que correlacionan con la presencia de EHM y con peores resultados en los test psicométricos. No obstante, los mecanismos concretos por los que estos mediadores inflamatorios modulan el deterioro neurológico no están plenamente caracterizados.

En estudios previos del grupo se han caracterizado los cambios en el sistema inmune tanto innato como adaptativo entre pacientes cirróticos con y sin EHM (Mangas-Losada, 2019). Se ha observado que los pacientes con EHM presentan un aumento en los monocitos intermedios CD14⁺⁺CD16⁺, de carácter pro-inflamatorio, así como en los linfocitos T auto-reactivos CD4⁺CD28⁻. Este ambiente pro-inflamatorio se corresponde con un aumento de los niveles séricos de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-21, IL-17, IL-18, TNF α , IL-1 β , IL-15 e IL-22) y de quimiocinas como CCL20, CXCL13 y CX3CL1. También se ha detectado un aumento del marcador de activación temprana CD69 en linfocitos T y B, lo que indica una activación selectiva de estos linfocitos en pacientes con EHM. En el trabajo realizado por Mangas-Losada *et al.* (2019) se observó que los linfocitos T CD4⁺ aislados de pacientes con EHM secretaban mayores cantidades de IL-17, IL-22, IL-21 y TNF α en cultivo y mostraban un aumento en los factores de transcripción AHR y BCL6, característicos de las subpoblaciones Th22 y Tfh de los linfocitos T CD4⁺. Estos datos indican que los pacientes cirróticos pueden sufrir cambios en el sistema inmune, con una expansión de linfocitos Th17, Th22 y Tfh, que se asocian con la aparición de EHM y las alteraciones cognitivas y motoras. Además, los niveles elevados de CCL20, IL-15, CX3CL1 y CXL13 podrían estar contribuyendo a la infiltración de linfocitos T en el cerebro, contribuyendo así a la neuroinflamación.

1.2.3 Neuroinflamación en encefalopatía hepática.

La neuroinflamación es capaz de alterar la función cerebral en una amplia variedad de patologías. Actualmente, se considera que la neuroinflamación es responsable, al menos en gran medida, de las alteraciones neuropsicológicas y los déficits cognitivos asociados a numerosas enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson), mentales

(esquizofrenia) y crónicas (cirrosis, diabetes), así como de alteraciones cognitivas asociadas al envejecimiento y al post-operatorio (Bilbo *et al.*, 2012; Cherniack, 2012; Boyer *et al.*, 2013; Hovens *et al.*, 2014; Takeda *et al.*, 2014; Tenorio-Laranga *et al.*, 2015).

Algunos estudios han analizado la presencia de neuroinflamación en pacientes con EH y con cirrosis. Dennis *et al.* (2014) analizaron tejido cerebral post-mortem de pacientes alcohólicos con cirrosis con y sin EH clínica. Aproximadamente la mitad de los pacientes con EH clínica presentaban activación de microglía. Los autores del estudio propusieron que la activación de la microglía formaría parte de una respuesta temprana neuroprotectora que finalmente no es capaz de detener el curso de la enfermedad debido a la persistencia de factores como los elevados niveles de amonio en el cerebro y la inflamación periférica. Zemtsova *et al.* (2011) también detectaron un aumento del marcador de activación de la microglía Iba1 en el córtex cerebral de pacientes con EH clínica respecto a pacientes sin EH.

Cagnin *et al.* (2006) propusieron que un mecanismo por el cual la encefalopatía hepática conduce a pérdida de función cerebral es la alteración en la síntesis de neuroesteroides en las células de la glía activadas. Para demostrarlo, analizaron el ligando del receptor periférico de los benzodiazepinas, responsable de regular la síntesis mitocondrial de neuroesteroides, mediante tomografía de emisión de positrones (PET) en pacientes con EHM. Los resultados del estudio muestran que los pacientes con encefalopatía hepática presentaban una mayor expresión del receptor periférico de benzodiazepinas en células gliales del cerebro, siendo esto una prueba adicional de la activación glial en el cerebro de los pacientes.

Estudios previos de nuestro grupo han mostrado que el deterioro neurológico puede aparecer en los pacientes con daño hepático antes de llegar al estado de cirrosis. Felipe *et al.* (2012) observaron que 5 de 11 pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (NASH) mostraban déficits cognitivos asociados a elevados niveles de hiperamonemia e inflamación, aun en ausencia de cirrosis. A raíz de este estudio, se evaluó si los pacientes con distintos grados de esteatohepatitis (SH1, SH2, y SH3, por orden de menor a mayor gravedad) podían presentar neuroinflamación. Los hallazgos de estos estudios, reportados por Balzano *et al.* (2018a y 2018b), muestran que los pacientes con esteatohepatitis de menor grado ya presentan una infiltración de linfocitos T (especialmente de Th17, Tfh y linfocitos autoreactivos CD4⁺CD28⁻) en las meninges del cerebelo, asociada a activación de microglía y astrocitos. Esta infiltración contribuye a la degeneración de las neuronas de Purkinje y de las neuronas granulares.

Estos hallazgos evidencian que la neuroinflamación es un factor esencial para el desarrollo del deterioro cognitivo y motor en encefalopatía hepática.

1.3 Modelos animales de encefalopatía hepática.

Es necesario emplear modelos animales para poder analizar en detalle los mecanismos que causan la encefalopatía hepática, así como para diseñar y ensayar posibles opciones

terapéuticas. Los modelos animales de EH presentan hiperamonemia y neuroinflamación y han demostrado su validez experimental, ya que reproducen muchas de las alteraciones cognitivas y motoras encontradas en pacientes. Los modelos más utilizados hasta el momento han sido los siguientes:

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

Para generar este modelo, se realiza una cirugía en la que se ensamblan la vena porta y la vena cava. La vena porta es la que proporciona sangre al hígado, de modo que, al interrumpir su flujo normal y derivarlo a la vena cava, se evita que la sangre del intestino circule a través del hígado, reduciendo la metabolización de sustancias tóxicas en el mismo. Una de estas sustancias es el amonio, cuyos niveles en sangre aumentan en las ratas con anastomosis porta-cava.

Las ratas PCS no solo muestran hiperamonemia, sino también otros cambios metabólicos, como por ejemplo una menor utilización de la glucosa y un aumento de amonio en cerebro. Además, se ha demostrado que presentan neuroinflamación, con un aumento de la actividad de la enzima COX y de los niveles de marcadores de inflamación como la IL-6 en cerebro (Cauli *et al.*, 2007).

Además, en múltiples estudios se ha observado que reproducen las alteraciones en la función cerebral mostradas por los pacientes con EH: alteraciones en ritmos circadianos (Bengtsson *et al.*, 1986; Steindl *et al.*, 1996) y en el sueño (Hernandez-Viadel *et al.*, 2003), déficits motores como hipoquinesia (Cauli *et al.*, 2009) e incoordinación motora (Dadsetan *et al.*, 2016a; Agustí *et al.*, 2017) y alteraciones cognitivas como disminución del aprendizaje y la memoria (Elizondo *et al.*, 2007; Rodrigo y Felipe, 2007; Méndez *et al.*, 2008; Hernández-Rabaza *et al.*, 2015; Dadsetan *et al.*, 2016b).

Erceg *et al.*, (2005b) observaron que las ratas PCS presentaban una alteración en la función de la vía glutamato - óxido nítrico (NO) - GMP cíclico en cerebelo, que reducía la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y. Cauli *et al.* (2007) demostraron también que la función de glutamato – NO – GMPc en cerebelo se restauraba *in vivo* tratando a las ratas PCS con el antiinflamatorio ibuprofeno. En las ratas tratadas con ibuprofeno, se reducía la inflamación y se mejoraban los resultados en el laberinto en Y. Estos resultados mostraron que la neuroinflamación es uno de los factores principales que desencadena el deterioro cognitivo en encefalopatía hepática. Estudios más recientes han demostrado que las alteraciones en el aprendizaje y la memoria espacial pueden restaurarse en ratas PCS mediante tratamientos que revierten la neuroinflamación, como el sildenafil y el sulforafano (Hernández-Rabaza *et al.*, 2015, 2016a y 2016b) o la inflamación periférica con anti-TNF α (Dadsetan *et al.*, 2016b).

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

Este modelo de fallo hepático también se genera mediante cirugía, realizando una o varias ligaduras en el conducto biliar, de manera que se interrumpe el flujo de bilis al intestino. Algunas de las alteraciones más relevantes encontradas en ratas BDL son las siguientes: hipertensión portal e ictericia (Kountouras *et al.*, 1984), fibrosis que acaba derivando en

cirrosis, translocación bacteriana y alteraciones en el sistema inmune (Roughneen *et al.*, 1986; Greve *et al.*, 1990; Aronson *et al.*, 1993; Jover *et al.*, 2006), alteraciones cognitivas y motoras (De Flora *et al.*, 1996; Marchi y Raiteri, 1996) e hiperamonemia (Rodrigo *et al.*, 2005).

Al igual que en las ratas PCS, se ha demostrado que en las ratas con ligadura biliar presentan neuroinflamación y que esta contribuye de forma esencial a los déficits cognitivos y motores. Las ratas BDL muestran deterioro cognitivo e hipoquinesia, que se asocia con un aumento de los niveles de factores inflamatorios (IL-1 β , óxido nítrico sintasa inducible, prostaglandina E2) y con activación de la microglía, especialmente en el cerebelo (Rodrigo *et al.*, 2010). En el estudio de Rodrigo *et al.* (2010) también se administró un tratamiento crónico con ibuprofeno y, de forma similar a lo observado en las ratas PCS, se vio que el ibuprofeno restauraba las funciones cognitivas y motoras en las ratas BDL, reduciendo los niveles de marcadores inflamatorios y la activación de microglía.

- **Modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático (HA)**

La hiperamonemia es uno de los principales factores que contribuyen al deterioro cognitivo y a las alteraciones motoras en EH crónica, tal y como se ha explicado anteriormente. A finales de los años 80, nuestro grupo desarrolló un modelo de hiperamonemia crónica “pura”, sin fallo hepático, con el objetivo de discernir qué alteraciones se deben a la hiperamonemia y qué alteraciones son debidas al fallo hepático en sí (Felipo *et al.*, 1988b; Azorín *et al.*, 1989).

El modelo se genera administrando a las ratas una dieta rica en acetato amónico (30 %), de manera que se induce una hiperamonemia crónica moderada parecida a la que presentan los pacientes cirróticos. Los niveles de amonio en sangre en las ratas hiperamonémicas con aproximadamente el doble que en las ratas control.

El modelo de hiperamonemia sin fallo hepático es el que se ha utilizado en la presente tesis doctoral. Las razones principales para la elección del modelo han sido las siguientes:

- Es un modelo sencillo que no requiere de cirugía para establecerlo. Esta ventaja no solo es práctica a nivel experimental, sino que también evita que se produzcan alteraciones debidas a la propia cirugía. Por ejemplo, aunque los modelos PCS y BDL han demostrado ampliamente su validez como modelos de EH y los resultados se comparan siempre con ratas control en las que se realiza una operación quirúrgica simulada, hay que tener en cuenta que una cirugía conlleva cierto grado de inflamación, riesgo de infección, etc., que pueden interferir en las alteraciones observadas.
- Permite mantener el estado de hiperamonemia sin alterar la función hepática durante periodos prolongados.
- Reproduce gran parte de las alteraciones presentes en pacientes con encefalopatía hepática.

- Es útil para discernir qué alteraciones cerebrales y neurológicas son causadas directamente por la hiperamonemia y cuáles se deben a otros factores asociados al fallo hepático.

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

Las alteraciones cognitivas y motoras en las ratas hiperamonémicas son similares a las que presentan los modelos quirúrgicos de EH (ratas PCS y BDL). Este modelo se ha utilizado para estudiar el efecto de la hiperamonemia crónica sobre la función cognitiva (Aguilar *et al.*, 2000; Rodrigo *et al.*, 2010; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a y 2016b) y motora (Rodrigo *et al.*, 2010; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016b). El modelo de hiperamonemia también se ha empleado para investigar los mecanismos que conducen a 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, como el sildenafil y el GMPc, para revertir el deterioro cognitivo y motor (Erceg *et al.*, 2005a y 2005b).

En cuanto a la presencia de neuroinflamación, Rodrigo *et al.* (2010) demostraron por primera vez que la hiperamonemia *per se* es capaz de inducir neuroinflamación, aún en ausencia de fallo hepático. Las ratas hiperamonémicas tratadas con fármacos que reducen la neuroinflamación, como el ibuprofeno o el sulforafano, recuperan su función cognitiva y motora (Rodrigo *et al.*, 2010; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a y 2016b).

1.4 Mecanismos por los que la hiperamonemia crónica induce deterioro cognitivo y motor.

Los estudios realizados por nuestro grupo en modelos animales se han centrado en entender los mecanismos por los que: 1) la hiperamonemia crónica y la inflamación periférica inducen neuroinflamación, 2) la neuroinflamación altera la neurotransmisión y 3) las alteraciones en la neurotransmisión conducen al deterioro cognitivo y motor.

A continuación, se recogen los principales resultados que se han obtenido en estos estudios del grupo en el modelo de hiperamonemia crónica (modelo de elección para la realización de esta tesis), centrados en dos áreas cerebrales responsables de la regulación de diferentes funciones cognitivas y motoras: el hipocampo y el cerebelo.

1.4.1 Hipocampo.

El hipocampo es esencial en procesos de aprendizaje espacial y memoria, regulados principalmente por los receptores de glutamato AMPA y NMDA y por la neurotransmisión glutamatérgica.

Cabrera-Pastor *et al.* (2016c) mostraron que las ratas con 6 semanas de hiperamonemia crónica presentaban neuroinflamación en el hipocampo, con activación glial, un aumento

de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF α y una reducción de las citocinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10. En cuanto a las alteraciones en la neurotransmisión en hipocampo, se observó un aumento de la expresión en membrana de las subunidades NR1 y NR2A de los receptores NMDA y de la subunidad GluA1 de los receptores AMPA, así como una reducción de la expresión en membrana de la subunidad GluA2 de los receptores AMPA. Estas alteraciones se asociaron con deterioro en la memoria espacial de referencia y la memoria de trabajo.

Hernández-Rabaza *et al.* (2016a) reportaron resultados similares en ratas con 8 semanas de hiperamonemia: las ratas presentaban neuroinflamación en hipocampo, con activación glial y un contenido aumentado en las citocinas pro-inflamatorias IL6 e IL-1 β . La expresión en membrana de las subunidades NR1 y NR2A de los receptores NMDA y de la subunidad GluA1 de los receptores AMPA se encontraba aumentada, mientras que de la expresión en membrana de la subunidad GluA2 de los receptores AMPA se encontraba disminuida. También se describieron cambios en los receptores GABA, con un aumento de la expresión en membrana de la subunidad α 1 y una reducción de la subunidad α 5. Estas alteraciones se asociaron con déficits en la memoria espacial y en el aprendizaje, evaluados en el laberinto radial de 8 brazos.

En un estudio realizado por Taoro-González *et al.* (2018), se identificaron los mecanismos que conducen a las alteraciones en la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA en hipocampo en ratas con hiperamonemia crónica. La hiperamonemia aumenta los niveles de IL-1 β , promoviendo la activación de su receptor, que conduce a la activación de la protein-quinasa Src, la cual fosforila la subunidad NR2B de los receptores NMDA en el residuo Tyr14721, aumentando la expresión en membrana de esta subunidad y promoviendo una mayor entrada de calcio al interior de la célula. El calcio activa a su vez la MAP quinasa p38, que se une a la PKC ζ , reduciendo su fosforilación en la Thr560 y su actividad. La menor actividad de la PKC ζ resulta en una menor fosforilación de la subunidad GluA2 en la Ser880, lo que promueve una mayor expresión en membrana de GluA2. Por otra parte, el aumento de la actividad de Src en el hipocampo conduce a la activación de la PKC δ , aumentando la fosforilación de la subunidad NR2B en la Ser1303 y reduciendo la expresión en membrana de la CaMKII, con lo que se disminuye la fosforilación de la subunidad GluA1 en la Ser831 y su expresión en membrana.

Existen otros factores que pueden modular la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA. El TNF α promueve de forma selectiva la expresión en membrana de la subunidad GluA1 en neuronas del hipocampo (Stellwagen *et al.*, 2005). Ferguson *et al.* (2008) observaron que la nano-inyección *in vivo* de TNF α en ratas aumentaba la expresión sináptica de GluA1, mientras que reducía la de GluA2. Estos estudios sugieren que la neuroinflamación puede afectar de formas diferentes la expresión en membrana de las subunidades de receptores AMPA y NMDA dependiendo de la prevalencia de distintos factores pro-inflamatorios como IL-1 β y TNF α .

1.4.2 Cerebelo.

El cerebelo modula la coordinación motora y ciertos tipos de aprendizaje, principalmente a través del GABA extracelular y la neurotransmisión GABAérgica.

Cauli *et al.* (2009) mostraron que la hiperamonemia aumenta la concentración de GABA extracelular en cerebelo, activando los receptores GABA_A *in vivo* y reduciendo la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc. La función reducida de esta vía es responsable de un descenso en los niveles de GMPc extracelular y de déficits en el aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y. El aprendizaje de esta tarea se restaura aumentando los niveles de GMPc extracelular (Erceg *et al.*, 2005b; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a y 2018).

Hernández-Rabaza *et al.* (2016b) mostraron que la hiperamonemia inducía la activación de astrocitos y microglía en el cerebelo y un aumento de la expresión en membrana de GAT3, uno de los transportadores principales de GABA, en los astrocitos activados. La función de GAT3 en los astrocitos activados se encuentra revertida, favoreciendo la salida de GABA intracelular hacia el fluido extracelular, por lo que este mecanismo se asoció con un aumento del GABA extracelular en el cerebelo, lo que conducía a déficits en la coordinación motora y en el aprendizaje en el laberinto en Y.

Cabrera-Pastor *et al.* (2018) describieron la siguiente vía: en ratas hiperamonémicas, los niveles de TNF α se encuentran aumentados en cerebelo, así como la expresión en membrana de su receptor TNFR1. La interacción del TNF α con su receptor aumenta la traslocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo, activando la transcripción de genes pro-inflamatorios como *IL-1 β* y *TNF α* . La activación de NF- κ B también se asocia a una mayor expresión de glutaminasa, enzima responsable de la producción de glutamato a partir de glutamina, aumentando los niveles de glutamato extracelular. Este aumento de glutamato extracelular se traduce en una mayor captación de glutamato extracelular y de sodio por los astrocitos activados, a través de los transportadores de glutamato GLT1 y GLAST. El aumento de sodio intracelular en los astrocitos conduce a la reversión de la función del transportador GAT3. Como se ha mencionado anteriormente, al revertirse la función de GAT3, aumenta la concentración de GABA extracelular en el cerebelo, causando incoordinación motora.

El GMPc también es un compuesto esencial en la modulación de la neurotransmisión en cerebelo y las alteraciones cognitivas y motoras asociadas. Cabrera-Pastor *et al.* (2016b) investigaron los mecanismos por los que el GMPc extracelular modula la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y: en condiciones fisiológicas, el GMPc extracelular reduce la activación de los receptores de glicina (Bukanova *et al.*, 2014), dando lugar a un aumento leve del calcio intracelular en las neuronas de Purkinje, que modula la fosforilación de la calcio calmodulina quinasa II (CaMKII) de una manera bifásica. En hiperamonemia, donde los niveles de GMPc extracelular y las concentraciones basales de calcio se encuentran reducidos, aumentar el GMPc extracelular redujo la fosforilación de la CaMKII y aumentó la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa, dando lugar a una mayor producción de óxido nítrico, que activa la guanilato ciclasa soluble, aumentando

la formación de GMPc y su liberación al medio extracelular. El aumento de la función de la vía y los niveles de GMPc extracelular se asoció a una mejoría en la capacidad de aprendizaje en las ratas con hiperamonemia. Sin embargo, aumentar el GMPc extracelular en ratas control, en las que los niveles basales se encuentran dentro del rango óptimo, produjo el efecto contrario, aumentando la actividad de la CAMKII y la fosforilación de la enzima óxido nítrico sintasa, la cual reduce su actividad y, con ello, la formación de óxido nítrico y GMPc, reduciendo el aprendizaje (Cabrera-Pastor, 2016b).

1.5 Opciones terapéuticas actuales para el tratamiento de la EHM y tratamientos potenciales estudiados en modelos animales.

1.5.1 Opciones terapéuticas en clínica.

Los tratamientos disponibles en clínica para la EH o la EHM son escasos y es necesario seguir investigando para identificar y validar nuevos tratamientos. Se han centrado principalmente en reducir los niveles de amonio en sangre o en corregir factores precipitantes de la EH (hemorragia gastrointestinal, desequilibrio electrolítico y estreñimiento) (Ferenci *et al.*, 2002).

- **Disacáridos no absorbibles.** De entre ellos destaca la lactulosa, cuya efectividad se ha demostrado en pacientes cirróticos con EHM, mejorando las funciones cognitivas y la calidad de vida (Prasad *et al.*, 2007), aunque en otros estudios se ha observado que no tiene efecto sobre la supervivencia (Als-Nielsen *et al.*, 2004). La lactulosa se metaboliza en ácido láctico y ácido acético, acidificando el tracto gastrointestinal e inhibiendo así la producción de amonio por parte de bacterias coliformes. Por otra parte, al acidificar el lumen intestinal, promueve la conversión de NH_3 a NH_4^+ , reduciendo notablemente su transporte al flujo sanguíneo. Sus principales inconvenientes son el ajuste de la dosis, vía de administración y efectos secundarios adversos como diarrea o náuseas (Schiano *et al.*, 2010).
- **Antibióticos.** Los antibióticos más destacados que se han utilizado en EH son neomicina, metronidazol, vancomicina y rifaximina. Todos ellos son efectivos para el tratamiento crónico o agudo de EH (Poh y Chang, 2012), sin embargo, debido al limitado número de estudios, a efectos adversos (neomicina, nefrotoxicidad; metronidazol, neurotoxicidad) y a la aparición de resistencia (vancomicina) se ha limitado el uso de la mayoría de ellos, con excepción de la rifaximina, que presenta la mayor base de evidencia de su utilidad terapéutica.

La rifaximina es un antibiótico semisintético derivado de la rifampicina, de administración oral y no sistémico, ya que su absorción en el intestino es escasa. Posee un amplio espectro antibacteriano, afectando a bacterias gram positivas y gram negativas, tanto aerobias como anaerobias. Entre sus ventajas frente a otros antibióticos destacan que es bien tolerado en la mayoría de los pacientes, incluyendo niños (Scarpignato y Pelosini, 2006) y que no contribuye a la aparición de resistencias bacterianas clínicamente relevantes (Schiano *et al.*, 2010). En 2008 se publicó un metaanálisis sobre la efectividad y la seguridad de la rifaximina como tratamiento para la EH, en comparación con los

disacáridos no absorbibles, incluyendo artículos disponibles en las bases de datos MEDLINE (1966-2007), *Cochrane Database of Systematic Reviews* (1995-2007) y *Cochrane Hepato-Biliary Group Reviews* (2003-2007). Los resultados mostraron que la rifaximina presentaba una eficacia igual o superior a la lactulosa en cuanto a la disminución de los signos y síntomas de la encefalopatía hepática tanto leve como clínica, mejorando las funciones cognitivas. Además, la terapia con el antibiótico se asoció a menor número de hospitalizaciones, menor duración de las mismas y, por tanto, una reducción en los costes hospitalarios. En esta revisión se indicaba la necesidad de nuevos estudios con un diseño experimental más robusto para establecer claramente la eficacia de la rifaximina y otros fármacos como tratamiento de la EHM (Lawrence y Klee, 2008). En cuanto al mecanismo de acción, la rifaximina actúa inhibiendo la síntesis del ARN bacteriano, impidiendo la proliferación microbiana. No obstante, los mecanismos por los cuales es eficaz para el tratamiento de la encefalopatía hepática se encuentran en estudio. Se ha propuesto que podría tener un impacto sobre la composición y la función de la microbiota intestinal, la cual presenta alteraciones en pacientes cirróticos, si bien las diferencias se encuentran poco caracterizadas por el momento (Bajaj *et al.*, 2013, Kawaguchi *et al.*, 2019). Bajaj *et al.* (2013) proponen que la rifaximina no afecta el patrón de la microbiota, pero sí su metabolismo en pacientes con EHM. Otra hipótesis planteada por este estudio sugiere que la rifaximina podría restaurar los niveles y composición de ácidos biliares en el intestino, los cuales se han visto alterados en la encefalopatía hepática de un modo que favorece la proliferación de especies bacterianas patógenas y proinflamatorias (Bajaj *et al.*, 2013).

1.5.2 Tratamientos potenciales investigados en modelos animales.

En base a los mecanismos subyacentes a los déficits cognitivos y motores asociados a la EH, existen diversos tratamientos que se han identificado o se encuentran en investigación en modelos animales. Según su objetivo, podríamos dividirlos en tratamientos destinados a reducir o prevenir la inflamación periférica y la neuroinflamación, tratamientos destinados a aumentar el GMPc extracelular y tratamientos destinados a restaurar el tono GABAérgico.

- **Tratamientos dirigidos a reducir o prevenir la inflamación periférica y la neuroinflamación.**

Rodrigo *et al.* (2010) mostraron que el tratamiento de ratas hiperamonémicas con el anti-inflamatorio ibuprofeno en ratas hiperamonémicas era capaz de revertir la activación de microglía y los niveles de IL-1 β y PGE2 en cerebelo, restaurando la capacidad de aprendizaje y la coordinación motora.

Agustí *et al.* (2011) identificaron la MAP quinasa p38 como una nueva diana terapéutica para tratar la encefalopatía hepática en ratas con anastomosis porta-cava. Los resultados del estudio mostraron que la actividad de la MAP quinasa p38 estaba aumentada en el cerebro de las ratas PCS, y que el tratamiento con el inhibidor de la p38 SB239063 era capaz de reducir la activación de microglía, así como los niveles de marcadores inflamatorios en el cerebro (prostaglandina E2, actividad ciclooxigenasa, iNOS, IL-1 β y

TNF α) y en la sangre (prostaglandina E2 y TNF α). El tratamiento con el inhibidor restauró la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y, así como la coordinación motora, evaluada mediante el Rotarod, en ratas PCS (Agustí *et al.*, 2011). Además, el tratamiento no afectó a los niveles de creatinina y sodio en suero, indicando que no inducía daño renal, que es una de las principales contra-indicaciones para el empleo de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, como el ibuprofeno, para el tratamiento en clínica de la encefalopatía hepática (Agustí *et al.*, 2011).

Hernández-Rabaza *et al.* (2016a) estudiaron el papel del sulforafano en la reversión de la neuroinflamación en hipocampo y de los déficits cognitivos asociados en ratas con hiperamonemia crónica. En este estudio se vio que el sulforafano, que induce los sistemas anti-inflamatorios endógenos mediante la activación del factor Nrf2, disociándolo de la proteína Keap1 y favoreciendo su traslocación al núcleo, es capaz de promover la diferenciación de la microglía de un estado pro-inflamatorio a un estado anti-inflamatorio en hipocampo, reduciendo los niveles de IL-1 β e IL-6 y la activación de astrocitos. El tratamiento también normalizó la expresión en membrana de la mayoría de las subunidades de receptores AMPA, NMDA y GABA estudiadas y restauró el aprendizaje espacial. Posteriormente se observaron resultados similares en cerebelo (Hernández-Rabaza, 2016b): el tratamiento con sulforafano en ratas hiperamonémicas redujo los niveles de IL-1 β (pro-inflamatoria), mientras que aumentó la IL-4 y la IL-10 (anti-inflamatorias), así como los marcadores de microglía anti-inflamatoria YM1 y Arg1. También revirtió la activación de astrocitos, normalizando la función de GAT3 y los niveles extracelulares de GABA. Esto se tradujo en una normalización de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc y una mejora en la coordinación motora y el aprendizaje en el laberinto en Y.

Dadsetan *et al.* (2016a y 2016b) evaluaron el efecto del tratamiento con infliximab, un fármaco anti-TNF α que se utiliza en la práctica clínica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide. En este caso, el modelo de EH utilizado fueron ratas PCS. Las ratas PCS presentaban inflamación periférica, con niveles aumentados de prostaglandina E2, IL-17 e IL-6 en suero y niveles reducidos de IL-10. Las ratas PCS presentaban neuroinflamación, con activación de microglía y astrocitos en hipocampo y cerebelo, así como niveles aumentados de IL-1 β y TNF α en ambas áreas cerebrales. En hipocampo se encontraron alteraciones en la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA, lo que se asociaba con déficits en el aprendizaje espacial y la memoria. En cerebelo se encontró un aumento de la expresión en membrana de GAT3 y del nivel de GABA extracelular, lo que causaba incoordinación motora y déficits en la capacidad de aprendizaje. El tratamiento con infliximab era capaz de reducir los parámetros descritos en cuanto a inflamación periférica, neuroinflamación y alteraciones en la neurotransmisión, restaurando la función cognitiva y motora.

En esta tesis se ha evaluado el potencial terapéutico de la administración de vesículas extracelulares procedentes de células madre mesenquimales, con propiedades anti-inflamatorias, en ratas con hiperamonemia crónica. En el apartado *Potencial terapéutico de las vesículas extracelulares: EVs derivadas de células madre mesenquimales* de la

Introducción se profundiza en las características y las investigaciones previas realizadas con este tipo de vesículas.

▪ **Tratamientos dirigidos a incrementar el GMPc extracelular.**

Cabrera-Pastor *et al.* (2016c) mostraron que la administración crónica de GMPc intracerebral mediante mini-bombas osmóticas normalizaba algunas de las alteraciones encontradas en el hipocampo de ratas con hiperamonemia crónica, revirtiendo la activación de microglía y astrocitos, normalizando los niveles de TNF α e IL-4 y la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA y restaurando la memoria de referencia espacial.

Posteriormente, se comprobó que la administración crónica de GMPc intracerebral mediante mini-bombas osmóticas en ratas hiperamonémicas también reducía la neuroinflamación en cerebelo, normalizando los siguientes parámetros: activación de microglía y astrocitos, activación de NF- κ B, expresión en membrana de TNFR1 y del transportador de GABA GAT3, expresión de glutaminasa y niveles de glutamato y de GABA extracelular. A nivel funcional, la administración de GMPc intracerebral mejoró la coordinación motora (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018).

Algunas de las opciones terapéuticas que se han investigado en modelos animales incluyen moduladores farmacológicos de los niveles de GMPc, como el sildenafil, que inhibe a la fosfodiesterasa 5, responsable de la degradación del GMPc intracelular. Hernández-Rabaza *et al.* (2015) mostraron que la administración de sildenafil en ratas con anastomosis porta-cava (PCS) era capaz de reducir los niveles de IL-1 β y TNF α en hipocampo, y de normalizar la expresión en membrana de los receptores GABA $_A$ (subunidad α 1), AMPA (subunidades GluR1 y GluR2) y NMDA (subunidades NR1 y NR2A), restaurando el aprendizaje espacial. Posteriormente, Agustí *et al.* (2017) estudiaron los efectos en cerebelo: las ratas PCS mostraban activación de microglía y astrocitos, niveles aumentados de IL-1 β y TNF α , un aumento de la expresión en membrana del transportador de GABA GAT3, una reducción de la expresión en membrana del transportador de GABA GAT1, niveles disminuidos de GMPc extracelular e incoordinación motora. El tratamiento con sildenafil revirtió la activación de microglía y astrocitos, los cambios en la expresión en membrana de los transportadores de GABA y restauró la coordinación motora (Agustí *et al.*, 2017).

▪ **Tratamientos dirigidos a restaurar el tono GABAérgico.**

Como se ha comentado anteriormente, en hiperamonemia se produce un aumento del tono GABAérgico (activación de los receptores de GABA) en cerebelo, que a su vez modula la vía glutamato – óxido nítrico – GMPc, disminuyendo los niveles de GMPc extracelular y contribuyendo al deterioro cognitivo y motor.

Bloqueando los receptores de GABA $_A$ in vivo mediante administración crónica de bicuculina se reduce el tono GABAérgico en el cerebelo de ratas con hiperamonemia crónica, restaurando la función de la vía glutamato – óxido nítrico – GMPc y la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y (Cauli *et al.*, 2009). González-Usano *et al.* (2014)

obtuvieron resultados similares reduciendo el tono GABAérgico mediante la administración crónica de pregnenolona sulfato, un neuroesteroide que reduce la activación de los receptores GABA_A.

Malaguarnera *et al.* (2019) evaluaron los efectos del tratamiento con bicuculina en ratas hiperamonémicas, centrándose en el hipocampo. En este estudio se vio que el tratamiento reducía la activación de astrocitos y los niveles de IL-1 β en hipocampo, pero no la activación de microglía; normalizaba la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA y la subunidad NR2B (pero no NR1 ni NR2A) de los receptores NMDA, mejoraba el aprendizaje espacial y la memoria de trabajo y reducía los niveles de ansiedad.

2. VESÍCULAS EXTRACELULARES

El estudio de las vesículas extracelulares ha adquirido una gran relevancia en los últimos años debido a que juegan un papel esencial en la comunicación intercelular y cada vez existen más estudios que confirman su papel en diferentes patologías. Están implicadas en procesos inflamatorios y en la respuesta inmune, pudiendo mediar los procesos por los que la inflamación periférica induce neuroinflamación. Estos datos sugieren que las vesículas extracelulares podrían estar contribuyendo a la patogénesis de la encefalopatía hepática y que su estudio en esta patología es relevante para la mejor comprensión de los mecanismos subyacentes y la identificación de nuevas dianas terapéuticas. Por ello, en esta tesis se ha analizado el papel de las vesículas extracelulares en hiperamonemia y encefalopatía hepática, y su contribución a la aparición de neuroinflamación y los déficits cognitivos y motores asociados. También hemos estudiado posibles estrategias terapéuticas basadas en vesículas extracelulares.

2.1 Descubrimiento y estudios iniciales.

A partir de los años 40 se fueron identificando y describiendo diferentes tipos de vesículas extracelulares en el contexto de áreas de investigación diversas. Las vesículas extracelulares fueron descritas por Chargaff y West en 1946 como partículas derivadas de plaquetas en plasma con capacidad pro-coagulante (Chargaff y West, 1946). En 1967, fueron nombradas como “*platelet dust*” por Wolf (Wolf, 1967). En 1969, Anderson identificó la existencia de “vesículas de matriz” durante el proceso de calcificación ósea (Anderson, 1969). Taylor *et al.* (1980) realizaron las primeras observaciones de que los tumores liberaban fragmentos de membrana. Dos artículos publicados en 1983 centrados en el reciclaje del receptor de transferrina en los reticulocitos fueron los primeros en mostrar la secreción de vesículas formadas en el cuerpo multivesicular (Pan y Johnstone, 1983; Harding *et al.*, 1983). Estos trabajos estudiaban qué ocurría con el receptor de transferrina durante la maduración de los reticulocitos (glóbulos rojos inmaduros), en los que este receptor es abundante, a hematíes maduros, en los cuales el receptor es poco abundante. En el estudio de Harding *et al.* (1983) se marcó el receptor de transferrina con oro y se vio por microscopía electrónica su localización en vesículas contenidas en los

cuerpos multivesiculares (MVB) y cómo los cuerpos multivesiculares se fusionaba con la membrana plasmática liberando las vesículas (Figura 3).

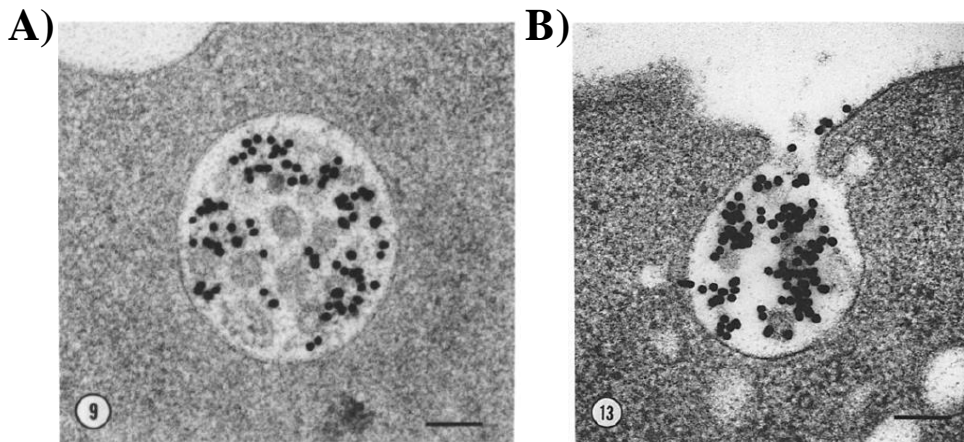


Figura 3. **A)** Imagen tomada por microscopía electrónica de un cuerpo multivesicular en un reticulocito con el receptor de transferrina marcado con oro (puntos negros). Barra de escala = 100 nm. **B)** Imagen de un cuerpo multivesicular en un reticulocito fusionándose con la membrana plasmática y liberando las vesículas contenidas en su interior al espacio extracelular. Barra de escala = 200 nm. *Imágenes extraídas de Harding et al. (1983).*

Johnstone *et al.* (1987) fueron los primeros en acuñar el término “exosoma”, utilizándolo para describir pequeñas vesículas formadas por vesiculación de los endosomas intracelulares y liberadas al exterior de la célula por exocitosis. Dado que estas investigaciones se centraban en la maduración de los reticulocitos y en cómo eliminaban un receptor que ya no era necesario, la función que se atribuyó a los exosomas en este momento fue la de mecanismo para eliminar productos de desecho celulares. Esta visión cambió en 1996, con el descubrimiento de que los exosomas derivados de linfocitos B tanto humanos como murinos contenían MHC de clase II y eran capaces de inducir una respuesta en linfocitos T, lo que sugería que los exosomas podían tener un papel en la presentación de antígenos y modulación del sistema inmune (Raposo *et al.*, 1996). Este estudio despertó el interés por el campo de las vesículas extracelulares, planteando por primera vez su participación activa en la comunicación intercelular. Posteriormente se descubrió que las vesículas extracelulares contenían ARN y miARN (Ratajczak *et al.*, 2006; Valadi *et al.*, 2007), pudiendo suponer un mecanismo adicional de transferencia de información entre células.

2.2 Clasificación y terminología.

La terminología en la literatura puede resultar confusa, principalmente porque en los inicios no se contaba con una estandarización de los términos y las vesículas se nombraban en función de las células de origen o según alguna de las funciones en las que se veían implicadas (prostasomas, vesículas de matriz, “polvo de plaquetas”, epididimosomas, etc).

En función de su tamaño y biogénesis, se pueden establecer tres tipos principales de vesículas extracelulares (Kalra *et al.*, 2016):

- **Exosomas** (30-150 nm). Formados inicialmente como vesículas intraluminales en el cuerpo multivesicular (MVB) y posteriormente liberados al medio extracelular por fusión de éste con la membrana plasmática.
- **Ectosomas o microvesículas** (100-1000 nm). Formados directamente por evaginación a partir de la membrana plasmática.
- **Cuerpos apoptóticos** (50-5000 nm). Generados por mecanismos diversos en células apoptóticas.

Si bien se emplean marcadores para identificar estos subgrupos de vesículas (por ejemplo, las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81 son utilizadas extensamente en la literatura como marcadores de exosomas), existen múltiples variables que pueden afectar a la composición de las vesículas (método de aislamiento, célula y organismo de origen, condición patológica, etc.), por lo que actualmente se considera que asignar una ruta de biogénesis a las vesículas aisladas experimentalmente es complejo. La ISEV (Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares) recomienda utilizar el término “vesícula extracelular” para referirse a cualquier partícula liberada de forma natural por una célula, delimitada por una doble capa lipídica y sin capacidad de autoreplicación (Théry *et al.*, 2018).

2.3 Composición de las vesículas extracelulares y mecanismos de regulación de su contenido.

La composición de las vesículas extracelulares (EVs) varía según el tejido y el tipo celular de origen, así como en función de las condiciones fisiológicas o patológicas. Aunque el contenido de las vesículas puede reflejar la composición de la célula parental, existen mecanismos específicos de *sorting* por los cuales se seleccionan los componentes que van a ser transportados en las vesículas.

El **contenido proteico** de las EVs incluye proteínas de membrana relacionadas con la señalización celular y la fusión (tetraspaninas, lactadherinas, integrinas), chaperonas (proteínas de tipo *heat shock* Hsp60, Hsp70, Hsp90 y HSPs pequeñas), enzimas (GADPH, peroxidasa, piruvato quinasa, lactato deshidrogenasa), proteínas de tráfico de membranas (familia Rab, GTPasas ARF, anexinas), proteínas implicadas en la formación del cuerpo multivesicular (Alix, Tsg101, clatrina), proteínas del citoesqueleto (actina, tubulina) y proteínas de transducción de señal (protein-quinasa, proteínas G heterotriméricas, fosfolipasa C) (Théry *et al.*, 2009). Se ha descrito que las vesículas extracelulares contienen proteínas implicadas en vías de señalización como los ligandos de Notch Jagged 1 y Δ -like 4 (Sheldon *et al.*, 2010; Gonzalez-King *et al.*, 2017), proteínas de la vía Wnt- β -catenina (Gross *et al.*, 2012) y distintas citocinas.

La IL-1 β , una de las principales interleucinas que orquestan la respuesta inflamatoria, puede ser secretada en EVs (MacKenzie *et al.*, 2001; Qu *et al.*, 2007). La activación de receptores P2X7 por el ATP extracelular juega un papel tanto en la generación de

microvesículas con IL-1 β como en los mecanismos de liberación de la IL-1 β desde las microvesículas a las células diana (Pizzirani *et al.*, 2007). La IL-18 se ha encontrado asociada a vesículas derivadas de macrófagos (Gulinelli *et al.*, 2012). Zhang *et al.* (2006) detectaron la presencia de TNF α asociado a membrana en las EVs producidas por fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide, mientras que Söderberg *et al.* (2007) confirmaron la presencia tanto de TNF α como de sus receptores 1 y 2 (TNFR1 y TNFR2) en EVs derivadas de células de melanoma. Otras citocinas pro-inflamatorias descritas en EVs son la IL-6 (Kandere-Grzybowska *et al.*, 2003) y la IL-32 (Hasegawa *et al.*, 2011). Dentro de la categoría de las quimiocinas, se ha observado la presencia de CXCL8 o IL-8 en EVs derivadas de tumores (Baj-Krzyworzeka *et al.*, 2011) y la liberación de vesículas con CX3CL1 o fractalquina a partir de linfocitos apoptóticos para estimular la quimiotaxis de macrófagos (Truman *et al.*, 2008). Las EVs también pueden contener citocinas anti-inflamatorias, entre las que destaca el TGF β . Se ha observado que las vesículas derivadas de células del timo son capaces de promover la proliferación de linfocitos T reguladores (Treg) a través del TGF β (Wang *et al.*, 2008). Las vesículas derivadas de tumores emplean un mecanismo similar para inducir los Treg y evadir la respuesta inmunitaria (Clayton *et al.*, 2007; Szajnik *et al.*, 2010).

En cuanto al **contenido en ácidos nucleicos**, se ha descrito que las EVs contienen diferentes tipos de ARN: ARNm intacto y fragmentado, miARNs, ARNs largos no codificantes, ARN ribosomal, ARNs de interferencia asociados a las proteínas Piwi (una de las dos subfamilias de la familia de proteínas Argonauta) y fragmentos de ARN de transferencia (Baj-Krzyworzeka *et al.*, 2006; Mittelbrunn *et al.*, 2011; Batagov y Kurochkin, 2013; Huang *et al.*, 2013; Kogure *et al.*, 2013). La presencia de ADN en EVs ha sido menos estudiada, aunque algunos estudios relacionados con cáncer señalan que las vesículas pueden contener ADN mitocondrial, ADN de simple y de doble cadena y amplificaciones de oncogenes (Guescini *et al.*, 2010a y 2010b; Balaj *et al.*, 2011; Thakur *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014).

Diversos estudios han demostrado que el ARNm y los miARN contenidos en las EVs pueden ser transferidos a las células diana y ejercer un efecto funcional. Las primeras evidencias se obtuvieron en el estudio realizado por Ratajczak *et al.* (2006), en el que el tratamiento de células mononucleares murinas con EVs derivadas de células madre embrionarias enriquecidas en el ARNm Oct4 resultaba en un aumento de la expresión de la proteína Oct4 en las células receptoras, mientras que si se trataban previamente las vesículas con ARNasa se perdía el efecto. Posteriormente, Valadi *et al.* (2007) confirmaron la presencia tanto de ARNm como de miARNs en las EVs de mastocitos murinos y demostraron que, al añadirse a cultivos de mastocitos humanos, éstos expresaban proteínas de ratón, indicando que se había producido una transferencia de los ARNm desde las EVs murinas. Existen evidencias de que la incorporación de miARNs en vesículas permite su transporte por el torrente sanguíneo, evitando la degradación por ARNasas. Estos miARNs se mantienen funcionales en las EVs y pueden ser transferidos a células diana, participando en procesos tumorales e inmunológicos (Férrandez-Messina *et al.*, 2015). Por ejemplo, las microvesículas derivadas de macrófagos son capaces de

inducir la diferenciación de monocitos naïve mediante la transferencia del miR-223 (Ismail *et al.*, 2013). Okoye *et al.* (2014) reportaron que diferentes subtipos de linfocitos T (Th1, Th2 y Treg) secretaban vesículas con perfiles diferentes de miARNs y describieron un mecanismo por el cual los linfocitos T reguladores pueden regular a los linfocitos Th1 mediante la transferencia de miARNs específicos (let-7d) contenidos en EVs, reduciendo la inflamación.

Se han propuesto diferentes mecanismos por los cuales se incorporan miARNs específicos en las vesículas extracelulares:

- 1) El motivo GGAG se encuentra enriquecido en miARNs de exosomas. Se ha propuesto que la interacción de este motivo con la ribonucleoproteína hnRNPA2B1 está implicada en la incorporación de dichos miARNs en el cuerpo multivesicular (Villarroya-Beltri *et al.*, 2013).
- 2) Las modificaciones post-transcripcionales de los miARNs, tales como la 3' uridilación, contribuyen a la incorporación de los miARNs en las vesículas, mientras que los miARNs con modificaciones de tipo 3' adenilación son más abundantes en las células (Koppers-Lalic *et al.*, 2014).
- 3) La esfingomielinasa neutra de tipo 2 (nSMase2) participa en la incorporación de miARNs en las EVs, en un proceso dependiente de ceramida. Kosaka *et al.* (2010) mostraron que inhibir la nSMase2 reducía los niveles de ciertos miARNs endógenos liberados en vesículas extracelulares, sin modificar sus niveles de expresión en las células; mientras que, si se sobreexpresaba la nSMase2, los niveles de estos mismos miARNs aumentaban en las EVs.
- 4) La proteína AGO2 juega un papel en el cargo de miARNs en las vesículas, aunque los mecanismos detallados se desconocen (Gibbins *et al.*, 2009).

Respecto al **contenido lipídico**, las EVs están enriquecidas en colesterol, diglicéridos, glicerofosfolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos y glicosilceramidas (incluyendo esfingomielina y ceramida) (Record *et al.*, 2014). Las vesículas pueden considerarse transportadores de lípidos bioactivos, tales como prostaglandinas y leucotrienos. Xiang *et al.* (2009) observaron que los exosomas con altos niveles de PGE2 estaban implicados en la evasión del sistema inmune por parte de las células tumorales y promovían el crecimiento del tumor. Por otra parte, Pitt *et al.* (2014) reportaron que el ácido docosahexanoico y la lisofosfatidilcolina contenidos en exosomas aumentaban la capacidad antigénica de células dendríticas.

2.4 Mecanismos de biogénesis y liberación de vesículas extracelulares.

Los **exosomas** se generan por la vía endocítica en el interior del cuerpo multivesicular (MVB). Este proceso consta de dos pasos principales: 1) formación de vesículas intraluminales en el MVB o endosoma tardío y 2) secreción de los exosomas al exterior de la célula por fusión del MVB con la membrana plasmática. En la Figura 4A se muestra el proceso de biogénesis de forma esquemática y los componentes que actúan en cada paso.

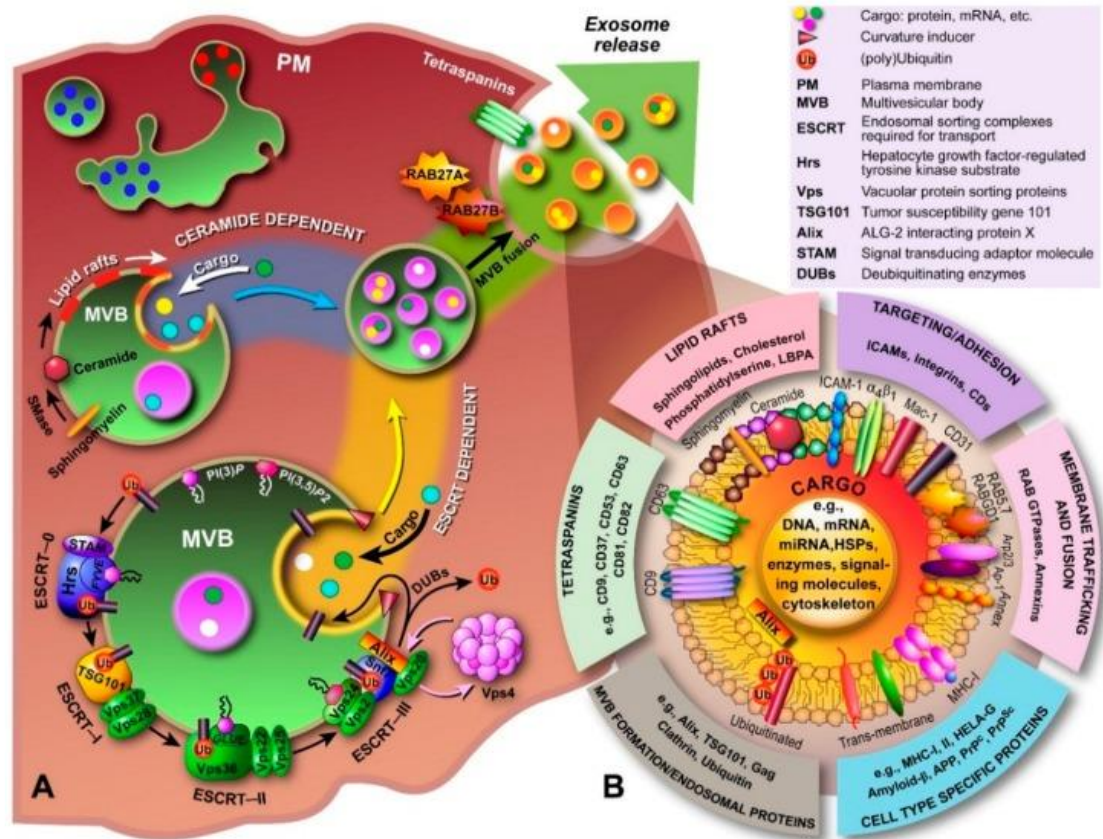


Figura 4. A) Mecanismos de biogénesis de exosomas y B) composición de los mismos. Imagen extraída de Kalra et al. (2016).

- **Mecanismos dependientes de ESCRT** (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). El proceso de formación de vesículas intraluminales comienza con la reorganización de la membrana endosomal en microdominios enriquecidos en tetraspaninas (principalmente CD63 y CD9), que reclutan la maquinaria necesaria para la formación de las vesículas (Pols y Klumperman, 2009). Este proceso implica a los complejos ESCRT-0, I, II y III, que actúan de forma secuencial. En primer lugar, la abundancia de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI(3)I) y de proteínas ubiquitinadas resultan en la unión de la subunidad Hrs del complejo ESCRT-0 al PI(3)P por el dominio FYVE. A continuación, se reclutan las subunidades TSG101 y Vps28 del ESCRT-I para formar el complejo ESCRT-0/ESCRT-I en la membrana del endosoma. Posteriormente, se segregan proteínas ubiquitinadas en microdominios y se moviliza el complejo ESCRT-II (Vps22). ESCRT-I y II inician la formación de las vesículas intraluminales hacia el interior del MVB. Finalmente se reclutan las subunidades Alix y Vps2 del ESCRT, responsable del cierre de las vesículas y su escisión de la membrana del MVB (Kalra et al., 2016) (Figura 4A, parte inferior).
- **Mecanismos independientes de ESCRT.** Aunque menos estudiados, existen evidencias de vías alternativas para la formación de exosomas que implican la formación de microdominios de glicolipoproteínas en la membrana del MVB. Se generan microdominios de esfingomiélna, que posteriormente es convertida a

ceramida por esfingomielinasas. Esta acumulación de ceramida desencadena la formación de las vesículas intraluminales (Trajkovic *et al.*, 2008; Wollert y Hurley, 2010), tal y como se muestra en la parte superior de la Figura 4A. Un metabolito de la esfingomielina, la esfingosina 1-fosfato (S1P), también es importante para la biogénesis de los exosomas, ya que silenciar los receptores de S1P1 reduce la formación de exosomas positivos para CD63, CD81 y flotilina *in vitro* en células HeLa y células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC) (Kajimoto *et al.*, 2013). Otra vía alternativa a ESCRT es la ruta sindecano-sintenina-Alix (Baietti *et al.*, 2012): la interacción de la sintenina con Alix promueve la formación de vesículas intraluminales, en un proceso dependiente del heparan-sulfato, heparanasa, el factor de ribosilación 6 (ARF6) y la fosfolipasa D2.

En la Figura 4B se resume la composición de los exosomas, comentada anteriormente en la Introducción, apartado *Composición de las vesículas extracelulares y mecanismos de regulación de su contenido*, indicando su localización (en el interior de la vesícula o en la membrana).

La liberación de exosomas al espacio extracelular está regulada por diferentes mecanismos, entre los cuales destacan las GTPasas de la familia Rab. El contenido de los exosomas puede diferir según el mecanismo de liberación. En la Figura 5 se resumen las proteínas implicadas en la regulación de la liberación de exosomas y microvesículas, indicando en qué componentes están enriquecidas las vesículas liberadas por cada mecanismo. RAB11 y RAB35 promueven la fusión del MVB con la membrana plasmática y favorecen la liberación de exosomas enriquecidos en flotilina, Wnt, PLP y el receptor de transferrina (Laulagnier *et al.*, 2004), mientras que las proteínas RAB27 A y B regulan la liberación de exosomas enriquecidos en CD63, Alix y Tsg101 (Stenmark, 2009; Ostrowski *et al.*, 2010). Se ha descrito que RAB7 modula la liberación de exosomas positivos para Alix y sintenina en células tumorales (Baietti *et al.*, 2012). Otras proteínas que participan en la regulación de la liberación de las EVs son la diacilglicerol quinasa α (DGK α) y las proteínas SNARE. La DGK α inhibe la liberación de exosomas positivos para Lamp1 y CD63 y con ligandos Fas en su membrana (Alonso *et al.*, 2007). La proteína de tipo SNARE Vamp7 (proteína de membrana asociada a vesículas 7) estimula la liberación de exosomas que contienen acetilcolinesterasa (Fader *et al.*, 2009).

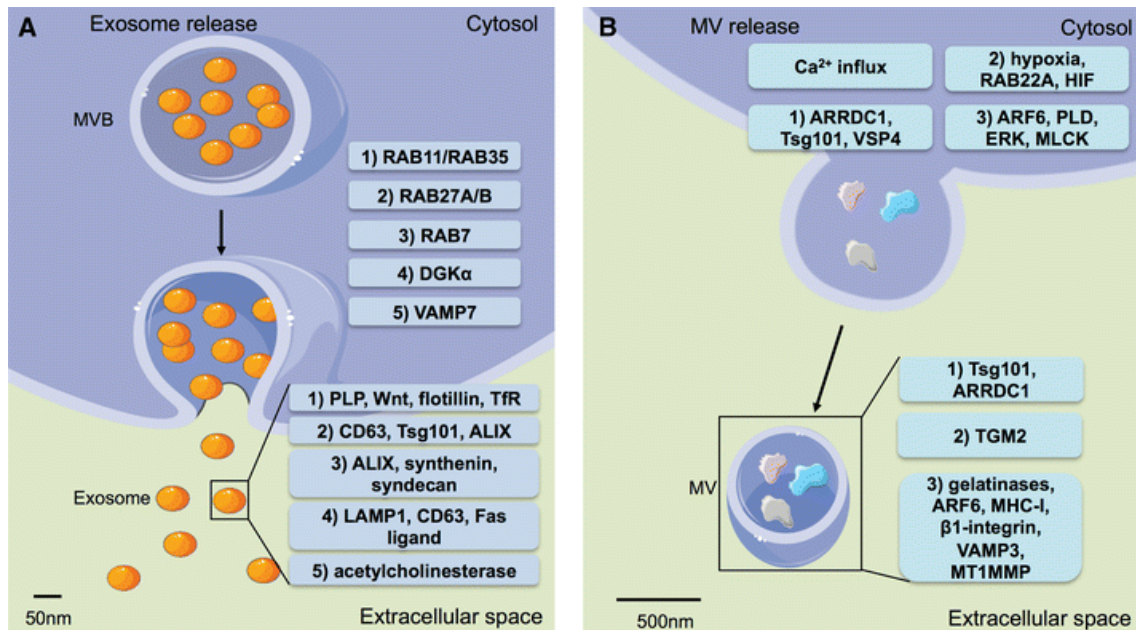


Figura 5. Proteínas implicadas en la regulación de la liberación de **A)** exosomas y **B)** microvesículas. Se indican los componentes en los que están enriquecidas las vesículas formadas por cada uno de los mecanismos. *Imagen extraída de Abels et al. (2016).*

A diferencia de los exosomas, las **microvesículas** (MVs) se generan directamente a partir de la membrana plasmática por evaginación. Se han descrito varias vías de formación de MVs que dan lugar a vesículas con perfiles proteicos diferenciados (Figura 5B):

- 1) Señales como el influjo de calcio inducen la redistribución de los fosfolípidos de la membrana plasmática y conducen a un aumento de la liberación de microvesículas (Bucki *et al.*, 1998)
- 2) Otros estudios muestran el reclutamiento de la subunidad Tsg101 del ESCRT-I hacia la membrana plasmática a través de la unión a la proteína con dominio de arrestina 1 (ARRDC1). Este proceso requiere la interacción de la ATPasa Vsp4 y la ligasa E3 WWP2 para ubiquitinar ARRDC1. Las MVs liberadas por esta vía contienen ARRDC1 y Tsg101 (Nabhan *et al.*, 2012).
- 3) En condiciones de hipoxia, la expresión dependiente de HIF de RAB22A estimula la liberación de MVs portadoras de glutamina γ -glutamyltransferasa 2 (TGM2) (Wang *et al.*, 2014).
- 4) El factor de ribosilación del ADP 6 (ARF6) inicia una cascada que conduce a la activación de la fosfolipasa D. A continuación, se recluta la quinasa ERK hacia la membrana plasmática, donde fosforila y activa a la quinasa de cadena ligera de miosina (MYLK), que desencadena la formación de microvesículas enriquecidas en ARF6, MHC-I, integrina β 1, VAMP3 y MT1MMP (Muralidharan-Chari *et al.*, 2009).

2.5 Interacción de las vesículas extracelulares con las células receptoras.

Existen diferentes mecanismos mediante los cuales las EVs pueden interactuar con las células diana (French *et al.*, 2017). Se resumen en la Figura 6A:

- 1) Interacción con proteínas de membrana. En este caso, las vesículas no son internalizadas por la célula receptora, sino que producen su efecto mediante la interacción entre proteínas de membrana de la vesícula y de la membrana plasmática de la célula.
- 2) Fusión de membranas. Se produce una fusión de la membrana de la vesícula con la membrana plasmática de la célula, de forma que el contenido de la vesícula es liberado al interior de la célula.
- 3) Fagocitosis. La vesícula es rodeada por la membrana de la célula e internalizada.
- 4) Macropinocitosis. Implica la formación de grandes extensiones de la membrana plasmática (*ruffles*) que internalizan fluido extracelular junto con las vesículas.
- 5) Endocitosis mediada por clatrina. Las vesículas son internalizadas tras la formación de una capa de clatrina que provoca la invaginación de la membrana plasmática.
- 6) Endocitosis mediada por caveolina. Proceso similar al anterior, pero en este caso la proteína implicada es la caveolina.
- 7) Endocitosis mediada por balsas lipídicas. Se forman acumulaciones de ciertos lípidos en la membrana plasmática que interactúan con las vesículas y promueven su internalización.

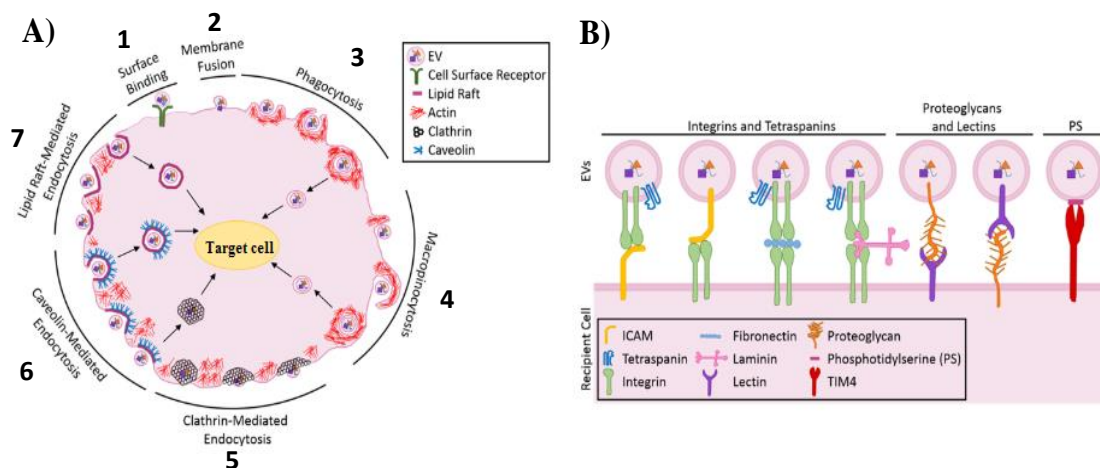


Figura 6. A) Mecanismos de interacción de las vesículas extracelulares con las células receptoras y B) moléculas implicadas en estos procesos. *Imagen modificada de French et al. (2017).*

Aparte de para entender los procesos biológicos y su regulación, conocer estos mecanismos tiene aplicación en el diseño de experimentos para avanzar más en su conocimiento, ya que se puede inhibir o estimular la producción y los efectos de las vesículas extracelulares. Por ejemplo, inhibidores de la endocitosis mediada por clatrina como el *dynasore* o la clorpromazina reducen la captación de vesículas.

Las moléculas principales que median la interacción de las vesículas con la superficie de las células diana son las tetraspaninas, las integrinas, los proteoglicanos, las lectinas y la fosfatidilserina (Figura 6B). Las tetraspaninas son proteínas transmembrana involucradas en adhesión celular, migración y señalización (Hemler, 2005). La expresión de determinadas tetraspaninas puede reclutar moléculas de adhesión adicionales que dirigen las vesículas hacia ciertos tipos celulares. Por ejemplo, la asociación de la tetraspanina 8 con la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) y la integrina α_4 en vesículas derivadas de adenocarcinoma pancreático promueve la captación de las EVs en células endoteliales (Nazarenko *et al.*, 2010). Las integrinas son proteínas transmembrana que actúan como receptores de proteínas de la matriz extracelular (ECM). La interacción de las integrinas con proteínas de la ECM como la laminina o la fibronectina promueve la unión de las vesículas con las células diana y su internalización (Antonyak *et al.*, 2011).

Otro mecanismo de interacción entre EVs y células receptoras es el mediado por proteoglicanos y lectinas, ambos enriquecidos en las vesículas. Se ha descrito la presencia de lectinas tales como la E-selectina y las galectinas 1, 3 y 5 en las vesículas extracelulares. Estas lectinas reconocen y se unen a proteoglicanos o glicolípidos expresados en la superficie de la célula diana (Ghazarian *et al.*, 2011). De igual forma, los proteoglicanos presentes en la membrana de la EV pueden interactuar con lectinas de la célula receptora (Bruno *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2015). Por último, la fosfatidilserina (PS), un fosfolípido abundante en las EVs, promueve la internalización de las vesículas por fagocitosis mediante su unión con el receptor TIM4 (Morelli *et al.*, 2004; Prada *et al.*, 2016).

La captación de las vesículas extracelulares puede variar en función de la diferente composición tanto de la célula de origen de las vesículas como de las células receptoras y de otros factores como el pH. Aunque se requiere más investigación en este campo, se ha visto que el perfil de moléculas de superficie de las EVs puede determinar su tropismo por ciertos tejidos u órganos diana, de manera que el enriquecimiento en ciertas moléculas en la superficie de las vesículas estaría favoreciendo su captación en determinados tejidos o tipos celulares. Por ejemplo, se ha visto que las vesículas derivadas de la leche materna están enriquecidas en MUC1, el cual interactúa con la señal DC-SIGN en las células dendríticas, favoreciendo su captación por este tipo celular específico, mientras que EVs de otros orígenes y deficientes en MUC1 no son internalizadas por las células dendríticas (Nässlund *et al.*, 2014). En un estudio publicado por Hoshino *et al.* (2015) se muestra que el patrón de integrinas expresadas por las EVs derivadas de distintas líneas tumorales es diferente y determina su preferencia por determinados órganos diana, donde favorecen la creación de nichos pre-metastáticos. Vesículas derivadas de linfocitos B están enriquecidas en ácido siálico con uniones $\alpha(2-3)$, lo cual permite su captura mediante la sialoadhesina CD169 expresada en macrófagos y en diversos tipos de leucocitos (Saunderson *et al.*, 2014).

2.6 Funciones de las vesículas extracelulares: papel en la comunicación intercelular y relevancia en patologías.

2.6.1 EVs y sistema inmune. Patologías asociadas con inflamación crónica y enfermedades autoinmunes.

Uno de los principales mecanismos por los que las vesículas extracelulares pueden modular la respuesta inmune es la **presentación de antígenos**. Las células presentadoras de antígenos exponen péptidos antigénicos en su superficie, unidos a los complejos mayores de histocompatibilidad I y II (MHC-I y II). Los linfocitos T inmaduros reconocen estos complejos a través del receptor de células T (TCR) y se activan en caso de reconocer un péptido anómalo y potencialmente patogénico. En concreto, los linfocitos CD4⁺ reconocen el MHC-II, más abundante en células presentadoras de antígeno profesionales, mientras que los linfocitos CD8⁺ reconocen el MHC-I, que puede estar presente en todas las células del organismo. Las EVs pueden transportar tanto MHC-I como MHC-II, de forma que participan en la presentación de antígenos y modulan la activación de las células T.

Se han descrito diversos mecanismos por los cuales las EVs, especialmente los exosomas, pueden promover la respuesta inmune a través de la presentación de antígenos:

- Presentación directa. Ocurre cuando los péptidos unidos a los complejos MHC de la vesícula son reconocidos por linfocitos CD4⁺ o CD8⁺, activándolos.
- Presentación cruzada. En este caso, la vesícula es internalizada por una célula presentadora de antígeno y le transfiere los complejos MHC. Posteriormente, la célula puede presentar estos complejos en su superficie y activar a linfocitos T.

Además de participar en la presentación de antígenos, las vesículas extracelulares pueden estimular la respuesta inmune por diferentes vías. Las EVs derivadas de macrófagos infectados por bacterias estimulan la secreción de mediadores pro-inflamatorios, como TNF α y RANTES, y aumentan la expresión de iNOS en macrófagos y neutrófilos (Bhatnagar y Schorey, 2007). En este estudio observaron que las vesículas derivadas de las células infectadas contenían patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que eran reconocidos por los receptores de tipo Toll-like 2 y 4, activando una señal inflamatoria dependiente de MyD88.

Las vesículas derivadas de DCs también pueden promover la activación y proliferación de linfocitos *natural killer* (NK), ya que portan en su superficie ligandos funcionales de NKG2D, como IL-15R α , que estimulan la activación de los NK (Viaud *et al.*, 2009).

Por otra parte, el papel de las vesículas extracelulares en la respuesta inmune es dual, pudiendo también inhibirla a través de distintos mecanismos. De entre ellos, pueden destacarse:

- Atenuación de la respuesta por apoptosis de células inmunes. Este proceso se ha estudiado principalmente en el contexto de la evasión del sistema inmune por parte de las células tumorales. Se ha descrito que las vesículas derivadas de

tumores contienen ligandos de muerte celular como FasL (CD95L), TNF α , galectina-9, CD73 o TRAIL, que promueven la apoptosis (Andreola *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2005; Abusamra *et al.*, 2005; Klibi *et al.*, 2009; Clayton *et al.*, 2011).

- Opsonización de células apoptóticas. Miksa *et al.* (2009) observaron que las EVs liberadas por células dendríticas inmaduras reducían la inflamación en un modelo de sepsis en rata, favoreciendo la opsonización (unión de anticuerpos y otras moléculas de adhesión a un agente patógeno para su degradación por las células de la inmunidad innata) de células apoptóticas, promoviendo así su fagocitosis por células NK. Para que se produjera este proceso, era esencial la proteína MFGE8 (Miksa *et al.*, 2009).

Las vesículas derivadas de células con propiedades anti-inflamatorias, como las células madre mesenquimales, pueden reducir la inflamación por distintas vías, que se detallarán más adelante en esta tesis (apartado *Potencial terapéutico de las vesículas extracelulares: EVs derivadas de células madre mesenquimales* de la Introducción).

Debido a la capacidad inmunomoduladora de las EVs, estas se encuentran implicadas en la patogénesis de un amplio espectro de enfermedades que cursan con inflamación crónica, así como de enfermedades autoinmunes. A continuación, se recogen algunas de las patologías en las que se ha descrito la contribución de las EVs y los mecanismos por los que actúan.

Obregon *et al.* (2009) observaron que las vesículas derivadas de células dendríticas activadas con LPS contenían MHC-II y moléculas coestimuladoras como HLA-II, CD40 y CD83, por lo que podían promover la proliferación de células T *in vitro*, modulando la inmunidad adaptativa tal y como se ha explicado anteriormente. No obstante, descubrieron que estas vesículas transportaban tanto TNF α soluble como sus receptores TNFR1 y TNFR2, de forma que también podían modular la inmunidad innata, transfiriendo estas moléculas a otras células. Concretamente, en este estudio demostraron que las vesículas derivadas de las células dendríticas activadas eran internalizadas por células epiteliales e inducían la liberación de moléculas pro-inflamatorias como IL-8, MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5), MIP-1 β y G-CSF. Si se incubaban previamente las EVs con un anticuerpo que bloqueara el TNF α , se inhibía la liberación de IL-8, MCP-1, y G-CSF. Obregon *et al.* (2009) proponen que el TNF α soluble contenido en las vesículas se internalizaría en las células epiteliales y activaría el TNFR1, induciendo la activación del factor NF- κ B y la liberación de citocinas pro-inflamatorias.

En concordancia con este estudio, Zhang *et al.* (2006) observaron que los exosomas derivados de fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide contenían TNF α (en este caso, unido a membrana), que era capaz de activar la vía de NF- κ B e inducir la expresión de MMP-1 al ser añadidos a cultivos de fibroblastos. Si los exosomas se añadían a cultivos de linfocitos T CD4⁺, promovían la proliferación y la resistencia de las células a la apoptosis. Estos datos indican que el TNF α contenido en los exosomas derivados de fibroblastos podría estar contribuyendo a la inflamación articular, caracterizada por la infiltración y proliferación de linfocitos T CD4⁺ en las articulaciones

y la degradación de la matriz extracelular. Otro estudio que refuerza la relevancia del TNF α contenido en vesículas en el desarrollo y la promoción de la inflamación es el publicado por Gao *et al.* (2016) en el contexto de la ateroesclerosis. En primer lugar, comprobaron que las células dendríticas maduras estimuladas con LPS aumentaban los marcadores de inflamación y adhesión (VCAM-1, ICAM-1, E-selectina) en células endoteliales si se cultivaban ambos tipos celulares en un sistema transpocillo. Este efecto se reproducía si se añadían solamente las vesículas derivadas de las DCs a las células endoteliales. Profundizando en el mecanismo, se vio que los marcadores de inflamación y adhesión no se veían aumentados si se inhibía el TNF α de las EVs derivadas de DCs, ya fuera silenciando su expresión en las células de origen o incubando las vesículas con un anticuerpo anti-TNF α , y que la inflamación se desencadenaba por la activación de la vía NF- κ B. Por último, se comprobó que los efectos también ocurrían *in vivo*: la inyección de EVs derivadas de DCs en ratones aumentaba los marcadores de inflamación y adhesión a las 24 y a las 72 h, y aumentaba el tamaño de las lesiones ateroscleróticas a las 12 semanas (Gao *et al.*, 2016).

El papel de las EVs se ha descrito en diferentes patologías con inflamación pulmonar crónica. En el caso de la EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), se observó que las EVs derivadas de tejido pulmonar de los pacientes contenían miR-210, el cual bloquea la expresión de Atg7, previniendo la autofagia y promoviendo la diferenciación de los miofibroblastos y la fibrosis (Fujita *et al.*, 2015). En asma, las vesículas CD36⁺ favorecen la progresión de la inflamación a través de la formación de complejos TLR4 y TLR6 (Stewart *et al.*, 2010). Las EVs aisladas de fluido broncoalveolar de pacientes asmáticos contienen enzimas productoras de leucotrienos que se mantienen funcionales, mediando la secreción de factores inflamatorios en las células epiteliales de los bronquios (Torregrosa-Paredes *et al.*, 2012). Una complicación frecuente de la pancreatitis aguda es el daño pulmonar asociado a la respuesta inflamatoria sistémica. Bonjoch *et al.* (2016) utilizaron un modelo de pancreatitis aguda experimental en rata para estudiar la contribución de las EVs a la inflamación pulmonar. Las EVs aisladas de plasma del modelo eran capaces de activar macrófagos alveolares *in vitro*, induciendo la producción de IL-6, IL-1 β y CCL2 (Bonjoch *et al.*, 2016).

En la diabetes de tipo I, las células β pancreáticas producen vesículas que contienen autoantígenos, favoreciendo la activación de las células T autoreactivas (Palmisano *et al.*, 2012; Vomund *et al.*, 2015; Ciancaruso *et al.*, 2017). En el estudio realizado por Guay *et al.* (2019) se describió un nuevo mecanismo patogénico relacionado con las EVs derivadas de linfocitos T: ciertos miARNs (miR-142-3p, miR-142-5p, y miR-155) pueden ser transferidos desde las EVs de células T a las células β del páncreas, induciendo la muerte por apoptosis de las células β y la expresión de quimiocinas (CCL2, CCL7, CXCL10) que aumentan a su vez la infiltración de células T activadas.

En el caso de la colitis ulcerosa, se ha sugerido la implicación de las vesículas extracelulares en la inflamación crónica (Xu *et al.*, 2016), aunque existen pocas evidencias experimentales por el momento. En un trabajo publicado por Wong *et al.* (2016), llevado a cabo en un modelo de colitis ulcerosa aguda en ratones inducida por la

ingesta de sulfato de dextrano sódico (DSS), se mostró que las EVs aisladas del suero de estos ratones eran capaces de inducir la activación de p38 y ERK en macrófagos *in vitro*, aumentando la producción de TNF α (Wong *et al.*, 2016). En este mismo estudio, se analizó la composición de las vesículas extracelulares aisladas mediante proteómica, revelando que las EVs derivadas de los ratones con la patología contenían mayor número de proteínas de fase aguda y proteínas relacionadas con la activación del sistema del complemento y la coagulación: cadena gamma del fibrinógeno, proteína del complemento C3, factor del complemento 1, cadena beta del fibrinógeno, inhibidor 1 del activador del plasminógeno, antitrombina III, proteína de unión a manosa A, plasminógeno, factor de coagulación V, proteína del complemento C4-B y protrombina (Wong *et al.*, 2016).

Se ha descrito la presencia de EVs pro-inflamatorias en el suero de pacientes con lupus eritematoso. Estas vesículas inducían la secreción tanto de TNF α como de IFN γ al añadirse a PBMCs en cultivo, mediante un mecanismo dependiente de los TLR (Lee *et al.*, 2016).

Hirsova *et al.* (2016) estudiaron el papel de las EVs en esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Esta patología cursa con inflamación y puede progresar a cirrosis. En primer lugar, observaron que la lipototoxicidad inducía un aumento de la liberación de vesículas en hepatocitos de rata, de ratón y de humano en cultivos *in vitro*. A continuación, demostraron que, si se añadían las EVs de hepatocitos cultivados en condiciones de lipotoxicidad o de un modelo murino de NASH a macrófagos de ratón en cultivo, los macrófagos se activaban, secretando mayores cantidades de IL-1 β e IL-6. Este proceso estaba mediado por la interacción del ligando TRAIL de las EVs con el receptor DR5 y la consecuente activación de NF κ B. En otro estudio del mismo grupo, se observó que las EVs derivadas de hepatocitos cultivados en condiciones de lipotoxicidad no solo activaban a los macrófagos, sino que también tenían un efecto quimioatrayente sobre ellos, dependiente de la quimiocina CXCL10 (Ibrahim *et al.*, 2016).

Otra de las patologías en las que se ha estudiado la relevancia de las EVs es la esclerosis múltiple. En esta enfermedad de carácter autoinmune se produce una desregulación entre el balance de linfocitos T CD4⁺ proinflamatorios (Th1, Th17) y los linfocitos T reguladores (Treg). En un estado fisiológico, los Treg mantienen la homeóstasis inhibiendo los efectos perjudiciales de Th1 y Th17. En la esclerosis múltiple, los Treg se encuentran disminuidos en frecuencia y funcionalidad, de manera que se produce un exceso de actividad de los linfocitos pro-inflamatorios, que atacan y destruyen la vaina de mielina, causando déficits neurológicos. Kimura *et al.* (2018) observaron una abundancia del miARN let-7i en EVs aisladas de plasma de pacientes con esclerosis. El aumento de este miARN resultaba en una menor expresión del receptor de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1R) y del receptor de TGF β 1 (TGF β R1) en los linfocitos T CD4⁺ *naïve*, lo que disminuía su diferenciación hacia linfocitos Treg.

2.6.2 EVs y sistema nervioso. Enfermedades neurodegenerativas.

Todos los tipos celulares del sistema nervioso liberan EVs, incluyendo progenitores neurales (Marzesco *et al.*, 2005), neuronas (Fauré *et al.*, 2006; Lachenal *et al.*, 2011), astrocitos (Taylor *et al.*, 2007; Bianco *et al.*, 2009; Guescini *et al.*, 2010), microglía (Bianco *et al.*, 2005; Potolicchio *et al.*, 2005), oligodendrocitos (Krämer-Albers *et al.*, 2007; Bahkti *et al.*, 2011; Fitzner *et al.*, 2011), así como las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (Fevrier *et al.*, 2004; Lopez-Verrilli y Court, 2012; Lopez-Verrilli *et al.*, 2013). En la siguiente imagen (Figura 7) se resumen algunas de las principales interacciones mediadas por EVs en el sistema nervioso:

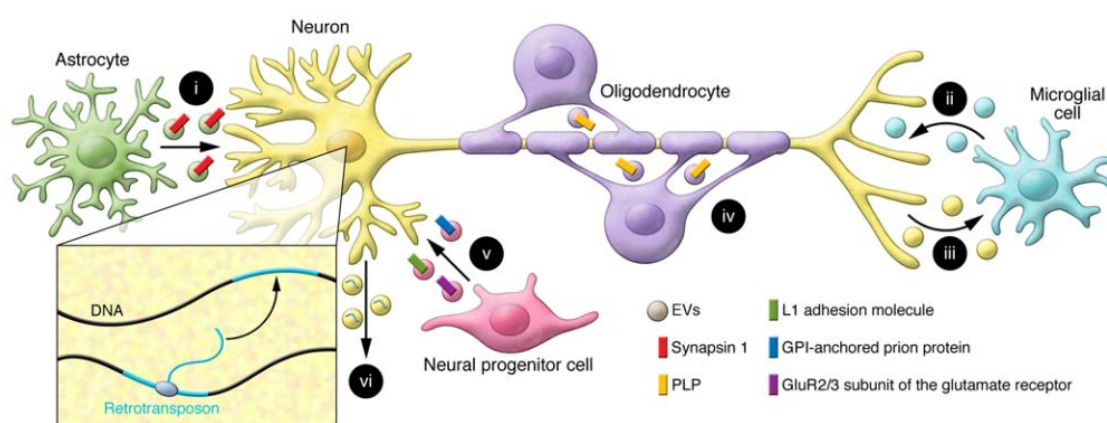


Figura 7. Comunicación intercelular entre células del sistema nervioso. *Imagen extraída de Zapulli V et al. (2016).*

- I. Las EVs derivadas de astrocitos inducen la arborización dendrítica de las neuronas mediante el transporte y liberación de sinapsina I (Feliciano *et al.*, 2014).
- II. Las EVs derivadas de microglía aumentan la actividad sináptica de las neuronas (Zapulli *et al.*, 2016).
- III. Las EVs derivadas de neuronas activan las funciones gliales, como la fagocitosis en microglía para eliminar sinapsis inactivas y proteínas tóxicas (Yuyama *et al.*, 2012; Bahrini *et al.*, 2015).
- IV. Las EVs derivadas de oligodendrocitos promueven la tolerancia al estrés en las neuronas, estimulan el transporte anterógrado de moléculas de señalización en las neuronas y transportan proteolipoproteínas (PLP), necesarias para la mielinización (Frühbeis *et al.*, 2013; Fröhlich *et al.*, 2014).
- V. Las EVs de progenitores neurales inmaduros transportan proteínas como la molécula de adhesión L1, la proteína priónica anclada a glicosilfosfatidilinositol y las subunidades GluA2/3 del receptor de glutamato, participando en el desarrollo temprano del cerebro (Fauré *et al.*, 2006).
- VI. Se ha visto que las EVs pueden contener retrotransposones. Durante la neurogénesis, la actividad de los retrotransposones aumenta, resultando en un alto grado de mosaicismo somático de los genomas neuronales (Muotri *et al.*, 2005).

Las vesículas extracelulares juegan un papel en la **comunicación sináptica**. Lachenal *et al.* (2011) describieron la liberación de exosomas desde el soma y las dendritas en neuronas maduras de la corteza y el hipocampo. En este estudio observaron que la liberación de vesículas aumentaba *in vitro* tras la adición de compuestos antagonistas de los receptores GABA (bicuculina y picrotoxina), que aumentaban la actividad glutamatérgica espontánea de las neuronas. Por el contrario, si se añadían antagonistas de los receptores AMPA o NMDA se revertía este efecto, reduciéndose la liberación de exosomas, indicando que los receptores de AMPA y NMDA regulan la liberación de EVs en neuronas. Otros factores que aumentaban la liberación de EVs en neuronas eran la despolarización y el influjo de calcio (Lachenal *et al.*, 2011).

Otros estudios muestran evidencias del papel de las EVs en la comunicación entre neuronas, sugiriendo que actúan como un mecanismo de control de la plasticidad sináptica, ya que las EVs liberadas por una neurona pre-sináptica pueden ser captadas por otra neurona post-sináptica, causando modificaciones directas en la transducción de señal y en la expresión de proteínas en la neurona receptora (Chivet *et al.*, 2013; Edelstein y Smythies, 2014). También se ha descrito que las EVs liberadas por las neuronas están enriquecidas en proteínas y miARNs relacionados con la plasticidad neuronal (como la proteína MAP1B), de forma que las EVs estarían regulando la sinapsis al ser captadas por la neurona post-sináptica (Goldie *et al.*, 2014).

Aunque las vesículas extracelulares son esenciales en procesos fisiológicos, también contribuyen a la patogénesis de diversas **enfermedades neurodegenerativas**, tales como el Alzheimer, el Parkinson y las enfermedades priónicas, caracterizadas por la agregación y deposición de proteínas en determinadas regiones del cerebro. En el contexto de la enfermedad de Alzheimer, se ha descrito que los exosomas pueden transportar el péptido A β y actuar como centros de nucleación para la formación de placas amiloides, acelerando la degeneración neuronal (Rajendran *et al.*, 2006; van Niel *et al.*, 2015; Sugiura *et al.*, 2015). La proteína tau, implicada en la formación de agregados de péptido A β , también puede ser liberada desde las neuronas en vesículas extracelulares (Saman *et al.*, 2014). En Parkinson, la acumulación de α -sinucleína se ha asociado con su liberación en EVs desde las neuronas (Emmanouilidou *et al.*, 2010; Danzer *et al.*, 2012), aunque los mecanismos por los que se propaga la enfermedad en el cerebro aún no se han esclarecido. En el caso de la esclerosis lateral amiotrófica, causada por acumulación de una forma mutante de la superóxido dismutasa (SOD1) en un subconjunto de pacientes y por la translocación y plegamiento incorrecto de la proteína TAR de unión al ADN 43 (TDP-43) en otros, se ha visto que las EVs contribuyen a la propagación de estas proteínas en el cerebro (Basso *et al.*, 2013; Grad *et al.*, 2015).

La comunicación mediante EVs entre distintos tipos celulares del cerebro también puede contribuir a la amplificación de la neuroinflamación y de las alteraciones en la neurotransmisión. Prada *et al.* (2018) demostraron la transferencia funcional de vesículas extracelulares entre glía y neuronas. En este estudio muestran un nuevo mecanismo causante de la pérdida de sinapsis excitatorias durante la neuroinflamación: las EVs de microglía pro-inflamatoria contienen el miARN miR-146a-5p y pueden transferirlo a

neuronas tanto *in vitro* como *in vivo*, inhibiendo la traducción de la sinaptotagmina 1 y la neuroligina 1, necesarias para la formación de espinas dendríticas. Otros miARNs enriquecidos en las vesículas derivadas de microglía pro-inflamatoria fueron el miR-223, cuyas dianas son la subunidad GluA2 de los receptores de glutamato de tipo AMPA y la subunidad NR2B de los receptores de glutamato de tipo NMDA; y el miR-181a, que regula la subunidad NR2B, aunque no se ha comprobado su transferencia a neuronas mediada por EVs.

2.6.3 EVs como mecanismo de comunicación entre sangre periférica y cerebro.

Uno de los aspectos por el que las vesículas extracelulares tienen relevancia en el contexto de las enfermedades que cursan con inflamación sostenida, como es el caso de la encefalopatía hepática, es que suponen un mecanismo adicional de **comunicación entre la periferia y el cerebro**. Algunos estudios recientes proponen que las EVs circulantes en sangre periférica pueden transmitir efectos deletéreos al sistema nervioso central en ciertas condiciones patológicas. Ridder *et al.* (2014) aislaron EVs del suero de ratones transgénicos que expresaban de la recombinasa Cre de forma específica en células del linaje hematopoyético y las inyectaron a ratones control. Observaron que las vesículas inyectadas eran capaces de transferir ARNs funcionales a distintos tipos neuronales en el cerebro, y especialmente a neuronas de Purkinje. Este proceso se favorecía por la inflamación periférica y era suficiente para inducir cambios relevantes en las células receptoras, alterando el perfil de expresión de miARNs en las neuronas de Purkinje que habían captado ARN de las vesículas inyectadas. Li *et al.* (2018) purificaron EVs del suero de ratones con endotoxemia inducida por LPS, las marcaron con fluorescencia y las inyectaron a ratones control, detectando las vesículas en el hipocampo a las 24 horas de la inyección. También observaron que la inyección de las vesículas inducía activación de microglía y astrogliosis en hipocampo, así como un aumento de la IL-6 y el TNF α en el cerebro de los ratones receptores (Li *et al.*, 2018).

Los mecanismos por los cuales las EVs son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica no se conocen en su totalidad, pero los estudios realizados indican que este proceso estaría facilitado en situaciones patológicas. Chen *et al.* (2016) estudiaron las interacciones entre las EVs y las células endoteliales de la microvasculatura cerebral *in vitro*, en un sistema transpocillo que simulaba la barrera hematoencefálica, mostrando que las vesículas eran capaces de atravesar la monocapa de células endoteliales en condiciones de inflamación (células estimuladas con TNF α) pero no en condiciones normales. En este mismo trabajo se vio que las vesículas eran internalizadas por las células endoteliales mediante endocitosis, sugiriendo que seguían una ruta transcelular para atravesar la barrera hematoencefálica. Morad *et al.* (2019) han mostrado recientemente que las EVs derivadas de tumores son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica *in vivo*, disminuyendo la expresión de RAB7 en el endotelio y promoviendo así su tasa de transporte mediante transcitosis.

2.7 Potencial terapéutico de las vesículas extracelulares: EVs derivadas de células madre mesenquimales.

2.7.1 Propiedades de las células madre mesenquimales.

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células multipotentes, no hematopoyéticas, que presentan diferentes propiedades inmunomoduladoras, anti-inflamatorias y regenerativas (Squillaro *et al.*, 2016; Galipeau y Sensébé, 2018; Trento *et al.*, 2018). En 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) definió los siguientes criterios mínimos para las MSCs: células adherentes que expresan los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105; que carecen de CD14, CD34, CD45, CD19, CD11b, CD79a y HLA-DR; y que pueden diferenciarse en adipocitos, osteoblastos o condroblastos *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006; Hocking y Gibran, 2010; Duscher *et al.*, 2015).

El primer ensayo clínico con células madre mesenquimales en humanos fue llevado a cabo por Lazarus *et al.* (1995). Desde entonces, diferentes estudios preclínicos han demostrado el potencial terapéutico de las MSCs en una gran variedad de patologías (Caimi *et al.*, 2010, Regmi *et al.*, 2019). Muchos estudios se han centrado en el potencial de diferenciación de las células madre mesenquimales y su habilidad para regenerar diferentes tejidos (Heino y Hentunen, 2008; Kalinina *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2018), mientras que otros han estudiado los efectos inmunomoduladores de las MSCs como posible tratamiento en enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Zhao *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2017).

En los últimos años, se ha visto que las células madre mesenquimales ejercen sus efectos terapéuticos principalmente de forma paracrina, secretando diferentes citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Deng *et al.*, 2015; Gneccchi *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2015). Uno de los componentes del secretoma de las células madre mesenquimales con potencial terapéutico y mayor interés en investigación son las vesículas extracelulares.

2.7.2 Ventajas de la utilización de EVs de MSCs frente a MSCs.

Las vesículas extracelulares liberadas por las células madre mesenquimales pueden recapitular los efectos beneficiosos de las MSCs parentales, suponiendo una alternativa prometedora a la terapia celular (Bagno *et al.*, 2018; Lou *et al.*, 2017). Las EVs derivadas de MSCs transportan proteínas bioactivas, microARNs y lípidos funcionales, actuando como mediadores entre las MSCs y las células diana (Heldring *et al.*, 2015). Además, presentan diferentes ventajas para su aplicación en clínica en comparación con la terapia celular:

- Perfil de seguridad. Mientras que el trasplante de células madre mesenquimales puede producir rechazo por parte del sistema inmune del huésped (Badillo *et al.*, 2007; Poncelet *et al.*, 2007), las vesículas extracelulares derivadas de las MSCs presentan menor inmunogenicidad (Ankrum *et al.*, 2014; Liew *et al.*, 2017).

Por otra parte, el trasplante de células madre mesenquimales conlleva el riesgo de que las células se diferencien de una manera no deseada, con la posibilidad de transformarse en células malignas y formar tumores (Volarevic *et al.*, 2018). Las EVs, al carecer de capacidad autoreplicativa, no tienen el potencial de dar lugar a tumores.

- **Tejidos diana.** En comparación con las células madre mesenquimales, que tienen un tamaño relativamente grande (30-60 μm de diámetro), el pequeño tamaño de las vesículas extracelulares les permite migrar de forma más eficiente a los órganos o tejidos diana, sin quedar atrapados, por ejemplo, en la microvasculatura pulmonar, como sucede habitualmente con las MSCs (Liew *et al.*, 2017; Börger *et al.*, 2017). Por otra parte, las EVs derivadas de MSCs expresan varias moléculas de adhesión en su superficie (CD29, CD44 y CD73) que favorecen su captación en tejidos dañados y/o inflamados (Harell *et al.*, 2019). Por ejemplo, en un modelo murino de insuficiencia renal aguda, se vio que las MSC-EVs se acumulaban principalmente en los riñones (Grange *et al.*, 2014), mientras que un modelo de hemorragia intracerebral, las MSC-EVs inyectadas se detectaban en el cerebro (Otero-Ortega *et al.*, 2018). Otro aspecto positivo a tener en cuenta en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o que cursen con neuroinflamación es que las EVs, a diferencia de las MSCs de origen, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica mediante transcitosis y ejercer efectos directos en el cerebro (Chen *et al.*, 2016; Otero-Ortega *et al.*, 2018).
- **Versatilidad.** Una ventaja de las EVs es que admiten múltiples modificaciones para incrementar su potencial terapéutico. Una estrategia es enriquecerlas en un microARN o proteína que tenga un efecto beneficioso. Por ejemplo, en un ensayo clínico que se encuentra en Fase II se está investigando el efecto de MSC-EVs enriquecidas con el miR-124 sobre el remodelado neurovascular y la recuperación funcional tras un infarto isquémico agudo (ClinicalTrials.gov: NCT03384433). Otra estrategia es modificar proteínas de membrana en la superficie de la vesícula para aumentar su especificidad por determinados tejidos diana. Álvarez-Erviti *et al.* (2011) modificaron el extremo N-terminal de la glicoproteína de membrana Lamp2B añadiéndole la glicoproteína RVG, la cual se une de forma específica al receptor de acetilcolina, abundante en las neuronas. Álvarez-Erviti *et al.* (2011) transfectaron células dendríticas con la proteína Lamp2B fusionada a la RVG, de manera que las vesículas producidas por estas células expresaran RVG en la membrana. Además, incorporaron un ARN de silenciamiento de la proteasa BACE1, que juega un papel esencial en la enfermedad de Alzheimer rompiendo la proteína precursora del amiloide, en las vesículas. A continuación, comprobaron que las EVs modificadas se dirigían específicamente a las neuronas de ratones control, en comparación con EVs no modificadas, y que eran capaces de transferir el ARN de silenciamiento, reduciendo la expresión del ARNm de la proteasa BACE1 (Álvarez-Erviti *et al.*, 2011)

2.7.3 MSC-EVs como terapia en patologías inflamatorias y neuroinflamatorias. Mecanismos implicados.

La terapia con vesículas extracelulares derivadas de células madre mesenquimales (MSC-EVs) es una estrategia prometedora para el tratamiento de diferentes patologías, especialmente aquellas con un componente inflamatorio, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal (Kim *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2017), la artritis (Augello *et al.*, 2007), la sepsis (Németh *et al.*, 2009), la diabetes de tipo I (Lee *et al.*, 2006) o la esclerosis múltiple (Zappia *et al.*, 2005; Li, Liu *et al.*, 2019; Riazifar *et al.*, 2019).

Reza-Zaldivar *et al.* (2019) observaron que las EVs derivadas de MSCs aumentaban la neurogénesis y restauraban la función cognitiva en un modelo murino de Alzheimer establecido por inyección de agregados de beta amiloide 1-42 en el giro dentado.

Se ha visto que la administración intravenosa de MSC-EVs aumenta la neurogénesis, el remodelado neuronal y la angiogénesis, mejorando la recuperación funcional de los animales en un modelo de infarto (Xin *et al.*, 2013). También se han observado resultados similares en un modelo de traumatismo cerebral, en los que la inyección de MSC-EVs redujo la inflamación y mejoró la función cognitiva y motora, restaurando la capacidad de aprendizaje espacial medida en el laberinto acuático de Morris, mejorando las puntuaciones obtenidas en la Escala Modificada de Severidad Neurológica (mNSS, por sus siglas en inglés) y revirtiendo los déficits sensoriales y motores medidos en el *Foot Fault Test* (Zhang *et al.*, 2015).

También se han observado efectos beneficiosos de las MSC-EVs en fibrosis. Li *et al.* (2013) mostraron que la inyección de MSC-EVs en ratones con fibrosis hepática inducida por CCl₄ reducía la infiltración de células inflamatorias en el hígado, la apoptosis de hepatocitos y el daño en los lóbulos hepáticos. En este estudio se vio que el tratamiento con MSC-EVs reducía los niveles de ácido hialurónico y de aspartato aminotransferasa en suero, ambos aumentados en los ratones con fibrosis. Los resultados observados sugieren que las vesículas extracelulares actuarían inhibiendo la transición epitelio-mesenquimal en el hígado, proceso que contribuye a la fibrosis, ya que la inyección de MSC-EVs aumentó los niveles de E-cadherina, característica de células epiteliales, mientras que redujo los niveles de N-cadherina y vimentina, marcadores de tejido mesenquimal (Li *et al.*, 2013). Por otra parte, Ohara *et al.* (2018) evaluaron el potencial terapéutico de las MSC-EVs en un modelo de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en rata, observando que las MSC-EVs reducían la fibrosis hepática, el número de células de Kupffer, la activación de células estrelladas hepáticas y la expresión de factores inflamatorios como TNF α e IL-1 β en el hígado.

Uno de los principales mecanismos por los que las MSC-EVs ejercen su efecto terapéutico es la **polarización de la microglía hacia un estado anti-inflamatorio**. Li *et al.* (2017) evaluaron el efecto de la administración de MSC-EVs en un modelo de traumatismo cerebral en rata, observando una mejoría en la escala de funcionalidad motora BBB (Basso-Beattie-Bresnahan), reconstrucción de la lesión y una reducción del marcador de microglía pro-inflamatoria CD68 en las ratas tratadas con las MSC-EVs. En

este estudio se analizaron los efectos de las MSC-EVs en cultivos de microglía en los que se indujo activación mediante LPS. Los resultados fueron que las MSC-EVs disminuían los niveles de nitritos, TNF α e IL-6, así como el marcador de microglía pro-inflamatoria CD68; mientras que aumentaban los niveles de IL-10 y los marcadores de microglía anti-inflamatoria arginasa 1 y CD206 (Li *et al.*, 2017).

Li, Liu *et al.* (2019) obtuvieron resultados similares en un modelo experimental de encefalitis autoinmune (EAE), en el que el tratamiento con MSC-EVs redujo la inflamación y la desmielinización del sistema nervioso central regulando la polarización de la microglía. La inyección intravenosa de MSC-EVs mejoró la funcionalidad neurológica en las ratas con EAE, reduciendo el marcador de microglía pro-inflamatoria CD68 y aumentando el marcador de microglía anti-inflamatoria CD206 en médula espinal, así como reduciendo los niveles de citocinas pro-inflamatorias (TNF α y IL-12) y aumentando los niveles de citocinas anti-inflamatorias (IL-10 y TGF β) en suero (Li, Liu *et al.*, 2019). Estos efectos en la polarización de la microglía también se corroboraron *in vitro* en cultivos de microglía activada con LPS.

Yang *et al.* (2019) evaluaron el papel del microARN 124 contenido en MSC-EVs en la polarización de la microglía hacia un estado anti-inflamatorio en un modelo de traumatismo cerebral en rata. En primer lugar, comprobaron que la administración intravenosa de EVs derivadas de MSCs enriquecidas en el miR-124 promovía la polarización de la microglía hacia un estado anti-inflamatorio en hipocampo, disminuyendo la expresión del marcador de microglía inflamatoria CD32 y los niveles de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF α) y aumentando los niveles de expresión de los marcadores de microglía anti-inflamatoria CD206 y arginasa 1, así como los niveles de citocinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-10 y TGF β). Además, el tratamiento con MSC-EVs enriquecidas en el miR-124 aumentó la neurogénesis en hipocampo y restauró la función neurológica en ratas con traumatismo cerebral, evaluada en el laberinto acuático de Morris y la escala de severidad neurológica (Yang *et al.*, 2019). Estudios previos muestran que el miR-124 promueve la polarización de la microglía mediante la vía de señalización del receptor Toll-like 4 (TLR4) (Yao *et al.*, 2017; Periyasamy *et al.*, 2018), por lo que se investigó si el miR-124 contenido en las MSC-EVs estaba actuando a través de esta vía. Tras la unión de su ligando (como el LPS), los receptores TLR4 pueden desencadenar cascadas de señalización intracelulares dependientes o independientes de la proteína MyD88. La vía dependiente de MyD88 implica el reclutamiento del factor TRAF6 y las quinasas IRAKs, que a su vez resultan en la activación de la quinasa TAK1. TAK1 fosforila el complejo IKK β , favoreciendo la activación y la traslocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B, que induce la transcripción de genes pro-inflamatorios como IL-1 β , IL-6, IL-18 y TNF α . Yang *et al.* (2019) comprobaron que el tratamiento con las MSC-EVs enriquecidas en el miR-124 reducía la expresión de TLR4, MyD88, IRAK1, TRAF6 y la subunidad p65 del factor NF- κ B tanto en el hipocampo de ratas con traumatismo cerebral como en cultivos de microglía estimulada con LPS, sugiriendo por tanto que el miR-124 contenido en las

vesículas extracelulares derivadas de MSCs promueve la polarización de la microglía inhibiendo la vía del TLR4.

No obstante, el miR-124 no es el único que se ha relacionado con la polarización de la microglía. Jiang *et al.* (2018) mostraron que las EVs derivadas de MSCs de tejido adiposo reducían el área de la lesión, suprimiendo la autofagia y promoviendo la polarización de la microglía hacia un estado anti-inflamatorio, en un modelo de infarto por oclusión de la arteria cerebral central en ratón, y que las EVs enriquecidas en el miR-30d-5p tenían un mayor efecto anti-inflamatorio.

Otro mecanismo de acción de las MSC-EVs observado en diferentes estudios es la **regulación del equilibrio entre linfocitos T CD4⁺ Th17 y Treg**, disminuyendo la proporción de los Th17, de carácter pro-inflamatorio, y favoreciendo los Treg, que presentan propiedades inmunosupresoras y anti-inflamatorias. Riazifar *et al.* (2019) mostraron que las EVs derivadas de MSCs activadas con IFN γ reducían la inflamación, la desmielinización y la infiltración de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en médula espinal en un modelo experimental de encefalomiелitis autoinmune (EAE) en ratón. Las MSC-EVs suprimían la proliferación de linfocitos Th1 y Th17 (ambos pro-inflamatorios) e inducían la proliferación de Treg tanto en la médula espinal de las ratas tratadas como en cultivos *in vitro* (Riazifar *et al.*, 2019).

Li, Wang *et al.* (2019) observaron que las vesículas extracelulares derivadas de MSCs revertían el aumento de la ratio Th17/Treg en un modelo de anemia aplásica. En cuanto a los mecanismos por los que se producía este efecto, los resultados del estudio indican que las MSC-EVs promueven la diferenciación de los T CD4⁺ hacia Treg mediante la interacción de la esfingosina 1 fosfato (S1P), enriquecida en las vesículas, con el receptor 1 de la esfingosina 1 fosfato (S1PR1) en los linfocitos (Li, Wang *et al.*, 2019).

Por otra parte, Xie *et al.* (2019) identificaron el miR-1246 como necesario para reducir la ratio Th17/Treg en un modelo de isquemia hepática. En este estudio observaron que las MSC-EVs reducían la ratio Th17/Treg tanto *in vivo* como *in vitro*, favoreciendo la secreción de citocinas anti-inflamatorias como el TGF β y la IL-10, y que estos efectos no se producían si se inhibía el miR-1246. Según los resultados de los experimentos *in vitro*, Xie *et al.* (2019) proponen que el miR-1246 actúa inhibiendo la glucoproteína 130, la cual pertenece a la familia de receptores de la IL-6, disminuyendo la fosforilación (y, por tanto, la actividad) de STAT3, un factor de transcripción esencial para la diferenciación de los linfocitos a Th17.

De entre las moléculas que componen el secretoma de las MSCs, cabe destacar el **papel del TGF β** , que regula una gran variedad de procesos y funciones celulares (Eleuteri y Fierabracci, 2019). El TGF β causa arresto del ciclo celular en fase G1 mediante señalización dependiente de las proteínas Smad (Yellen *et al.*, 2013) e induce apoptosis a través de la activación de la señalización por la MAP quinasa p38 (Ferrari *et al.*, 2012). Además, es esencial en la regulación del sistema inmune: los linfocitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺) son potentes supresores de la respuesta inmune, que mantienen la homeóstasis y promueven la tolerancia inmunológica (Facciabene *et al.*, 2012). Estudios

previos indican el TGF β promueve la expresión del gen *Foxp3* y la producción de linfocitos T reguladores (Saini *et al.*, 2014). Además, el TGF β inhibe la activación de linfocitos y fagocitos derivados de monocitos (den Hartog *et al.*, 2013).

El TGF β , dados sus efectos pleiotrópicos, podría actuar tanto a nivel de sistema inmune periférico como en el cerebro. Varios estudios sugieren que el TGF β induce polarización de la microglía hacia un estado anti-inflamatorio. Por ejemplo, Zhou *et al.* (2012) observaron que el TGF β induce la activación alternativa de la microglía (estado anti-inflamatorio), aumentando la expresión de YM1, arginasa 1 y el receptor de la IL-4. Este proceso estaba mediado por la fosforilación de Smad2 y se inhibía si se bloqueaba el receptor de TGF β . Spittau *et al.* (2013) también proponen que el TGF β endógeno promueve un estado quiescente de la microglía, evitando la sobreexpresión de los marcadores pro-inflamatorios iNOS e IL-6. Islam *et al.* (2018) muestran que el TGF β ejerce efectos anti-inflamatorios sostenidos en la microglía: en la microglía estimulada con LPS se induce la fosforilación de la quinasa IKK, que a su vez se activa y fosforila I κ B α , liberando la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B y permitiendo su traslocación al núcleo, que conduce a la producción de factores pro-inflamatorios. Sin embargo, en la microglía tratada con TGF β se prevenían estos efectos, sugiriendo que uno de los mecanismos de acción del TGF β es la inhibición del factor NF- κ B. Los hallazgos de Noh *et al.* (2016) apoyan esta hipótesis. En este estudio, se estimularon cultivos de microglía con LPS, con lo que aumentaron los niveles de, IL-6, IL-1 β , iNOS y nitratos. Este aumento se revertía si la microglía se trataba con medio de cultivo procedente de MSCs. Además, también se normalizaban los marcadores de microglía pro-inflamatoria (CD86) y antiinflamatoria (CX3CR1, CD206, CD200R). En este artículo se destaca el papel de TGF β , incidiendo en su capacidad de inhibir la vía de NF- κ B (reduciendo la fosforilación de I κ B α) y de normalizar los niveles de CX3CR1 en microglía. Chen *et al.* (2002) también mostraron que el TGF β aumentaba la expresión del receptor CX3CR1 en microglía de rata. CX3CR1, el receptor de la fractalquina, se expresa principalmente en microglía y, aunque su papel principal está relacionado con la quimiotaxis, también se ha propuesto su importancia en la neuroprotección. Los datos aportados por el estudio de Cardona *et al.* (2006) muestran que la fractalquina controla el grado de activación de la microglía atenuando la producción de IL-1 β y que actúa como una molécula antiinflamatoria *in vitro*, disminuyendo la producción de IL-6, TNF α e iNOS en microglía estimulada con LPS.

En cuanto a los efectos del TGF β contenido en las vesículas de MSCs sobre el sistema inmune, el principal mecanismo parece ser la regulación del balance entre linfocitos Th1/Th2/Th17/Treg. En un modelo de lupus eritematoso en ratón, el tratamiento con células madre mesenquimales redujo la proporción de linfocitos Th17 en bazo y los niveles de IL-17 en suero y estos efectos se atribuyeron al TGF β , la IL-10 y la PGE2 secretados por las MSCs (Yuan *et al.*, 2016). En un modelo de miastenia grave autoinmune en rata se vio que las MSC inhibían la proliferación de linfocitos T y B *in vitro* y que esto se prevenía si se añadía un anticuerpo contra TGF β (Kong *et al.*, 2009). En este mismo estudio, se co-cultivaron MSCs y linfocitos T y se observó que las MSC

promovían la diferenciación de los linfocitos hacia las subpoblaciones Th2 y Treg frente a las Th1 y Th17, en un proceso que de nuevo era dependiente de TGF β . Los resultados obtenidos *in vivo* reproducían estos efectos y además mejoraban la funcionalidad neurológica. En un ensayo clínico llevado a cabo por Wang *et al.* en 2017 (código NCT01741857) se evaluó la regulación del balance Treg/Th17 por células madre mesenquimales en pacientes con lupus eritematoso sistémico. En este ensayo se vio que las MSCs aumentaban la proporción de Treg y reducían la de Th17 tanto en pacientes como en cultivos de PBMCs. Al bloquear el TGF β *in vitro* se inhibía el aumento de Treg favorecido por las MSCs, aunque la proporción de Th17 no se veía afectada y parecía depender más bien de la PGE2, lo que sugiere que el TGF β actuaría concretamente sobre los linfocitos T reguladores.

A pesar de que existen evidencias crecientes del potencial terapéutico de las vesículas extracelulares derivadas de células madre mesenquimales, es necesario seguir investigando sobre sus mecanismos de acción para comprender cómo se pueden aplicar al tratamiento de cada patología y poder avanzar hacia la traslación en clínica.

En esta tesis se ha evaluado el efecto terapéutico de EVs derivadas de células madre en un modelo de hiperamonemia crónica en rata, con el fin de investigar su potencial como tratamiento para pacientes con encefalopatía hepática.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La encefalopatía hepática es un síndrome neuropsiquiátrico complejo presente en pacientes con enfermedad hepática. La hiperamonemia y la inflamación actúan sinérgicamente para inducir la encefalopatía hepática, induciendo neuroinflamación y causando déficits cognitivos e incoordinación motora. Las ratas con hiperamonemia crónica reproducen los déficits cognitivos y motores que presentan los pacientes con encefalopatía hepática. Los mecanismos por los que las alteraciones periféricas (hiperamonemia e inflamación) se transmiten al cerebro para inducir neuroinflamación y los déficits cognitivos y motores no se conocen en detalle.

Estudios recientes muestran que las vesículas extracelulares (EVs) juegan un papel clave en la comunicación intercelular, estando implicadas en procesos inflamatorios e inmunológicos. Además, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que suponen un mecanismo relevante de comunicación entre la periferia y el cerebro.

Hipótesis 1. Los datos anteriores nos llevan a plantear la hipótesis de que las vesículas extracelulares contribuyen a la patogénesis de la hiperamonemia y la encefalopatía hepática, siendo capaces de transmitir los efectos sistémicos de la hiperamonemia y de la inflamación periférica al cerebro. Esta hipótesis se puede desglosar en los siguientes puntos:

- **1.1.** La hiperamonemia puede modificar el contenido y/o la cantidad de vesículas extracelulares circulantes en plasma.
- **1.2.** Estas vesículas extracelulares procedentes de plasma de ratas hiperamonémicas portan los componentes suficientes para inducir neuroinflamación en cerebro y alterar la neurotransmisión.
- **1.3.** Las EVs de plasma de ratas hiperamonémicas pueden producir deterioro cognitivo y motor en ratas control.

Por otra parte, diversos estudios señalan el potencial terapéutico de las vesículas extracelulares aisladas de células madre mesenquimales (MSCs), especialmente en patologías que cursan con inflamación.

Hipótesis 2. Nuestra hipótesis es que el tratamiento con EVs de células madre mesenquimales puede ser útil para revertir la neuroinflamación y las alteraciones cognitivas y motoras en hiperamonemia y en encefalopatía hepática. Esta segunda hipótesis se puede dividir en:

- **2.1.** El tratamiento con vesículas extracelulares derivadas de MSCs puede revertir la neuroinflamación en ratas hiperamonémicas.
- **2.2.** La administración de EVs derivadas de MSCs es capaz de normalizar la función cognitiva y motora en ratas hiperamonémicas.

OBJETIVOS

Respecto a la primera hipótesis, esta tesis tiene el objetivo de investigar si las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas juegan un papel en la transmisión de los efectos deletéreos al cerebro que acaban produciendo deterioro cognitivo. Para ello, se abordan los siguientes objetivos concretos:

- **1.1.** Averiguar si la hiperamonemia crónica en ratas altera el contenido y/o la cantidad de las vesículas extracelulares en plasma.
- **1.2.** Analizar si las vesículas extracelulares aisladas de plasma de ratas hiperamonémicas inducen neuroinflamación en cerebelo e hipocampo al ser inyectadas a ratas control.
- **1.3.** Evaluar si las vesículas extracelulares de plasma de ratas hiperamonémicas causan déficits cognitivos y motores cuando se inyectan a ratas control.
- **1.4.** Analizar los mecanismos moleculares implicados en la inducción de neuroinflamación y deterioro cognitivo y motor en ratas control por vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas.

En relación con la segunda hipótesis, se ha evaluado el posible efecto beneficioso del tratamiento con vesículas extracelulares de MSCs para revertir las alteraciones en neuroinflamación y los déficits cognitivos y motores presentes en ratas hiperamonémicas, centrándose en los siguientes objetivos:

- **2.1.** Estudiar si el tratamiento con EVs de MSCs revierte la neuroinflamación en cerebelo e hipocampo de ratas hiperamonémicas *in vivo*.
- **2.2.** Evaluar si el tratamiento con EVs de MSCs restaura la función cognitiva y motora en ratas hiperamonémicas.
- **2.3.** Investigar los mecanismos moleculares por los que las vesículas de células madre mesenquimales reducen la neuroinflamación y revierten los déficits cognitivos y motores en ratas hiperamonémicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelo animal de hiperamonemia crónica sin fallo hepático.

En esta tesis se han utilizado ratas macho (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar (Charles River Laboratories, España) con hiperamonemia crónica inducida según un procedimiento previamente desarrollado en nuestro laboratorio (Felipo *et al.*, 1988a). Para inducir la hiperamonemia, las ratas fueron alimentadas con una dieta rica en amonio (con un 30 % de acetato amónico), mientras que las ratas control se alimentaron con piensos convencionales. En las ratas hiperamonémicas, los niveles de amonio en sangre se duplican y la concentración de amonio en cerebro, hígado y músculo aumenta un 36, 34 y 50 %, respectivamente, respecto a las ratas control tras 42 días de dieta (Azorín *et al.*, 1989). La excreción de amonio también es mayor: los niveles de urea en sangre (≈ 16 mM) y la eliminación de urea (25 mM al día) se duplican respecto a los animales control (Azorín *et al.*, 1989).

Las ratas se estabularon en las siguientes condiciones: ciclos de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, $23 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, humedad del $55 \pm 5\%$ y comida y agua *ad libitum*. Todos los experimentos y procedimientos fueron aprobados previamente por el Comité de Experimentación y Bienestar Animal (CEBA) del centro y por la Generalitat Valenciana y se llevaron a cabo de acuerdo con lo recogido en la Directiva 2010/63/UE de la Comisión Europea relativa al cuidado y manejo de animales de experimentación.

2. Diseño experimental.

2.1 Aproximación *in vivo*: estudio de los efectos.

2.1.1 Diseño experimental 1: estudio del efecto de la inyección de vesículas extracelulares de ratas con hiperamonemia crónica a ratas control.

Nuestra hipótesis es que las vesículas extracelulares (EVs) podrían estar jugando un papel en la transmisión de los efectos de la hiperamonemia y de la inflamación periférica al cerebro, induciendo neuroinflamación y contribuyendo, por tanto, a la patogénesis de la encefalopatía hepática. Para investigar los efectos de las vesículas extracelulares de las ratas con hiperamonemia, diseñamos el siguiente experimento *in vivo*, resumido en la Figura 8.

Las ratas control se distribuyeron en los siguientes grupos ($n = 22$ por grupo): ratas inyectadas con tampón fosfato salino como vehículo (PBS), ratas inyectadas con vesículas extracelulares aisladas de plasma de ratas control (C-EVs) y ratas inyectadas con vesículas extracelulares aisladas de plasma de ratas hiperamonémicas (HA-EVs).

A los dos meses de edad, las ratas se inyectaron por vía intravenosa (vena de la cola) con $50 \mu\text{g}$ de EVs o de PBS, según el grupo. La inyección se repitió una semana después. Para evaluar las alteraciones cognitivas y motoras, se realizaron los siguientes test entre los días 9 y 16 tras la primera inyección: beam walking, laberinto en Y y test de memoria de

localización y reconocimiento de objetos (descritos en el apartado *Evaluación de las alteraciones cognitivas y motoras*). Las ratas se sacrificaron al día 17 tras la primera inyección para la extracción de áreas cerebrales (hipocampo y cerebelo), con el fin de estudiar marcadores de neuroinflamación en estas áreas.

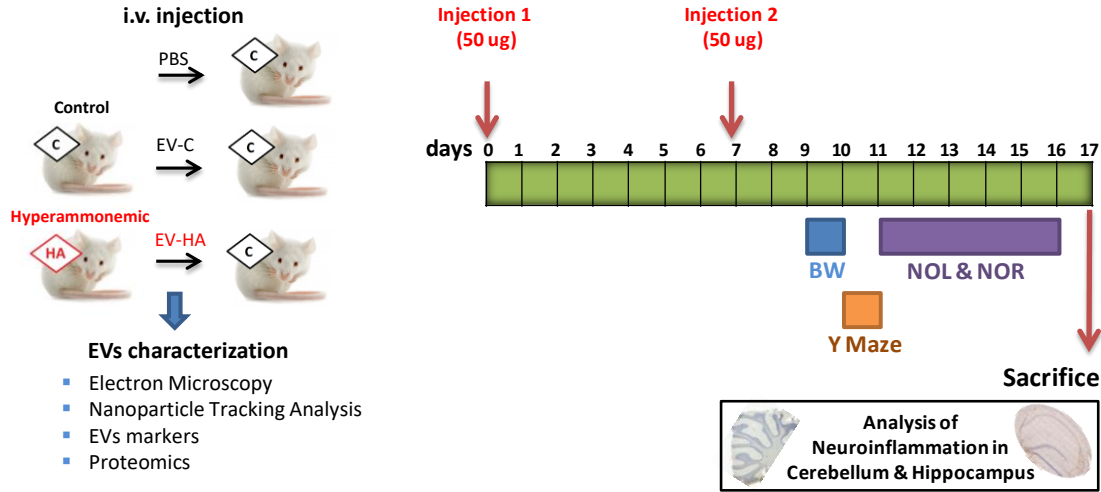


Figura 8. Resumen del diseño experimental para estudiar el efecto del tratamiento con vesículas extracelulares de ratas con hiperamonemia crónica a ratas control.

2.1.2 Diseño experimental 2: estudio del efecto de la inyección de vesículas extracelulares de células madre mesenquimales en ratas con hiperamonemia crónica

El segundo objetivo principal de esta tesis es evaluar el posible efecto beneficioso del tratamiento con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales (MSCs) para revertir las alteraciones en neuroinflamación y los déficits cognitivos y motores presentes en ratas hiperamonémicas.

Las ratas se distribuyeron en cuatro grupos (n = 18 ratas por grupo): ratas control inyectadas con tampón fosfato salino como vehículo (C+PBS), ratas control inyectadas con vesículas extracelulares derivadas de MSCs (C+EVs), ratas hiperamonémicas inyectadas con PBS (HA+PBS) y ratas hiperamonémicas tratadas con vesículas extracelulares de MSCs (HA+EVs).

El diseño experimental se muestra en la Figura 9. Tras 2 semanas de hiperamonemia, las ratas se inyectaron por vía intravenosa en la vena de la cola con 50 µg de EVs de MSCs diluidos en 300 µL de PBS, o con el volumen equivalente de PBS en el caso de los grupos con vehículo. La inyección se repitió una semana después. Los test de comportamiento se realizaron entre los 10-20 días tras la primera inyección en el siguiente orden: laberinto en Y, memoria de localización de objetos y memoria de reconocimiento de objetos, laberinto radial y beam walking. Las ratas se sacrificaron a los 25 días tras la primera inyección para la extracción del cerebro y su análisis posterior.

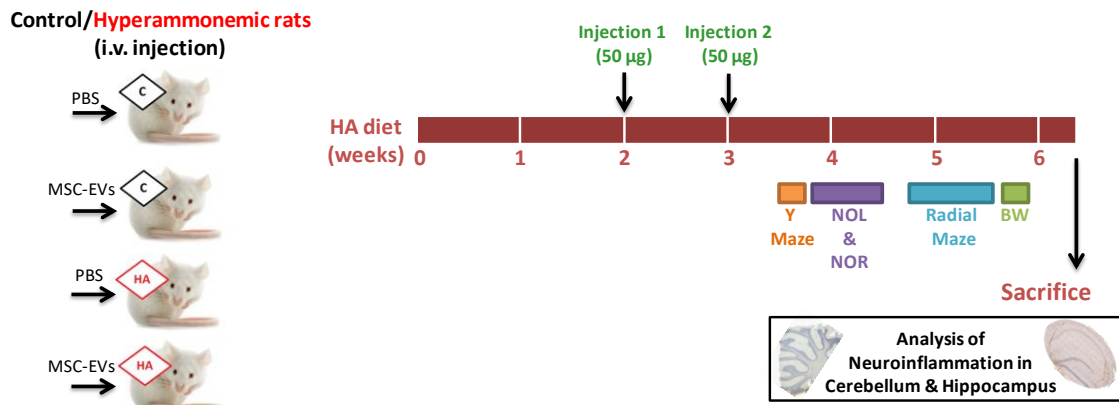


Figura 9. Resumen del diseño experimental para estudiar el efecto del tratamiento con vesículas extracelulares en ratas con hiperamonemia crónica.

2.2 Aproximación *ex vivo*: estudio de mecanismos.

Una vez comprobados los efectos *in vivo* producidos tanto por las vesículas procedentes de ratas hiperamonémicas al inyectarlas en ratas control como por las EVs derivadas de células madre mesenquimales en ratas hiperamonémicas, el siguiente objetivo fue investigar los mecanismos moleculares por los que las EVs eran capaces de inducir estos efectos. Para tal fin, se decidió emplear un sistema *ex vivo*, en el que el tejido de interés (hipocampo y cerebelo, en este caso) se extrae del animal, se corta en rodajas y se mantiene vivo para su análisis a corto plazo. Una de las ventajas principales de este sistema frente a la aproximación *in vivo* es que permite estudiar más en detalle los mecanismos moleculares, al tiempo que reduce el número de animales de experimentación necesarios. Por ejemplo, *ex vivo* se pueden añadir distintos antagonistas para bloquear receptores específicos para evaluar si están alterados en nuestro modelo o con el tratamiento de interés. Además, al cortar el tejido en rodajas, podemos evaluar el efecto de distintos tratamientos sobre diferentes rodajas del mismo animal, utilizando así menos animales que con el abordaje *in vivo*, y eliminando parte de la variabilidad interindividual, ya que, para un mismo animal, podemos evaluar su condición basal (sin añadir ningún tratamiento) y los efectos que producen los distintos tratamientos sobre ese tejido. Por otra parte, se decidió utilizar este sistema *ex vivo* en lugar de un modelo *in vitro* porque, al trabajar con las rodajas, se mantiene la estructura del tejido y las interacciones entre distintos tipos celulares, reproduciendo de forma más precisa lo que ocurre en el cerebro del animal. Además, este sistema se ha utilizado ampliamente en nuestro laboratorio, demostrando que reproduce la mayoría de las alteraciones observadas *in vivo* y que es útil para investigar el modelo de hiperamonemia.

Para los experimentos *ex vivo*, se emplearon ratas control y ratas hiperamonémicas tras 4-5 semanas de dieta (10-11 semanas de edad). Cada día de experimento se utilizaron 4 ratas (2 controles y 2 hiperamonémicas), hasta un total de 30 animales de cada grupo (C o HA). Los animales se sacrificaron por decapitación, se extrajo el cerebro y se diseccionaron las áreas de interés (hipocampo y cerebelo). Este procedimiento se realizó con rapidez y sobre una placa Petri enfriada en hielo para evitar al máximo la muerte del

tejido. Tras extraer las áreas cerebrales, estas se sumergieron en tampón Krebs (NaCl 119 mM, NaHCO₃ 26.2 mM, glucosa 11 mM, KCl 2.5 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KH₂PO₄ 1 mM), previamente burbujeado con carbógeno (O₂ 95 % y CO₂ 5 %) y se mantuvieron en hielo para mantener el tejido oxigenado y reducir la necrosis.

A continuación, las áreas cerebrales se cortaron transversalmente en rodajas de 400 µm: el hipocampo se cortó mediante un *chopper* manual (*Tissue Slicer*, Stoelting) (Fig. 10A) y el cerebelo se cortó mediante un vibratomo VT1000 S (Leica Biosystems) (Fig. 10B). En ambos casos, los cortes se transfirieron a los pocillos del sistema de perfusión mostrado en la Figura 10C (Campden Instruments, Modelo 745), colocando unos 12-15 cortes de hipocampo o 4-6 cortes de cerebelo en cada pocillo. Este sistema permite mantener los cortes en una solución burbujeada continuamente con carbógeno y a una temperatura estable de 35.5°C. En primer lugar, los cortes se incubaron durante 15 min en solución Krebs para estabilizar su metabolismo y recuperar su función normal. Tras este tiempo, los cortes se incubaron durante 30 min en los diferentes tratamientos, utilizando siempre el tampón Krebs burbujeado con carbógeno como solvente para mantener el pH y el aporte de sales necesario para el correcto funcionamiento tisular.

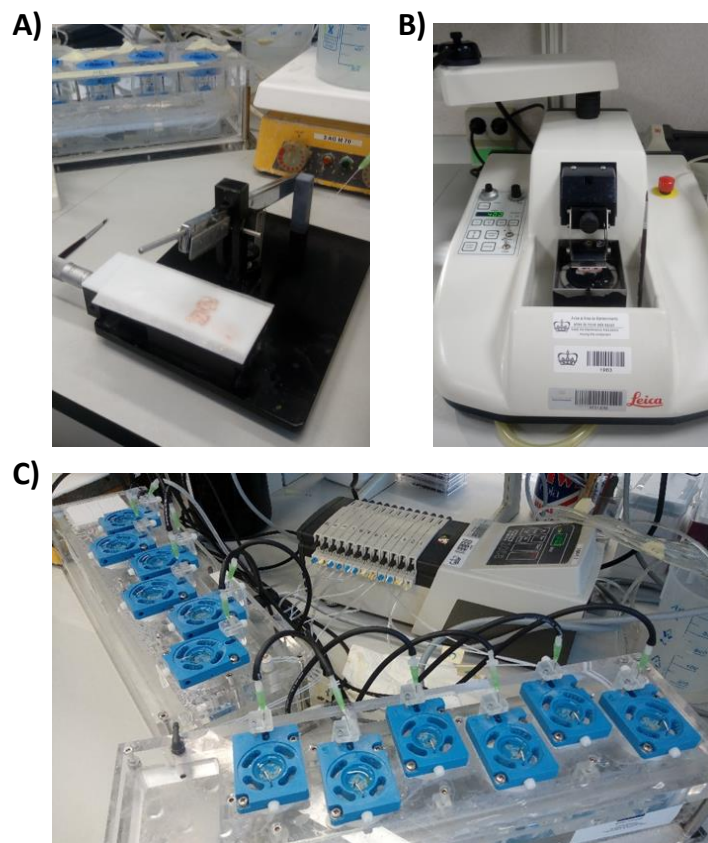


Figura 10. A) Imagen del *chopper* manual empleado para obtener las rodajas de hipocampo, B) imagen del vibratomo empleado para obtener las rodajas de cerebelo y C) sistema de perfusión empleado para la incubación de los cortes.

A continuación, se describen los tratamientos con los que se incubaron los cortes en el sistema *ex vivo*.

Cortes de ratas control

En estos cortes se evaluó el efecto de las vesículas de ratas hiperamonémicas, investigando el papel del TNF α .

- C = condición basal sin tratamiento, solo con tampón Krebs.
- C+HA-EVs = cortes incubados con 10 $\mu\text{g/mL}$ de vesículas procedentes de ratas hiperamonémicas.
- C+HA-EVs+Inflix = cortes incubados con vesículas de HA pretratadas con infliximab. Para ello, se prepararon 10 $\mu\text{g/mL}$ de vesículas incubadas previamente con 10 $\mu\text{g/mL}$ de infliximab (Remicade, Merck Sharp & Dohme), un anticuerpo monoclonal que bloquea el TNF α .
- C+HAInflix-EVs = cortes incubados con vesículas procedentes de ratas HA a las que se les administró infliximab *in vivo* durante 1 mes, inyectando una dosis de 5 mg/kg por semana.
- C+Inflix = cortes incubados con 10 $\mu\text{g/mL}$ de infliximab (sin vesículas). Esta condición se incluyó como control negativo a fin de comprobar que el infliximab por sí solo no produce efectos significativos sobre los cortes control.
- C+rec TNF α = cortes incubados con 10 ng/mL de TNF α recombinante de rata (#ab9756, Abcam).

Cortes de ratas hiperamonémicas

En estos cortes se evaluó el efecto de las vesículas derivadas de células madre mesenquimales, investigando el papel del TGF β .

- HA = condición basal sin tratamiento, solo con tampón Krebs.
- HA+EVs = cortes incubados con 10 $\mu\text{g/mL}$ vesículas de células madres mesenquimales.
- HA+EVs+anti-TGF β = cortes incubados con 10 $\mu\text{g/mL}$ de vesículas derivadas de MSCs previamente tratadas con 1.2 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo anti-TGF β (#ab205604, Abcam).
- HA+EVs lacking TGF β = cortes incubados con 10 $\mu\text{g/mL}$ de vesículas derivadas de MSCs en las que se ha silenciado la expresión de TGF β .
- HA+anti-TGF β = cortes incubados con 1.2 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo anti-TGF β (#ab205604, Abcam)
- HA+EVs+anti-TGF β R = cortes incubados con 1 ng/mL de TGF β recombinante humano (#130-095-067, Milteny Biotec). En este caso se añadió TGF β humano y no de rata debido a que las MSC proceden de tejido humano.

Todos los tratamientos se incubaron durante 1 hora a 37°C antes de ser añadidos al tejido. Este paso es necesario para la unión del anticuerpo anti-TNF α al TNF α de las vesículas

de HA (condición C HA-EVs+I) y del anticuerpo anti-TGF β a las vesículas de MSCs (condición HA MSC+T) y se decidió aplicarlo a todos los tratamientos por igual para trabajar en unas condiciones uniformes.

Tras la incubación de los cortes con los distintos tratamientos, el tejido se procesó para su análisis mediante inmunohistoquímica/inmunofluorescencia e inmunoblot (tanto para cuantificar contenido de proteínas como la expresión en membrana de ciertos receptores). Estas metodologías se detallarán en apartados posteriores.

3. Aislamiento de vesículas extracelulares.

3.1 Extracción de plasma para la obtención de vesículas extracelulares.

El plasma se extrajo de ratas alimentadas con una dieta rica en amonio durante 5 semanas y de ratas control de la misma edad. Para ello, las ratas fueron sacrificadas por decapitación y se recogió la sangre del cuello en tubos con 7.5 mM de EDTA como anticoagulante. La sangre se centrifugó a 3.000 g durante 10 min a temperatura ambiente para separar el plasma, que se conservó congelado a -80°C hasta el procedimiento de aislamiento de vesículas extracelulares.

Para el aislamiento de EVs también se utilizó plasma congelado de un estudio previo del grupo (Balzano *et al.*, 2020b), en el que se trataron ratas control e hiperamonémicas con infliximab (anticuerpo anti-TNF α). Este estudio incluía cuatro grupos experimentales: 1) ratas control sin tratamiento, 2) ratas control tratadas con infliximab, 3) ratas hiperamonémicas sin tratamiento y 4) ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab. El infliximab (Remicade, Merck) se administró por vía intravenosa (5 mg/kg) en la vena de la cola una vez por semana. El tratamiento se inició un día antes de comenzar la dieta rica en amonio y se mantuvo durante 4 semanas hasta el sacrificio de los animales.

3.2 Aislamiento de vesículas extracelulares de plasma.

Para cada muestra, se partió de un volumen inicial de plasma congelado de 3 mL. Las muestras se descongelaron en hielo, se transfirieron a tubos de 50 mL y se diluyeron hasta un volumen final de 20 mL con tampón fostato salino (PBS: Na₂HPO₄ 0.01 M, NaH₂PO₄*H₂O 2 mM, NaCl 0.09 %, pH = 7.4) filtrado. A continuación, se centrifugaron a 2.000 g durante 20 min a 4°C para retirar restos celulares, debris y cuerpos apoptóticos. Se recogió el sobrenadante de esta centrifugación y se filtró con filtros estériles de 0.22 μ m, transfiriendo el filtrado a tubos de policarbonato 26.3 mL (Beckman Coulter). A continuación, las muestras se centrifugaron a 150.000 g durante la noche (16 horas) a 4°C en una ultracentrífuga Optima L-100XP con el rotor de ángulo fijo 70 Ti (Beckman Coulter). Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante por aspiración, se resuspendió el pellet obtenido y se enrasó a un volumen final de 20 mL. Se realizaron dos centrifugaciones adicionales para lavar el pellet de proteínas contaminantes: una a 150.000 g durante 2 horas y otra a 110.000 g durante 70 min, ambas a 4°C. El pellet final se resuspendió en 100 μ L de PBS estéril. Se destinaron 6 μ L para cuantificar la proteína

de las muestras mediante ensayo colorimétrico con ácido bicinonínico (BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, EEUU) y el resto de la muestra se congeló a -80°C para su almacenamiento.

3.3 Aislamiento de vesículas extracelulares de células madre mesenquimales.

Se partió de células madre mesenquimales (MSCs) derivadas de tejido adiposo humano (HistoCell Ltd, España), obtenidas a partir de la grasa subcutánea como se ha descrito previamente (Castro *et al.*, 2019). Las células fueron cultivadas y expandidas en medio de crecimiento [Medio DMEM enriquecido en glucosa y suplementado con un 20 % de suero bovino fetal (FBS) (previamente centrifugado a 100.000 g durante 1 hora y filtrado con filtros de 0.2 µm para la depleción de EVs), 100 uds/mL de penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 2 mM de L-glutamina. Las células subconfluentes fueron incubadas en medio de crecimiento durante 48 h. A continuación, se recogió el medio y se procedió a eliminar restos celulares mediante centrifugaciones sucesivas de 10 min, a 300 g y a 2000 g, respectivamente. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 10.000 g durante 30 min para eliminar cuerpos apoptóticos. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 100.000 g durante 1 h y el pellet de esta centrifugación se resuspendió en PBS y se centrifugó de nuevo a 100.000 g 1 h para lavar las vesículas. Todas las centrifugaciones se realizaron a 4°C. El pellet final se resuspendió en 100 µL de PBS estéril, se determinó la cantidad de proteína mediante ensayo colorimétrico con ácido bicinonínico (BCA) y las EVs se congelaron a -80°C.

Para evaluar el papel del TGFβ, se prepararon cultivos de MSCs en los que se silenció la expresión de TGFβ y a partir de los cuales se aislaron EVs siguiendo el mismo protocolo que el descrito arriba. Para el silenciamiento, las células se transfectaron con una construcción lentiviral que contiene un vector pLL3.7 (plásmido #11795, Addgene) con la secuencia de un ARN de silenciamiento que se une al transcrito de TGFβ e impide su traducción a proteína.

3.4 Marcaje fluorescente de las vesículas extracelulares.

Durante el protocolo de aislamiento, las vesículas se marcaron fluorescentemente con el compuesto lipofílico Dil (1,1'-Dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato, Sigma). Para ello, los pellets obtenidos tras el paso de centrifugación a 150.000 g durante 2 horas a 4°C se resuspendieron en 1 mL de PBS y se incubaron con Dil a una concentración final de 40 µg/mL durante 15 minutos a temperatura ambiente, en agitación y protegiendo los tubos de la luz. Se añadió 1 mL de PBS con 1% de BSA (albúmina sérica bovina) como se describe en Jiang *et al.* (2018) y se mantuvieron los tubos en agitación durante 10 minutos. A continuación, se añadió PBS hasta un volumen final de 20 mL y se realizaron dos lavados mediante ultracentrifugación a 110.000 g durante 70 minutos a 4°C. Los pellets finales se resuspendieron en 100 µL de PBS, se determinó la cantidad de proteína mediante el método BCA y las vesículas marcadas se conservaron a -80°C hasta su inyección.

3.5 Determinación de la presencia de vesículas extracelulares en cerebro tras su inyección intravenosa.

Para evaluar si las vesículas extracelulares eran capaces de alcanzar el cerebro tras su inyección, se inyectaron ratas control de 5 semanas de edad con 100 µg de vesículas marcadas, tanto EVs aisladas de plasma de ratas hiperamonémicas como EVs derivadas de MSCs (n = 4 ratas en cada caso) por vía intravenosa (inyección en la cola) y se sacrificaron a las 72 h. Para el sacrificio de los animales, éstos fueron anestesiados por inyección intraperitoneal con tiopental 1 mL/kg y perfundidos por vía intracardiaca con suero salino para eliminar la sangre. A continuación, se perfundieron con 500 mL de paraformaldehído al 4 % diluido en tampón fosfato 0.1 M (PB: Na₂HPO₄ 75.4 mM; NaH₂PO₄ 24.6 mM, pH 7.4) para fijar los tejidos. Los cerebros fijados se extrajeron y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido en bloques de compuesto OCT (Optimal Cutting Compound #00411243, VWR Chemicals). A partir de estos bloques, se cortaron secciones de 10 µm en un criostato (Microm HM505E, Leica) y se analizó por inmunofluorescencia la colocalización con marcadores de distintos tipos celulares del cerebro (Iba1 para microglía, GFAP para astrocitos y NeuN para neuronas) y con un marcador de vesículas extracelulares (Alix). Para ello, se realizó la recuperación antigénica y se llevó a cabo la inmunofluorescencia según se describe en el apartado *Inmunofluorescencia*, empleando los anticuerpos recogidos en la Tabla 1 y manteniendo los cortes en oscuridad durante todo el proceso para preservar la fluorescencia tanto del Dil como de los anticuerpos secundarios. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania), utilizando un objetivo de inmersión 63X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N.A.

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para estudiar la presencia de EVs marcadas con fluorescencia en cerebro tras su inyección intravenosa.

Anticuerpo 1°	Dilución 1°	Casa comercial (referencia)	Anticuerpo 2°	Dilución 2°	Casa comercial (referencia)
Alix	1:200	Proteintech (12422-1-AP)	Anti-IgG de conejo-Alexa 488	1:400	Invitrogen (A11034)
Calbindina	1:500	Abcam (ab11426)	Anti-IgG de conejo-Alexa 488	1:400	Invitrogen (A11034)
GFAP	1:400	Sigma (G-3893)	Anti-IgG de ratón-Alexa 488	1:400	Invitrogen (A11001)
Iba1	1:300	Wako (019-19741)	Anti-IgG de conejo-Alexa 488	1:400	Invitrogen (A11034)
NeuN	1:200	Millipore (Mab-377)	Anti-IgG de ratón-Alexa 488	1:400	Invitrogen (A11001)

4. Caracterización de las vesículas extracelulares aisladas.

4.1 Microscopía electrónica de transmisión (MET).

La microscopía electrónica de transmisión permite visualizar las vesículas extracelulares de forma directa tras su fijación, adsorción en rejillas de microscopía y contrastado. Se considera una de las técnicas de referencia para verificar la presencia y evaluar la morfología y el tamaño de las vesículas tras su aislamiento. Para ello, se tomaron alícuotas de 5 μL de vesículas aisladas y se prepararon para su visualización según el protocolo descrito por Théry et al. (2006). En primer lugar, las vesículas se fijaron con una solución al 2% de paraformaldehído en 0.1 M PBS durante 30 min. Se aplicó la técnica de descarga luminiscente o *glow discharge* (60 s, 7,2V, usando un Bal-Tec MED 020 Coating System) sobre rejillas de carbono Formwar para modificar sus propiedades y conferirles un carácter hidrofílico en vez de hidrofóbico. A continuación, se colocaron las rejillas sobre cada muestra durante 15 minutos, durante los cuales las vesículas se adsorben sobre la superficie de la rejilla por atracción electrostática. Las rejillas se lavaron con PB 0.1 M y se realizó un segundo paso de fijación con glutaraldehído al 1 % durante 5 minutos. Posteriormente, se realizaron 8 lavados de 2 min con agua destilada, se contrastaron las muestras incubándolas con acetato de uranilo al 1 % y se embebieron en metilcelulosa. Las muestras se visualizaron en el servicio de microscopía electrónica del Centro de Investigación Príncipe Felipe con un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G2 Spirit (ThermoFisher Scientific company, Oregon, EEUU). Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital Morada (Olympus Soft Image Solutions GmbH, Münster, Alemania).

4.2 Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).

Esta técnica se emplea para calcular la concentración de partículas y el perfil de distribución de su tamaño en una suspensión líquida, basándose en la dispersión de la luz y el movimiento browniano. La muestra líquida conteniendo las partículas en suspensión se carga en una cámara que es iluminada con un rayo láser. Las partículas dispersan la luz del láser y esta dispersión puede detectarse con un microscopio de 20 aumentos acoplado a una cámara digital. La cámara registra archivos de vídeo de las partículas en estado de movimiento browniano. El software de seguimiento de nanopartículas detecta muchas partículas individualmente de forma simultánea y calcula sus diámetros hidrodinámicos mediante la ecuación Stokes-Einstein.

Para estudiar el tamaño y la cantidad de las vesículas aisladas, tanto de plasma de ratas control e hiperamonémicas como de células madre mesenquimales, se utilizó un equipo Nanosight NS300 (Malvern Panalytical, Malvern, Inglaterra) y una dilución 1:100 de las muestras. Se grabaron 5 vídeos de 30 segundos en puntos aleatorios de cada muestra y éstos se analizaron con el software NTA 3.2 Dev Build 3.2.16. En el caso de las EVs aisladas de plasma, los datos de concentración de partículas obtenidos se corrigieron según la dilución y volumen de plasma de partida para expresarlos como número de partículas/mL inicial de plasma.

4.3 Proteómica de vesículas extracelulares de plasma.

Se realizó un estudio de expresión diferencial del contenido proteico de las vesículas extracelulares de plasma de ratas control (C) y ratas hiperamonémicas (HA), con 8 réplicas biológicas por grupo. El análisis de las muestras se realizó en las instalaciones de proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia. Los pasos del proceso fueron los siguientes:

Creación de la librería de espectros. Se tomaron alícuotas de todas las muestras de cada grupo y se mezclaron para crear una librería de espectros de fragmentación (iones peptídicos) a partir de un gel SDS-PAGE.

Digestión de proteínas en gel. La carrera de electroforesis correspondiente a la librería se cortó en 4 fragmentos y se digirió con tripsina (Promega), tal y como se describe en Shevchenko et al (1996). La digestión con tripsina se detuvo con ácido trifluoroacético (TFA) al 10 %, se eliminó el sobrenadante y los fragmentos de la librería se deshidrataron con acetonitrilo puro (ACN) para generar la mezcla de péptidos.

Análisis de proteínas por cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Se cargaron 5 µL de cada una de las mezclas de péptidos ya digeridas en una columna colectora (NanoLC Column, 3µ C18-CL, 75 µm x 15 cm; Eksigen) y se eliminaron las sales con un flujo de 0.1 % TFA a 3µL/min durante 5 min. A continuación, los péptidos se cargaron en una columna analítica (LC Column, 3 µm C18-CL, 75 µm x 12 cm, Nikkyo) equilibrada con 5 % ACN y 0.1 % FA (ácido fórmico). La elución de los péptidos se realizó con un 5-40 % de ACN y 0.1 % FA durante 60 minutos, a un flujo de 300 nl/min. Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI qQTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX).

Identificación de proteínas mediante la herramienta de búsqueda ProteinPilot (versión 5.0, Sciex). Se utilizó el software ProteinPilot para identificar los péptidos, a partir de los datos obtenidos en el TripleTOF. Para identificar las proteínas se realizó una búsqueda en la base de datos Uniprot utilizando el algoritmo Paragon (Shilov *et al.*, 2007) de ProteinPilot, restringido a taxonomía de mamíferos y utilizando el método de corrección de errores FDR (*False Discovery Rate*) para proteínas.

Análisis y cuantificación de proteínas en las muestras individuales. Se cargaron 20 µg de extracto de proteína total de cada una de las 16 muestras en un gel SDS-PAGE. Se procedió a la digestión de las proteínas del gel y al análisis por LC-MS/MS, como se ha descrito anteriormente en la elaboración de la librería. Se identificaron las proteínas en las muestras individuales mediante el programa Peak View 2.1. Los datos de área obtenidos con Peak View se analizaron mediante el software Marker View (Sciex) donde las áreas de cada proteína se normalizaron con la suma total de las áreas de todas las proteínas cuantificadas. Se aplicó un t-test para analizar la expresión diferencial entre las muestras C y las muestras HA. En las proteínas diferencialmente expresadas en HA, se realizó un análisis de distribución categórico utilizando las plataformas Paintomics y Gene Ontology (GO).

4.4 Análisis del contenido proteico de las vesículas mediante inmunoblot.

La técnica de inmunoblot se utilizó para detectar la presencia de marcadores de vesículas extracelulares (Alix, Hsp70, Flotilina-2, CD9), procedentes tanto de plasma de rata como de células madre mesenquimales (MSCs). También se evaluó si existían cambios en la abundancia relativa de estos marcadores y otras proteínas de interés en vesículas aisladas de plasma de ratas hiperamonémicas frente a ratas control: para validar los resultados obtenidos en proteómica se analizaron los niveles de glutamina sintetasa (GS), Timp-3 y las cadenas ligera y pesada de la IgG. Además, se midieron los niveles de TNF α y de su receptor TNFR1 por su implicación con la neuroinflamación y por estar implicados en el deterioro motor presente en ratas hiperamonémicas. Por otra parte, en las vesículas extracelulares derivadas de células madre mesenquimales, se analizó la presencia de TGF β por su papel anti-inflamatorio e inmunosupresor.

En primer lugar, se separaron las proteínas de las muestras en función de su masa molecular mediante electroforesis en geles de poli(acrilamida). Para ello, se prepararon alícuotas de 30 μ g de proteína de las muestras, se diluyeron 1:1 en tampón de carga (65 % Tris-HCl 0.5 M a pH = 6.8, 21 % glicerol, 4 % dodecilsulfato sódico (SDS), 10 % 2-mercaptoetanol, 0.02% bromofenol) y se hirvieron durante 5 minutos a 100°C en un termoblock. A continuación, las muestras se cargaron en geles de poli(acrilamida) al 13 % con SDS, excepto en los geles para TGF β , en los que se empleó una concentración del 15 %. Estos geles constan de dos zonas diferenciadas por su concentración de acrilamida: el *stacking* o parte superior [25 % Tris 0.5 M + 0.4 % SDS con pH = 6.8 ajustado con HCl, 13 % Acrilamida/Bisacrilamida (Panreac), 1 % APS (Merck-Millipore) y 0.2 % TEMED (Sigma)], concentra la muestra antes de que empiecen a separarse las proteínas, mientras que la parte inferior o *separating* (25 % Tris 1.5 M + SDS 0.4 % con pH = 8.8 ajustado con HCl, 13-15 % Acrilamida/Bisacrilamida, 0.33 % APS y 0.07 % TEMED) permite la separación de las proteínas de la muestra en función de su peso molecular. El porcentaje de acrilamida del *separating* se ajustó según la masa molecular de las proteínas a analizar. La electroforesis se realizó a una intensidad de corriente de 25 mA por gel, durante 1-1.5 h y utilizando tampón *running* (Tris Base 25 mM, SDS 3.5 mM, Glicina 0.2 M).

Una vez separadas las proteínas, estas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) previamente hidratada en metanol. La transferencia se realizó a una intensidad de corriente de 250 mA durante 2 horas a 4°C en tampón de transferencia (Tris base 25 mM, Glicina 0.19 M, 20 % metanol). A continuación, las membranas se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 5 % en TBS-*Tween* (NaCl 150 mM, Tris Base 50 mM, 0.1 % Tween-20 pH = 7.5) durante 45 minutos para bloquear uniones inespecíficas.

Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario específico de la proteína a analizar. Los anticuerpos se prepararon diluidos en BSA al 5 % en TBS-*Tween* y la incubación se realizó durante la noche (unas 16 h) a 4°C en agitación suave. Los

anticuerpos primarios utilizados se recogen en la Tabla 2, indicando la dilución empleada para cada uno de ellos.

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para analizar el contenido proteico de las vesículas extracelulares mediante inmunoblot.

Anticuerpo	Dilución	Huésped	Casa comercial	Referencia
Actina	1:5000	Ratón	Abcam	AB6276-100
Alix	1:1000	Conejo	Proteintech	12422-1-AP
Calnexina	1:1000	Conejo	Novus Biologicals	NB1965
CD9	1:1000	Conejo	Sigma	C9993
Flotilina-2	1:500	Conejo	Fisher	PA5-17178
Galectina-3	1:1000	Conejo	Abcam	AB53082
Gln-Sintetasa	1:5000	Ratón	BD Biosciences	610518
Histona 3	1:1000	Conejo	Abcam	AB8898
Hsp70	1:1000	Conejo	Proteintech	10995-1-AP
Laminina A/C	1:500	Ratón	Santa Cruz	SC7292
TGFβ	1:1000	Conejo	Invitrogen	PA5-99186
TIMP-3	1:1000	Conejo	Abcam	AB39184
TNFR1	1:500	Conejo	Abcam	AB19139
TNFα	1:500	Cabra	RD Systems	AF-510-NA

El siguiente paso consistió en la incubación de las membranas con un anticuerpo secundario, conjugado con fosfatasa alcalina, que reconoce al anticuerpo primario y se une a él. Para ello, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween durante 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante 45 min-1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios y la dilución empleada en cada caso se detallan en la Tabla 3, a excepción del anticuerpo secundario para la actina, que se utilizó a una dilución 1:10.000.

Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados para analizar el contenido proteico de las vesículas extracelulares mediante inmunoblot.

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

Posteriormente, las membranas se revelaron mediante el método colorimétrico de la fosfatasa alcalina. Para ello, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween, seguidos de un lavado adicional con tampón sustrato (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris Base 100 mM pH = 9.5). A continuación, se añadió la solución de revelado (tampón sustrato con un 0.66 % de NBT (nitroazul de tetrazolio) y un 0.34 % de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato). La reacción se detuvo antes de la saturación de las bandas sumergiendo las membranas en agua destilada.

Una vez secas las membranas, éstas se escanearon utilizando un escáner Scanjet 5300C (Hewlett Packard, Ámsterdam, Holanda) y la intensidad de las bandas se cuantificó con

el programa AlphaImager 2200 versión 3.1.3 (Alpha Innotech Corporation, San Francisco, EEUU). Los valores de intensidad se relativizaron frente a la intensidad de la banda de actina de la misma muestra, empleada como control de carga. Los valores se expresaron como porcentaje respecto a la intensidad de las muestras control.

5. Análisis de marcadores de neuroinflamación por inmunoblot o Western blot.

En los experimentos *in vivo* (inyección de EVs de ratas hiperamonémicas a ratas control e inyección de EVs de células madre mesenquimales en ratas hiperamonémicas, explicados anteriormente) se midieron distintos marcadores de neuroinflamación en cerebelo e hipocampo por inmunoblot:

- Citocinas pro-inflamatorias: IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-18.
- Citocinas anti-inflamatorias: IL-4, IL-10.
- Marcadores de microglía activada (CD68) y microglía en estado anti-inflamatorio (arginasa 1).
- Contenido total de I κ B α e I κ B α fosforilado: relacionados con la activación del factor de transcripción NF- κ B.
- Vía de señalización relacionada con la incoordinación motora: niveles de TNF α , su receptor TNFR1, glutaminasa 1 y GAT3.
- Dianas de la señalización por TGF β : TGF β R2, Smad7, Smad2/3 fosforilado.
- Vía de señalización relacionada con la activación de microglía mediante receptores purinérgicos: se midió el contenido de P2X4R, P2X7R, BDNF, CCL2 y CCL20.

Tras el sacrificio de las ratas por decapitación, se extrajo el cerebro, se separaron el cerebelo y el hipocampo y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, almacenando las áreas a -80°C hasta su análisis por inmunoblot.

El cerebelo y el hipocampo se homogenizaron en 5 volúmenes de tampón (Tris-HCl 20 mM pH = 7.5, di-trioteitol (DTT) 2 mM, ácido egatzico (EGTA) 10 mM, EDTA 2 mM, leupeptina 25 ug/mL, aprotinina 10 ug/mL, orto-vanadato sódico 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM). Las muestras se homogenizaron con un Ultraturrax y la concentración de proteína de las muestras se midió mediante el método colorimétrico BCA.

También se destinaron muestras *ex vivo* al análisis por inmunoblot. En este caso, tras la incubación con los tratamientos correspondientes en el sistema de perfusión, los cortes de hipocampo o cerebelo se transfirieron a tubos con 200 μ L de tampón de fosforilación (Tris-HCl 66 mM pH = 7.4, SDS 1 %, EGTA 1mM, glicerol 10 %, leupeptina 0.2 mg/mL, NaF 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM) enfriado en hielo y se sonicaron durante 20 segundos para su homogenización. La concentración de muestra se midió mediante BCA.

La técnica de inmunoblot se realizó según el protocolo descrito en el apartado *Análisis del contenido proteico de las vesículas mediante inmunoblot*, utilizando una cantidad de

proteína de 30-75 µg por muestra según la proteína analizada y separando las proteínas en geles del 10-15 % en función de su peso molecular. Los anticuerpos primarios empleados y su correspondiente dilución se recogen en la Tabla 4. Los anticuerpos secundarios utilizados son los mismos a los indicados anteriormente en la Tabla 3, a excepción del anticuerpo secundario para los controles de carga (actina y GAPDH, que se utilizó a una dilución 1:10.000). Para el análisis de proteínas fosforiladas, la técnica de inmunoblot se llevó a cabo al día siguiente de la obtención de la muestra o en los días posteriores para evitar al máximo la desfosforilación de las proteínas de interés.

Tabla 4. Anticuerpos primarios empleados para el análisis de marcadores de neuroinflamación por inmunoblot.

Anticuerpo	Dilución	Huésped	Casa comercial	Referencia
Actina	1:5000	Ratón	Abcam	AB6276-100
Arginasa 1	1:500	Ratón	Thermofisher	PA5-18684
BDNF	1:1000	Conejo	Abcam	AB6201
CCL2	1:1000	Conejo	Proteintech	66272-1
CCL20	1:1000	Ratón	Abcam	AB9829
CD68	1:1000	Ratón	Abcam	AB31630
Fosfo-IκBα	1:1000	Ratón	Sigma	SAB4504445
Fosfo-Smad2/3	1:1000	Conejo	Cell Signaling	8685
GAPDH	1:5000	Ratón	Millipore	MAB374
GAT3	1:1000	Conejo	Synaptic Systems	274303
Glutaminasa 1	1:1000	Conejo	Novus Biologicals	NBP2-29940
IL-10	1:1000	Conejo	Abcam	AB9969
IL-18	1:1000	Conejo	Abcam	AB19160
IL-1β	1:500	Cabra	RD Systems	AF-501-NA
IL-4	1:1000	Conejo	Abcam	AB9811
IL-6	1:500	Conejo	Biosource	ARC0062
IκBα	1:1000	Ratón	Abcam	AB32518
P2X4R	1:500	Conejo	Invitrogen	PA5-41080
P2X7R	1:1000	Conejo	Abcam	AB109054
Smad7	1:1000	Conejo	Invitrogen	42-0400
TGFβ	1:1000	Conejo	Abcam	AB205604
TGFβR2	1:1000	Conejo	Millipore	SAB5700739
TNFR1	1:1000 (Hipocampo) 1:250 (Cerebelo)	Conejo	Abcam	AB19139
TNFα	1:500	Cabra	RD Systems	AF-510-NA

6. Análisis de neuroinflamación mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

6.1 Preparación del tejido.

En los experimentos *in vivo*, tras el sacrificio de los animales, se extrajo el cerebelo y el hipocampo. En 8 ratas por grupo, la mitad de estas áreas se analizó por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. Para ello, el tejido se fijó con paraformaldehído al 4 % en 0.1 M durante 24 horas y se guardó en una solución de PB 0.1 M con azida sódica al 0.01 % hasta su procesado. En los experimentos *ex vivo* también se destinaron cortes de cerebelo e hipocampo para su análisis por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia, fijándolos con paraformaldehído y procesándolos de la misma manera que el tejido *in vivo*.

A continuación, las muestras se incluyeron en bloques de parafina mediante un procesador automático de tejidos Leica HistoCore PEARL (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania), en el cual el tejido es sometido a los siguientes pasos: 1 h con etanol al 70 %, 1 h con etanol al 96 %, 1h con etanol al 100 %, 1 h con etanol 100 %, 1 h con etanol 100 %, 1 h con xileno, 1 h con xileno, 1 horas con xileno, 1 h con parafina a 62°C, 2 h con parafina y 2 h con parafina. A continuación, se realizaron cortes de 5 µm con un microtomo.

De forma previa tanto a la inmunohistoquímica o inmunofluorescencia, los cortes se desparafinaron incubándolos 1 h a 60°C y se hidrataron mediante un teñidor Leica ST5010 Autostainer XL (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania) siguiendo este protocolo: 2 lavados de 10 min con xileno, 1 lavado de 5 min con etanol al 100%, 2 lavados de 5 minutos con etanol al 96 % y un lavado de 5 min con etanol al 70 %. Durante la inclusión en parafina se forman enlaces covalentes con los antígenos que dificultan el posterior reconocimiento por el anticuerpo primario. Para disociar dichos enlaces y lograr un reconocimiento más efectivo de los antígenos de interés, se empleó la técnica de recuperación antigénica, consistente en incubar los cortes con una solución *High* (citrato sódico 10 mM, Tween 20 al 0.05 %, pH = 6.0) o *Low* (Tris base 10mM, EDTA 1 mM, Tween 20 al 0.05 %, pH = 9.0), según el antígeno de interés a 90-95°C durante 30 minutos. La solución *High* se utilizó para la inmunohistoquímica contra Iba1, GFAP y TNF α ; mientras que la solución *Low* se utilizó para la inmunohistoquímica contra IL-1 β .

6.2 Inmunohistoquímica.

Para la **inmunohistoquímica** se utilizó el siguiente protocolo: los cortes se lavaron 3 veces en PB 0.1 M durante 5 minutos, se incubaron con un 3 % de H₂O₂ durante 15 min para bloquear la actividad de las peroxidases endógenas y con suero de cabra o de caballo según el anticuerpo a analizar (se emplea suero de la misma especie en la que se han obtenido los anticuerpos secundarios) para bloquear uniones inespecíficas. A continuación, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante la noche (16 h) a 4°C. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y los cortes se

incubaron con el anticuerpo secundario biotilado durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se realizó una incubación con el complejo ABC para intensificar la señal: los cortes se incubaron durante 30 minutos con el kit VECTASTAIN® ABC HRP (Peroxidase, Standard) (PK-4000, Vector Laboratories) a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios empleados están conjugados a la peroxidasa de rábano (HRP), que reacciona al añadir el sustrato colorimétrico diaminobenzidina (DAB) en presencia de H₂O₂, dando lugar a un precipitado marrón. Para el revelado, los cortes se incubaron con el kit de revelado DAB Substrate Kit (ab64238, Abcam). Finalmente, las muestras se tiñeron con hematoxilina de Mayer's (DAKO) durante 5 min para marcar los núcleos celulares y se deshidrataron con el teñidor Leica ST5010 Autostainer XL (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania) siguiendo los siguientes pasos: 1 lavado de 30 s con etanol al 96 %, 3 lavados de 1 minuto con etanol al 100 % y 1 lavado de 2 minutos con xileno. Los portaobjetos se montaron inmediatamente con el montador automático CV5030 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania).

Los anticuerpos empleados y su dilución se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para el análisis de marcadores de neuroinflamación mediante inmunohistoquímica.

Anticuerpo 1°	Dilución 1°	Casa comercial (referencia)	Anticuerpo 2° (especie donde se ha generado)	Dilución 2°	Casa comercial (referencia)
Iba1	1:300	Wako (019-19741)	Anti-IgG de conejo-HRP (cabra)	1:400	Vector Laboratories (BA-1000)
GFAP	1:400	Sigma (G-3893)	Anti-IgG de ratón-HRP (cabra)	1:400	Vector Laboratories (BA-9200)
IL-1β	1:200	Abcam (ab9722)	Anti-IgG de conejo-HRP (cabra)	1:400	Vector Laboratories (BA-1000)
TNFα	1:200	Abcam (ab66579)	Anti-IgG de cabra-HRP (caballo)	1:400	Vector Laboratories (BA-9500)

Una vez secas las preparaciones, se escanearon mediante un escáner Aperio Versa (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania). A partir de los escaneos, se tomaron imágenes a distintos aumentos de las regiones de interés mediante el software ImageScope64.

6.3 Inmunofluorescencia.

Se utilizó la técnica de inmunofluorescencia para analizar el marcador de microglía activada CD68 en cerebelo e hipocampo, la expresión del factor de transcripción NF- κ B en microglía de cerebelo y la ratio núcleo/citosol de NF- κ B en neuronas granulares del hipocampo y neuronas de Purkinje en cerebelo.

Para la **inmunofluorescencia**, tras el paso de recuperación antigénica explicado en el apartado *Preparación del tejido* se empleó el siguiente protocolo: los cortes se lavaron 3 veces con PB 0.1 M durante 5 minutos y 3 veces con tampón fosfato salino con tritón (PTA) durante 5 minutos y se bloquearon las uniones inespecíficas incubando con suero de la especie de procedencia del anticuerpo secundario durante 1 hora (suero de cabra para CD68 y la tinción simple de NF- κ B y suero de burro para el doble marcaje con NF- κ B e Iba1). A continuación, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (anti-CD68, anti-NF- κ B o bien una mezcla de anti-Iba1 y anti-NF- κ B en el caso de la doble inmunofluorescencia) durante la noche (16 h) a 4°C. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario o con la mezcla de anticuerpos secundarios correspondiente durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios empleados son fluorescentes, por lo que todos los pasos a partir de la incubación con el secundario se realizaron protegiendo los cortes de la luz. Finalmente, se tiñeron los núcleos celulares con DAPI (Sigma-Aldrich) y se montaron los cubres con el medio *Fluorescent Mounting Media* (DAKO). Los anticuerpos empleados y su dilución se indican en la Tabla 6.

Tabla 6. Anticuerpos primarios empleados para el análisis de marcadores de neuroinflamación mediante inmunofluorescencia.

Anticuerpo 1°	Dilución 1°	Casa comercial (referencia)	Anticuerpo 2°	Dilución 2°	Casa comercial (referencia)
CD68	1:100	Abcam (ab31630)	Anti-IgG de ratón-Alexa 488	1:400	Invitrogen (A11001)
p50 NF-κB	1:100	Abcam (ab7971)	Anti-IgG de conejo-Alexa 488	1:400	Invitrogen (A11034)
Iba1	1:300	Abcam (ab5076)	Anti-IgG de cabra- Alexa 647	1:400	Invitrogen (A21447)

Una vez secas las preparaciones, se tomaron imágenes con un microscopio confocal invertido Leica TCS SP2 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania), utilizando el objetivo de inmersión 63X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N. Las ondas de excitación de los fluorocromos empleadas fueron 488 nm para visualizar la señal del anticuerpo secundario Alexa-488, 532 nm para el anticuerpo Alexa-568 y 405 nm para la señal del DAPI.

6.4 Análisis de activación de microglía (Iba1 y CD68).

Para analizar la activación de la microglía, se cuantificó el área de las células marcadas con el anticuerpo contra Iba1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*), una proteína que en el cerebro se expresa de forma específica en la microglía. La microglía activada adquiere una forma más ameboide que la microglía en estado de reposo, pues disminuyen el tamaño y el número de sus ramificaciones. Por tanto, una disminución en el área de la microglía se considera como una medida de su activación.

Se analizó la activación de microglía en hipocampo y cerebelo (distinguiendo entre capa molecular y sustancia blanca). Por cada animal y área cerebral estudiada, se analizaron 10-12 campos a 40 aumentos y el área de las células marcadas con Iba1 se determinó mediante el software IpWin 32. Para el análisis estadístico, se promediaron los datos obtenidos en los distintos campos para cada animal.

Como análisis complementario, se evaluó mediante inmunofluorescencia el número de células que expresaban CD68, un marcador específico de microglía activada. Por cada animal y área cerebral estudiada (hipocampo y cerebelo), se analizaron 8 imágenes a 63 aumentos, adquiridas en un microscopio confocal utilizando el objetivo de inmersión 63X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N.A. El número de células positivas para CD68 se contó manualmente y se refirió respecto al área de las imágenes. Para el análisis estadístico, se promediaron los datos obtenidos en los distintos campos para cada animal.

6.5 Análisis de activación de astrocitos (GFAP).

La activación de astrocitos se determinó mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), cuya expresión se utiliza comúnmente como un marcador específico para la identificación de astrocitos. La activación de astrocitos se analizó en hipocampo y sustancia blanca del cerebelo. De cada una de las áreas estudiadas, se examinaron 10-12 campos a 40 aumentos por animal. Las imágenes fueron analizadas mediante el software ImageJ: se convirtieron a 8 bits y se aplicó la función Autolocal Threshold para determinar el porcentaje de área teñida con GFAP de cada imagen. Las imágenes se revisaron de forma manual para asegurar que el programa detectaba correctamente la marca de GFAP. Los datos de porcentaje de área teñida se promediaron para cada animal y se relativizaron respecto al grupo control.

6.6 Análisis de TNF α e IL-1 β en hipocampo.

Se estudió la expresión de las citocinas pro-inflamatorias TNF α e IL-1 β en la capa de neuronas granulares del hipocampo, concretamente en la región CA1 del asta de Ammon. A partir de los escaneos de las tinciones, se tomaron fotos de al menos 6 campos por rata (40x), en 6 ratas por grupo. La capa CA1 se seleccionó manualmente con el programa ImageJ (1.48 v) y se calcularon los valores de intensidad de gris invertidos. Para el análisis estadístico, se promediaron los datos obtenidos en los distintos campos para cada animal. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto al grupo control.

6.7. Análisis de expresión de NF- κ B en microglía.

En estudios previos del grupo, se han analizado los mecanismos por los que las alteraciones en cerebelo conducen al deterioro motor en hiperamonemia crónica, identificando la vía de TNF α – TNFR1- NF- κ B – glutaminasa, con un aumento de la expresión de NF- κ B en microglía de cerebelo (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018). Por tanto, hemos analizado este parámetro mediante inmunofluorescencia. Para ello, se realizó una inmunofluorescencia doble de la subunidad p-50 de NF- κ B y de Iba1 para marcar la microglía. Se analizaron 8 imágenes a 63 aumentos por rata, adquiridas en un microscopio confocal utilizando el objetivo de inmersión 63X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N.A. El número de células doblemente marcadas con NF- κ B (color verde) e Iba1 (color rojo) se contó manualmente y se refirió respecto al área de las imágenes. Para el análisis estadístico, se promediaron los datos obtenidos en los distintos campos para cada animal.

6.8. Análisis de la ratio núcleo/citosol del factor NF- κ B.

Se analizó la activación del factor de transcripción NF- κ B en neuronas granulares de la capa CA1 del hipocampo y en neuronas de Purkinje de cerebelo. Las subunidades p50 y p65 del factor de transcripción NF- κ B pueden estar localizadas en el citosol o en el núcleo de la célula. Una translocación de estas subunidades del citosol al núcleo indica activación del factor de transcripción, por lo que, a mayor ratio núcleo/citosol, mayor activación de NF- κ B. Por cada muestra, se analizaron 8 imágenes a 63 aumentos por rata, adquiridas en un microscopio confocal utilizando el objetivo de inmersión 63X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N.A. El análisis de imagen se realizó mediante el programa ImageJ (1.48v). En primer lugar, se seleccionaron los núcleos (marcados con DAPI) en el canal de fluorescencia azul, utilizando la función ROI. Esta selección se aplicó después en el canal verde (correspondiente a la señal de la subunidad p50) para medir la intensidad de la fluorescencia verde (*mean gray value*) detectada en los núcleos. A continuación, se seleccionaron las células completas con esta misma función ROI y se midió la intensidad de fluorescencia verde. Tras esto, se obtuvo el valor de fluorescencia verde en el citosol restando la intensidad de la fluorescencia verde en el núcleo a la intensidad total de cada célula. Con estos valores, se calculó la ratio núcleo/citosol y se expresó como porcentaje respecto al control.

7. Análisis de expresión en membrana.

Algunos de los cortes *ex vivo* se emplearon para analizar la expresión en membrana de determinados receptores y subunidades de receptores, relacionados con las alteraciones funcionales observadas *in vivo*. Para ello, tras la incubación con los tratamientos en el sistema de perfusión, algunas rodajas de hipocampo y cerebelo se trataron con BS3 (bisulfosuccinimidil suberato, #21580, Rockford). Esta molécula es un *cross-linker*, que se une a los residuos de lisina de los dominios extracelulares de las proteínas, formando agregados de alto peso molecular. Dichos agregados no migran si se corren en un gel de electroforesis, lo que permite detectar solamente las proteínas citosólicas (que sí pueden migrar en el gel, ya que el BS3 no atraviesa la membrana celular) en un Western blot.

El tratamiento con BS3 se realizó de la siguiente manera: para cada condición, se prepararon muestras (-), sin BS3, y muestras (+), con BS3. Las muestras (-) se incubaron en 200 μ L de tampón Krebs y las muestras (+) se incubaron en 200 μ L de tampón Krebs con BS3 2 mM. La incubación se realizó durante 30 min a 4°C en agitación. Tras esto, se añadieron 200 μ L de glicina 100 mM disuelta en Krebs a todos los tubos y se incubaron durante 10 min. La glicina neutraliza el BS3 que haya quedado libre y evita que este se una posteriormente a proteínas intracelulares al sonicar las muestras. A continuación, los cortes de tejido se transfirieron a tubos nuevos con 200 μ L de tampón de fosforilación y se sonicaron para homogenizar el tejido. Se determinó la concentración de proteína mediante BCA y las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis mediante inmunoblot.

Para el análisis de expresión en membrana mediante inmunoblot se siguió el protocolo descrito en el apartado 5 de los Materiales y Métodos, pero con ligeras modificaciones, ya que se utilizaron geles de mayor tamaño, de modo que las cantidades de reactivos y los tiempos de ciertos pasos del protocolo varían. Se decidió cargar las muestras en estos geles debido al mayor número de muestras por experimento (en expresión en membrana tenemos las muestras por duplicado, con y sin BS3). A continuación, se recogen las diferencias respecto al protocolo descrito anteriormente, siendo idénticos el resto de pasos:

- Separación electroforética de las proteínas: se realizó en geles del 8-10 % de mezcla Acrilamida/Bisacrilamida, cargando 75 μ g de muestra y corriendo las muestras a una intensidad de 10mA por gel durante 15-20 horas.
- Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF: se empleó una corriente de 250 mA durante 5 horas.

Los anticuerpos primarios y empleados se detallan en la Tabla 7. Los anticuerpos secundarios son los correspondientes de la Tabla 3.

Tabla 7. Relación de anticuerpos primarios empleados para el análisis de expresión en membrana mediante Western blot, indicando las diluciones utilizadas, la casa comercial y la referencia de cada anticuerpo.

Anticuerpo	Dilución	Huésped	Casa comercial	Referencia
GluA1	1:1000	Conejo	Millipore	04-855
GluA2	1:2000	Conejo	Millipore	AB1768-I
NR2B	1:500	Conejo	Millipore	04-600
TGFβR2	1:1000	Conejo	Millipore	SAB5700739

La intensidad de las bandas obtenidas en el Western blot se cuantificó mediante el programa AlphaImager 2200 versión 3.1.3 (Alpha Innotech Corporation, San Francisco, EEUU) y se sustrajo el *background* a cada una de ellas. Para calcular la expresión en membrana de cada proteína se restó el valor obtenido en la muestra tratada con BS3 (+),

correspondiente al contenido de la proteína en el citosol, al valor obtenido en la misma muestra sin BS3 (-), correspondiente al contenido total de la proteína. Los valores de expresión en membrana se expresaron como porcentaje respecto al control.

8. Evaluación de las alteraciones cognitivas y motoras.

8.1 Test beam walking: coordinación motora.

Este test evalúa la coordinación motora y el equilibrio. En él, la rata debe cruzar un palo de un metro de largo situado a 1 metro del suelo. Al final del palo se coloca una caja cerrada y oscura que proporciona un ambiente agradable para los roedores (Figura 11). En primer lugar, se realizó una fase de entrenamiento en el que se hizo pasar a las ratas tres veces por el palo, dejándolas unos 2 minutos dentro de la caja final para que se sintieran protegidas. Algunas de las ratas no llegaban a pasar por el palo debido al miedo y se eliminaron del test. A continuación, se realizó el test propiamente dicho, en el que se hizo pasar a las ratas 3 veces por el palo y se contabilizó el tiempo en segundos y el número de resbalones que cometían durante el recorrido hasta la caja. El parámetro utilizado para medir la coordinación motora fue la media del número de resbalones (a mayor número de resbalones, más incoordinación motora).



Figura 11. Imagen del material utilizado para el test beam walking. Las ratas deben recorrer el palo desde la plataforma situada a la izquierda hasta la caja situada a la derecha.

8.2 Laberinto radial de 8 brazos.

Este test permite evaluar el aprendizaje y la memoria espacial en ratas, estudiando además dos procesos cognitivos diferentes: memoria espacial de referencia y memoria espacial de trabajo. El laberinto utilizado es de plexiglás negro y se sitúa a una altura de un metro del suelo en una habitación tranquila y con pistas visuo-espaciales en las paredes de la

misma. El laberinto consta de un área central y de ocho brazos equidistantes y del mismo tamaño. El área central tiene un diámetro de 30 cm, mientras que los brazos tienen una anchura de 10 cm y una longitud de 70 cm. Las paredes laterales de los brazos son más altas en el extremo próximo al área central (30 cm) y tienen una altura menor en el extremo más alejado de la zona central (5 cm). La comida de recompensa se coloca en comederos empotrados situados en el extremo distal de cada uno de los ocho brazos. Durante los cuatro días previos al pre-test, las ratas se estabularon de forma individual y se les redujo la ingesta de comida para motivar el comportamiento de búsqueda de alimento en el test. La restricción calórica se mantuvo durante todo el test y se controló el peso de los animales para asegurar que la pérdida de peso no superaba el 10 %, aumentando o reduciendo la cantidad de alimento en caso de ser necesario. En el día de pre-test se realizaron dos sesiones para familiarizar a los animales con el laberinto y la comida de recompensa. En la primera sesión, se colocaron dos ratas durante 5 minutos con comida esparcida por todo el laberinto. En la segunda sesión, se colocó solo una rata durante 5 minutos con comida únicamente en los 8 comederos (2 pellets/comedero). Al día siguiente se comenzó con el test, que se realizó durante 4 días consecutivos con 5 ensayos al día. En cada ensayo, se colocó comida en 4 de los 8 brazos del laberinto: en dos brazos consecutivos (por ejemplo, el 1 y el 2) y en otros dos brazos no consecutivos (por ejemplo, el 5 y el 7). La configuración de brazos con/sin comida se mantuvo igual para cada rata durante todos los ensayos del test, variando la configuración entre cada rata. En la Figura 12 se puede observar una imagen del laberinto (Fig. 12A) y un ejemplo de la configuración de comida empleada (Fig. 12B).

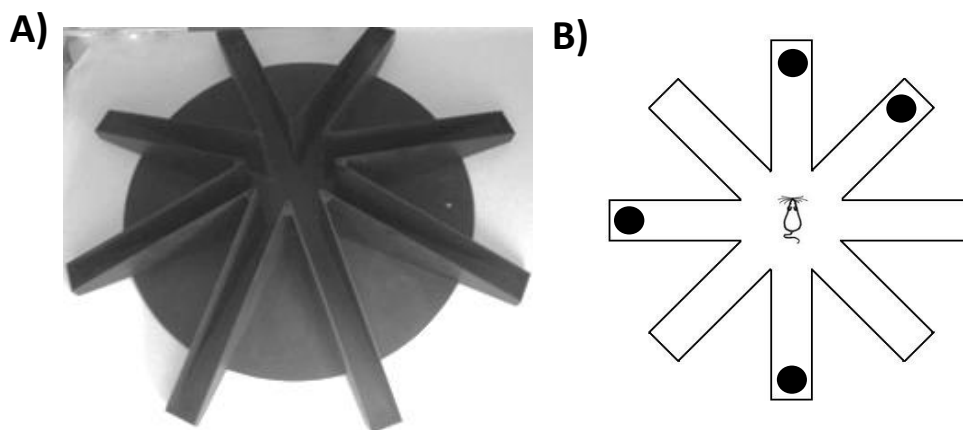


Figura 12. Laberinto radial de 8 brazos. (A) Imagen real del laberinto. (B) Ejemplo esquemático de la configuración de brazos con/sin comida empleada durante el test.

En cada ensayo, se colocó a la rata en el área central del laberinto y se registraron las entradas en los brazos (considerando entrada cuando la rata entra al menos hasta la mitad de un brazo). El ensayo finaliza cuando la rata entra en todos los brazos con comida, hasta un tiempo máximo de 3 minutos, en el cual se retira la rata del laberinto. Los parámetros analizados fueron: (1) errores de referencia espacial, definidos como el número de brazos sin comida en los que entra el animal; (2) errores de memoria de trabajo, equivalentes al número de veces que el animal entra en un brazo ya visitado durante el mismo ensayo

(independientemente de si tiene comida o no) y (3) número de aciertos de cada ensayo, que corresponde al número de brazos con comida en los que entra el animal durante el ensayo. Para cada día de test, se calculó el índice de aprendizaje espacial restando el número total de errores de referencia al número total de aciertos en los cinco ensayos.

8.3 Memoria de localización de objetos y memoria de reconocimiento de objetos.

La memoria de reconocimiento en roedores se basa en la capacidad de recordar un estímulo percibido anteriormente y diferenciarlo de otro estímulo novedoso. Debido a que los roedores presentan una preferencia innata por la novedad, un roedor que recuerde el estímulo inicial pasará más tiempo explorando el estímulo novedoso (Ennaceur, 2010). Entre las ventajas de este test se incluyen: se basa en una tendencia natural de los roedores, por lo que no se requieren sesiones de entrenamiento con refuerzos positivos ni negativos para motivar el comportamiento y es menos estresante que otros test de memoria como el laberinto de Morris.

En esta tesis se han utilizado dos variantes de este test: reconocimiento de una localización espacial novedosa (*Novel Object Location*, NOL) y reconocimiento de un objeto novedoso (*Novel Object Recognition*, NOR).

Para ambos test, se utilizó una caja de madera pintada de negro (medidas: 70x70x40 cm), con serrín y pistas visuo-espaciales tanto en la caja como en las paredes. El test se grabó con una videocámara situada encima de la caja para el posterior análisis de los vídeos. En primer lugar, los animales fueron habituados a este nuevo entorno durante tres días, dejándolos que exploraran la caja libremente durante dos sesiones al día de 5 minutos cada una.

En el cuarto día se realizó el test NOL, que consta de una fase de muestra y una fase de test. En la fase de muestra, se colocaron dos objetos idénticos en la caja y se dejó que el animal explorara los objetos durante 3 minutos. La fase de test se realizó tras un intervalo de 2 horas. En esta fase, se modificó la posición de uno de los objetos y se introdujo de nuevo al animal en la caja para que explorara los objetos durante 3 minutos (Figura 13A y B).

Al quinto día se realizó el test NOR. En la fase de muestra, se colocaron dos objetos idénticos en la caja y se dejó que el animal explorara los objetos durante 3 minutos. En este caso, la fase de test se llevó a cabo tras un intervalo de 6 horas. En la fase de test (3 min) se mantuvieron las posiciones iniciales de los objetos, pero uno de ellos fue cambiado por un objeto diferente (Figura 13C).

En ambos test, las posiciones iniciales de los objetos fueron diferentes entre unos animales y otros para evitar sesgos.

Posteriormente, se analizaron los vídeos y se cuantificó el tiempo en segundos durante el que los animales exploraban el estímulo conocido y el estímulo nuevo (objeto cambiado

de posición en el caso del NOL y objeto diferente en el caso del NOR) y se calculó la ratio de discriminación para cada test según la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio de discriminación} = \frac{\text{Tiempo exploración estímulo nuevo} - \text{Tiempo exploración estímulo conocido}}{\text{Tiempo de exploración total}}$$

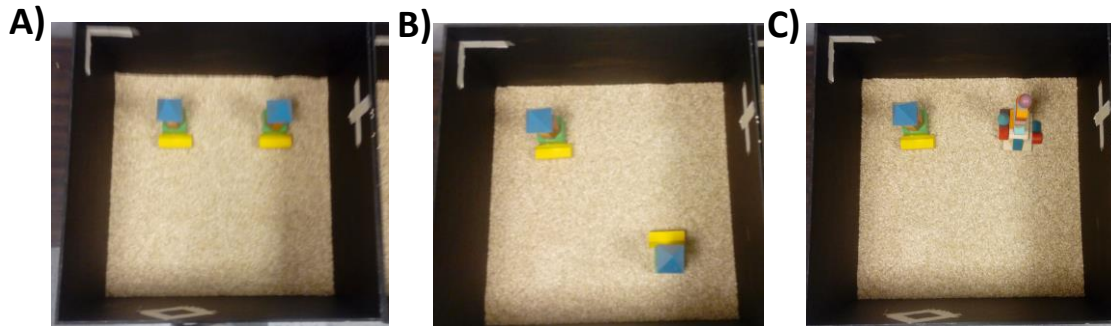


Figura 13. Test de memoria de localización de objetos (NOL) y memoria de reconocimiento de objetos (NOR). (A) Ejemplo de los objetos empleados y su posicionamiento durante la fase de muestra del NOL o del NOR. (B) Ejemplo de posicionamiento de los objetos en la fase de test del NOL. (C) Ejemplo de posicionamiento de los objetos en la fase de test del NOR.

8.4 Laberinto en Y.

Este test se basa en la curiosidad innata de los roedores para explorar áreas nuevas. Entre sus ventajas destaca que no utiliza refuerzos positivos ni negativos y que causa poco estrés a las ratas. Este test se realiza en un laberinto de tres brazos colocados en forma de Y. Los brazos tienen la misma forma y longitud (longitud de 60 cm, anchura de 11.5 cm y altura de 25 cm) (Figura 14).

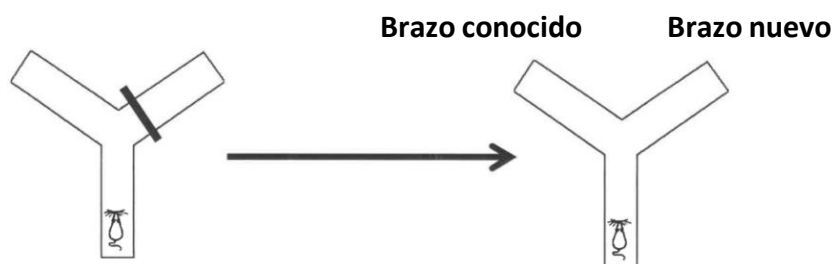


Figura 14. Diagrama esquemático del laberinto en Y. A la izquierda se muestra el laberinto durante la fase de test (con uno de los brazos cerrados), señalando la colocación de la rata en el brazo de inicio. A la derecha se observa la fase de test, con ambos brazos abiertos para que la rata explore libremente.

Uno de los brazos se elige como brazo de inicio y los otros dos son los brazos de elección. Las paredes del laberinto pueden ser blancas o negras; en este caso se escogió un laberinto de color negro, ya que causaba menos estrés a las ratas.

El protocolo utilizado en esta tesis es una modificación del utilizado por Sarnyai *et al.* (2000) y Sanderson *et al.* (2009). Las ratas se colocaron en el brazo de inicio y se les permitió explorar el laberinto con uno de los brazos cerrados durante 2 minutos durante 3 ensayos, dejando 1 min de intervalo entre ensayos (fase de entrenamiento). A continuación, cada rata se colocó de nuevo en el brazo de inicio y se le permitió explorar los tres brazos del laberinto durante dos minutos (fase de test). Durante esta fase, se registró el tiempo que pasaba la rata en cada uno de los dos brazos y se calculó la ratio de discriminación según la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio de discriminación} = \frac{\text{Tiempo exploración brazo nuevo} - \text{Tiempo exploración brazo conocido}}{\text{Tiempo de exploración total}}$$

9. Análisis estadístico.

Los datos se expresan como la media \pm SEM. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism. La normalidad de los datos se evaluó mediante el test Saphiro-Wilk. Los datos se analizaron mediante test paramétricos: test T de Student para comparar dos grupos y test de análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido de un test post hoc de Tukey para comparar tres o más grupos. Para el análisis de los datos del test del laberinto radial de 8 brazos, se aplicó ANOVA de dos vías en los parámetros estudiados en diferentes ensayos, para evaluar simultáneamente el efecto de ambos factores: grupo experimental y día del test. Se consideró significativo un nivel de significancia del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SECCIÓN A. Papel de las vesículas extracelulares de plasma de ratas hiperamonémicas en la inducción de la neuroinflamación y los déficits cognitivos y motores.

Para evaluar el papel de las vesículas extracelulares (EVs) de plasma en las alteraciones cerebrales asociadas a la hiperamonemia, se diseñó un experimento *in vivo* en el cual se aislaron EVs de plasma de ratas hiperamonémicas y se inyectaron a ratas control. Se analizó si las EVs inyectadas inducían neuroinflamación en cerebelo e hipocampo, así como déficits en la coordinación motora y en la función cognitiva en las ratas control.

Caracterización de las vesículas extracelulares (EVs) aisladas de plasma de ratas hiperamonémicas.

1. Microscopía electrónica, análisis de seguimiento de nanopartículas y análisis de marcadores de superficie por Western blot.

En primer lugar, se caracterizaron las EVs aisladas de plasma de ratas hiperamonémicas y de ratas control. Las EVs mostraron características compatibles con exosomas en cuanto a morfología, tamaño y marcadores de superficie. En la Figura 15A se muestran imágenes de microscopía electrónica de las vesículas aisladas, en las que se puede observar su característica forma cóncava en este tipo de tinción.

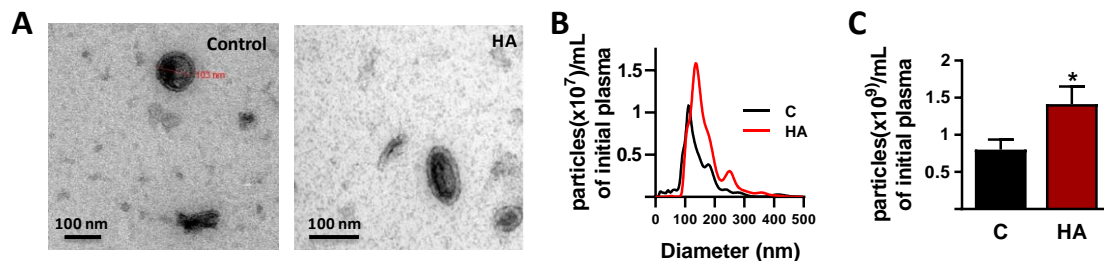


Figura 15. Caracterización de las vesículas extracelulares aisladas de plasma de ratas control y ratas hiperamonémicas. (A) Imágenes representativas obtenidas por microscopía electrónica de transmisión tras tinción negativa. (B) Perfil representativo de tamaños y (C) número de partículas, obtenidos por análisis de seguimiento de partículas (NTA). Los valores de cantidad de partículas son la media \pm SEM de 15-18 muestras por grupo. Los datos se analizaron mediante T-test, indicándose con asterisco los valores significativamente diferentes respecto a los de las ratas control (* $p < 0.05$).

C = vesículas extracelulares extraídas de plasma de ratas control; HA = vesículas extracelulares extraídas de plasma de ratas hiperamonémicas

Para evaluar el tamaño y la cantidad de las EVs aisladas se llevó a cabo un análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) (Fig. 15B y 15C), que mostró que las vesículas tenían un diámetro medio de 143 ± 4 nm (139 ± 6 nm en el caso de las EVs de ratas control y 146 ± 5 nm en el caso de las EVs de ratas hiperamonémicas).

La presencia de marcadores de superficie típicos de exosomas se analizó por Western blot, revelando que las EVs aisladas eran positivas para Alix, Hsp70, Flotilina-2 y CD9 (Fig. 16).

Resulta de interés destacar algunas diferencias encontradas entre las EVs de ratas hiperamonémicas y las de las ratas control. En primer lugar, aunque el perfil de distribución de tamaños obtenido mediante NTA fue similar en EVs de ratas hiperamonémicas y en ratas control, la cantidad de EVs por mL de plasma de partida fue mayor en las ratas hiperamonémicas (175 ± 29 % respecto al control, $p < 0.05$) (Fig. 15C).

Se evaluó si el tratamiento de las ratas hiperamonémicas con el anti-TNF α infliximab normalizaba la cantidad de EVs en plasma, utilizando EVs aisladas de plasma recogido en un experimento previo del grupo, tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

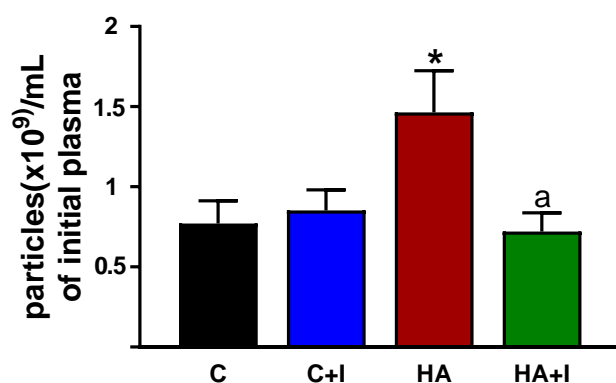


Figura 16. Efecto del tratamiento con infliximab en la cantidad de EVs por mL de plasma de partida en ratas control e hiperamonémicas. Número de partículas aisladas por mL de plasma de partida, medido por análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). Los valores son la media \pm SEM de 9-12 muestras por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey, indicándose con asterisco los valores significativamente diferentes respecto a los de las ratas control (* $p < 0.05$) y con a los significativamente diferentes al grupo HA ($a = p < 0.05$).

C = vesículas extracelulares extraídas de plasma de ratas control; C+I = vesículas extracelulares extraídas de plasma de ratas control tratadas con infliximab; HA = vesículas extracelulares extraídas de plasma de ratas hiperamonémicas; HA+I = vesículas extracelulares extraídas de plasma de ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab

En estas muestras, observamos que se reproduce el aumento en la cantidad de EVs por mL de plasma de partida en ratas hiperamonémicas sin tratamiento respecto a las ratas control (190 ± 34 %, $p < 0.05$) (Fig. 16). La cantidad de EVs por mL de plasma de partida se normalizó en ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab respecto a las ratas hiperamonémicas sin tratamiento (93 ± 15 % respecto al control, $p < 0.05$) (Fig. 16), mientras que el tratamiento de las ratas control con infliximab no tuvo un efecto

significativo sobre la cantidad de EVs por mL de plasma (111 ± 17 % respecto al control) (Fig. 16).

Por otra parte, en el análisis de proteínas por Western blot se observó que los marcadores Flotilina-2 ($259 \pm 42\%$; $p < 0.01$) (Fig. 17B) y Hsp70 ($124 \pm 7\%$; $p < 0.05$) (Fig. 17C) se encontraban aumentados en las EVs aisladas de plasma de ratas hiperamonémicas respecto a las ratas control, mientras que los marcadores Alix ($83 \pm 7\%$; $p < 0.05$) (Fig. 17A) y CD9 ($62 \pm 11\%$; $p < 0.05$) (Fig. 17D) estaban disminuidos.

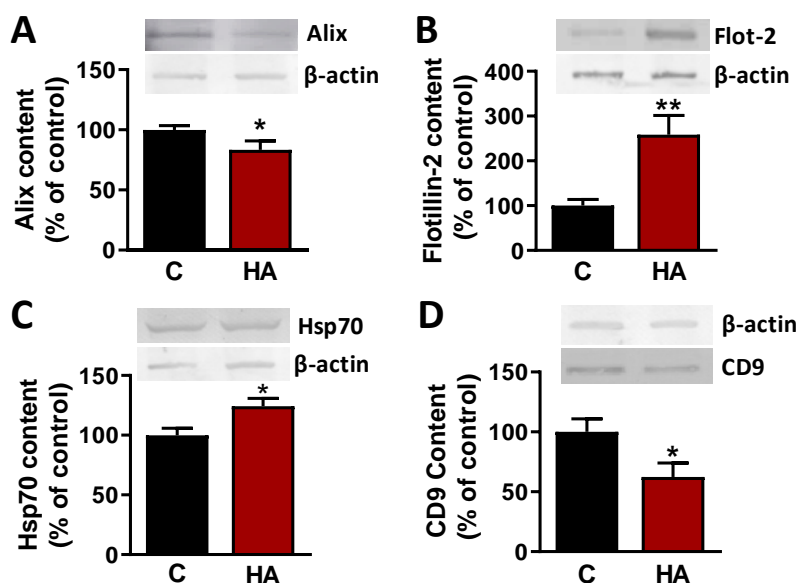


Figura 17. Contenido proteico de marcadores de vesículas extracelulares en EVs aisladas de ratas hiperamonémicas y ratas control. Contenido en los marcadores (A) Alix (n = 16), (B) Flotilina-2 (n = 7), (C) Hsp70 (n = 20) y (D) CD9 (n = 12) analizado por Western blot. Los datos se expresan como el porcentaje respecto al contenido de la proteína en las ratas control y son la media \pm SEM. Los datos se analizaron mediante T-test, indicándose con asterisco los valores significativamente diferentes respecto a las ratas control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

C = vesículas extracelulares extraídas de plasma de ratas control; HA = vesículas extracelulares extraídas de plasma de ratas hiperamonémicas

2. Análisis del contenido proteico de las EVs mediante proteómica y Western blot.

Para evaluar en más detalle si la hiperamonemia altera el contenido proteico de las EVs, se llevó a cabo un análisis del contenido de proteínas mediante proteómica en EVs aisladas de plasma de ratas hiperamonémicas y ratas control (n = 8 por grupo).

Se identificaron 367 proteínas en las muestras, de las cuales 124 mostraban una expresión diferencial entre ambos grupos: 44 proteínas (12 % del total) estaban aumentadas en las EVs de ratas hiperamonémicas, 80 proteínas (22 % del total) presentaban un contenido disminuido en las EVs de ratas hiperamonémicas y 242 proteínas (66 % del total) no presentaban diferencias de contenido entre los grupos (Fig. 18A). Las proteínas diferencialmente expresadas que se identificaron se recogen en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8. Relación de proteínas cuyo contenido está disminuido en EVs de ratas hiperamonémicas.

Proteínas cuyo contenido está disminuido en vesículas extracelulares de plasma de ratas hiperamonémicas respecto a ratas control

Nombre de la proteína	P-valor	FC	Nombre de la proteína	P-valor	FC
Serine (Or cysteine) peptidase inhibitor, clade C (Antithrombin)	0.011	0.197	Complement component C6	0.005	0.405
Apolipoprotein H	0.042	0.240	Complement C3	0.015	0.415
Cfh protein	0.042	0.244	Gelsolin	0.008	0.424
Carboxypeptidase B2	0.007	0.246	Apolipoprotein A-IV	0.001	0.433
Hemopexin	0.028	0.249	Alpha-2 antiplasmin	0.005	0.441
Complement component factor h-like 1	0.009	0.257	RCG33981, isoform CRA	0.005	0.444
Rat apolipoprotein E protein	0.002	0.274	Mannan-binding lectin serine protease 1	0.003	0.454
Complement C8 gamma chain	0.014	0.288	Tetraspanin-CD9	0.039	0.464
Inter alpha-trypsin inhibitor, heavy chain 4	0.016	0.290	Proteasome subunit beta	0.006	0.466
Vitronectin	0.019	0.292	C9 protein	0.050	0.472
Complement factor B	0.017	0.296	Fetub protein	0.013	0.485
Coagulation factor XIII B chain	0.035	0.299	Complement component C8 beta chain	0.017	0.489
Complement factor H	0.002	0.299	Serine (Or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (Alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 4	0.002	0.492
Retinoic acid receptor responder (Tazarotene induced)	0.010	0.307	Ig gamma-2B chain C region	0.036	0.498
Prothrombin	0.018	0.318	Ig gamma-2C chain C region	0.039	0.547
Complement factor I	0.008	0.319	Kallikrein B, plasma 1	0.026	0.553
Kininogen-1	0.021	0.340	Complement C4B (Chido blood group)	0.026	0.578
MCG1038839	0.002	0.341	RCG55135, isoform CRA_b	0.019	0.603
Macrophage stimulating 1 (Hepatocyte growth factor-like)	0.005	0.347	Complement C7	0.048	0.605
Apolipoprotein B-100	0.010	0.351	Apolipoprotein C-II (Predicted)	0.007	0.620
LOC299567 protein (Fragment)	0.019	0.353	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	0.039	0.622
Coagulation factor XII	0.034	0.357	MASP-3 protein (Fragment)	0.014	0.626
Complement C8 alpha chain	0.013	0.358	Inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 1	0.033	0.645
Insulin-like growth factor binding protein complex acid-labile subunit	0.001	0.360	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2	0.032	0.647
Carboxypeptidase N catalytic chain	0.013	0.363	Peroxidasin	0.014	0.653
Pyruvate kinase PKM	0.025	0.383	Reelin	0.018	0.673

Se muestran los resultados obtenidos por análisis de expresión diferencial mediante proteómica. Se han incluido todas las proteínas identificadas, mostrando su P-valor y el Fold-change (FC), calculado como la ratio [contenido de la proteína en las muestras de EVs hiperamonémicas / contenido de la proteína en las muestras de EVs control].

Tabla 9. Relación de proteínas cuyo contenido está aumentado en EVs de ratas hiperamonémicas.

Proteínas cuyo contenido está aumentado en vesículas extracelulares de plasma de ratas hiperamonémicas respecto a ratas control

Nombre de la proteína	P-valor	FC	Nombre de la proteína	P-valor	FC
Ficolin-2	0.002	8.3	HGF activator	0.031	2.0
Alpha-2-macroglobulin	0.0003	5.7	Glutamine synthetase	0.016	2.0
Galectin-3-binding protein	0.001	3.3	Thrombospondin-4	0.004	1.9
Fc fragment of IgG-binding protein	0.001	3.3	Heat shock protein family A (Hsp70) member 5	0.024	1.9
Ficolin (Collagen/fibrinogen domain containing) 1	0.0003	2.9	Urinary protein 2	0.042	1.9
Coagulation factor XI	0.001	2.7	C4b-binding protein beta chain	0.047	1.9
Thrombospondin 1	0.005	2.7	Ceruloplasmin	0.015	1.9
Ab2-001	0.030	2.5	Collectin sub-family member 11	0.039	1.8
Urinary protein 1	0.035	2.2	RCG21066	0.010	1.8
Brain cDNA, clone MNCb-5810, tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Timp3)	0.010	2.2	Ig kappa chain V19-17-like	0.042	1.5
Major urinary protein	0.002	2.2	CD5 antigen-like	0.002	1.5
Myeloperoxidase	0.011	2.1	Polymeric immunoglobulin receptor	0.009	1.3

Se muestran los resultados obtenidos por análisis de expresión diferencial mediante proteómica. Se han incluido todas las proteínas identificadas, mostrando su P-valor y el Fold-change (FC), calculado como la ratio [contenido de la proteína en las muestras de EVs hiperamonémicas / contenido de la proteína en las muestras de EVs control].

La herramienta de análisis PaintOmics permite discernir el porcentaje de las proteínas alteradas en el análisis de proteómica que pertenece a cada una de las siete clasificaciones principales incluidas en la base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). El análisis de distribución por categorías mediante la aplicación PaintOmics 3 mostró que el 32 % de las proteínas diferencialmente expresadas estaban relacionadas con la categoría Enfermedad Humana; el 22 %, con Metabolismo, otro 22 %, con Sistemas de Organismos; el 13 %, con Procesamiento de la Información del Entorno; el 8 %, con Procesos Celulares; y el 2.5 %, con Procesamiento de la Información Genética (Fig. 18B).

Para profundizar en la función biológica de las proteínas diferencialmente expresadas, se realizó un análisis mediante la ontología Gene Ontology (GO). La GO anota las proteínas según cinco clasificaciones diferentes: componentes celulares, función molecular, proceso biológico, ruta de señalización y tipo de proteína. En la Figura 18C se muestran las diferentes categorías en las que están implicadas las proteínas diferencialmente expresadas dentro de cada una de las clasificaciones, representando el porcentaje de cada una de estas categorías en gráficos de sectores.

Según esta clasificación en función de la GO, las proteínas diferencialmente expresadas en el análisis de proteómica realizado están relacionadas principalmente con proteínas con actividad catalítica o de unión, con procesos biológicos relacionados con el sistema inmune, la respuesta a estímulos, procesos metabólicos, conversión de

glutamina/glutamato, ruta de señalización por integrinas y coagulación sanguínea. Respecto al tipo de proteínas diferencialmente expresadas, cabe destacar que un porcentaje elevado de ellas corresponde a proteínas relacionadas con la defensa y el sistema inmune y con moduladores enzimáticos.



Figura 18. Perfil proteómico de las vesículas extracelulares aisladas de plasma de ratas hiperamonémicas y ratas control. (A) Se identificaron un total de 367 proteínas. Se muestra el porcentaje de proteínas sobre-expresadas, disminuidas y no alteradas en EVs de ratas hiperamonémicas frente a ratas control. (B) Distribución por categorías obtenida por análisis con PaintOmics. (C) Análisis GO (Gene Ontology) para determinar la función molecular, los componentes celulares, los procesos biológicos, las rutas de señalización y el tipo de proteínas a las que pertenecen o en las que están implicadas las 124 proteínas diferencialmente expresadas en las EVs de hiperamonemia, representando el porcentaje de cada uno de los términos.

Algunas de las proteínas identificadas como aumentadas o disminuidas en hiperamonemia en el análisis proteómica se confirmaron posteriormente mediante Western blot (Fig. 19). Estos análisis muestran que el contenido en glutamina sintetasa (Fig. 19A), TIMP-3 (Fig. 19B) y Hsp70 (Fig. 19C) está aumentado a un 422 ± 105 % ($p < 0.01$); 131 ± 11 % ($p < 0.05$) y 124 ± 6 % ($p < 0.05$), respectivamente, en las EVs de ratas hiperamonémicas en comparación con las ratas control. El contenido en la cadena pesada (Fig. 19D) y la cadena ligera (Fig. 19E) de la IgG y de CD9 (Fig. 19F) está disminuido a un 70 ± 8 % ($p < 0.05$); 89 ± 4 % ($p < 0.05$) y 62 ± 12 % ($p < 0.05$), respectivamente, en las EVs de ratas hiperamonémicas en comparación con las EVs de las controles.

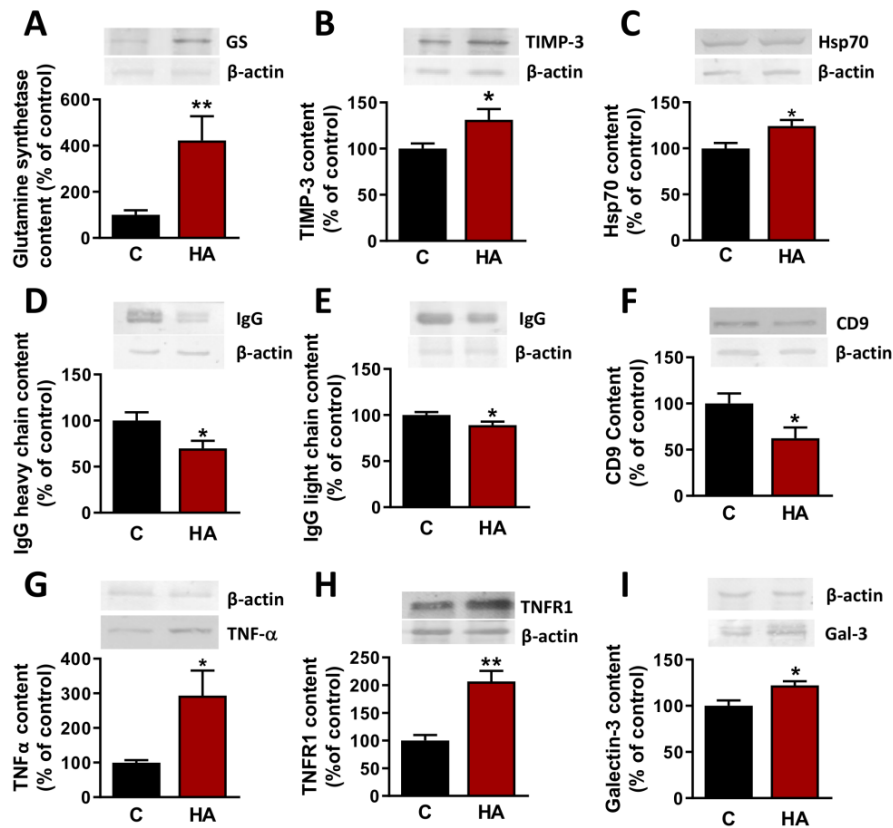


Figura 19. Contenido de algunas proteínas en las EVs de plasma de ratas hiperamonémicas y ratas control analizado por Western blot. Contenido de (A) glutamina sintetasa (n = 8), (B) TIMP-3 (n = 8), (C) Hsp70 (n = 20), (D) cadena pesada de la IgG (n = 12), (E) cadena ligera de la IgG (n = 16), (F) CD9 (n = 12), (G) TNFα (n = 9), (H) TNFR1 (n = 8-10) e (I) galectina-3 (n = 7-13). Los valores se expresan como porcentaje del contenido de la misma proteína en EVs de ratas control y son la media ± SEM. Los datos se analizaron mediante T-test. Se indican los valores significativamente diferentes de los controles con asterisco (*p < 0.05, **p < 0.01). C = vesículas extracelulares extraídas de plasma de ratas control; HA = vesículas extracelulares extraídas de plasma de ratas hiperamonémicas

También se analizó mediante Western blot el contenido en determinadas proteínas que podrían estar mediando las alteraciones inducidas en el cerebro por la hiperamonemia.

El contenido de TNFα (Fig. 19G), de su receptor TNFR1 (Fig. 19H) y de galectina-3 (Fig. 19I) está aumentado hasta un 213 ± 50 % (p < 0.05); 207 ± 19 % (p < 0.001) y 122 ± 5 % (p < 0.05), respectivamente, en las EVs de ratas hiperamonémicas en comparación con las ratas control. Estas proteínas podrían jugar un papel en el desarrollo de la neuroinflamación y la incoordinación motora en las ratas hiperamonémicas, si bien el análisis de proteómica solo detectó el aumento de galectina-3, mientras que el aumento de TNFα y de su receptor TNFR1 se detectó solo mediante Western blot.

Dado que se sabe que el TNFα y su receptor TNFR1 son relevantes en la inducción de las alteraciones cognitivas y motoras en ratas hiperamonémicas, se evaluó si el tratamiento

de las ratas hiperamonémicas con el anti-TNF α infliximab normalizaba los niveles de estas proteínas.

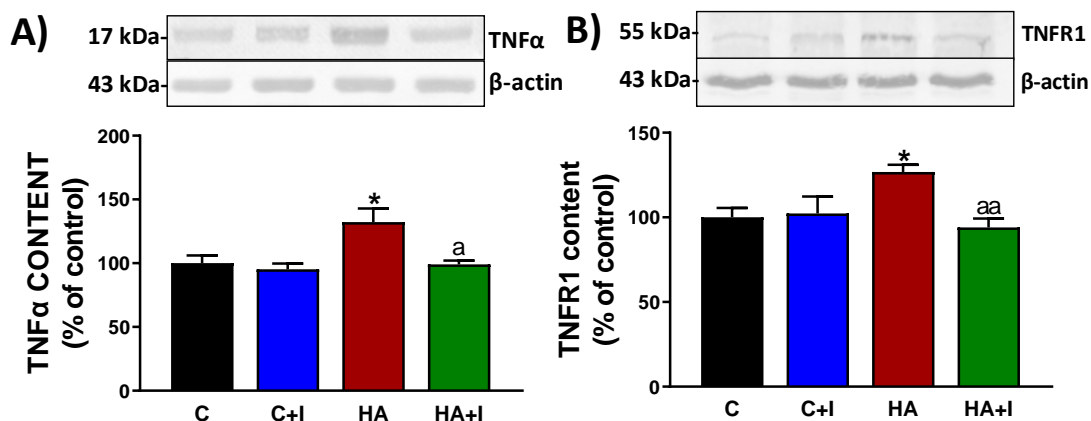


Figura 20. Efecto del tratamiento con infliximab en los niveles de TNF α y su receptor TNFR1 en EVs aisladas de plasma de ratas control y ratas hiperamonémicas. Contenido de (A) TNF α (n = 5-7) y (B) TNFR1 (n = 8-9) analizado por Western blot. Los valores se expresan como porcentaje respecto al grupo control y son la media \pm SEM. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey, indicándose con asterisco los valores significativamente diferentes respecto a los de las ratas control (*p < 0.05) y con a los significativamente diferentes al grupo HA (a = p < 0.05; aa = p < 0.01).

C = vesículas extracelulares extraídas de plasma de ratas control; C+I = vesículas extracelulares extraídas de plasma de ratas control tratadas con infliximab; HA = vesículas extracelulares extraídas de plasma de ratas hiperamonémicas; HA+I = vesículas extracelulares extraídas de plasma de ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab

En estas muestras, observamos que se reproduce el aumento en el contenido de TNF α (132 ± 6 %, p < 0.05) (Fig. 20A) y de TNFR1 (127 ± 4 %, p < 0.05) (Fig. 20B) en las EVs aisladas de plasmas de ratas hiperamonémicas sin tratamiento respecto a las ratas control. El contenido de ambas proteínas se normaliza en EVs aisladas de plasma de ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab respecto a EVs de plasma de ratas hiperamonémicas sin tratamiento (99 ± 3 %, p < 0.05; 94 ± 5 %, p < 0.01, respectivamente) (Fig. 20), mientras que el tratamiento de las ratas control con infliximab no tuvo un efecto significativo sobre el contenido de TNF α (95 ± 5 %) (Fig. 20A) ni de TNFR1 (102 ± 10 %) (Fig. 20B) en las EVs aisladas.

CAPÍTULO 1. Las EVs de plasma de ratas hiperamonémicas inducen neuroinflamación en cerebelo e incoordinación motora en ratas control.

EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Para evaluar si las EVs aisladas de plasma de ratas hiperamonémicas pueden inducir neuroinflamación, se diseñó un experimento *in vivo* en el que se inyectaron EVs de ratas hiperamonémicas (HA-EVs) a ratas control por vía intravenosa, como se describe en los Métodos. Se estudiaron los efectos sobre la neuroinflamación en dos áreas cerebrales: el cerebelo y el hipocampo. En este capítulo se describirán los efectos observados en el cerebelo.

1.1 Las vesículas inyectadas alcanzan el cerebelo.

Para confirmar que las vesículas inyectadas alcanzaban el cerebelo, se marcaron las EVs de plasma de ratas hiperamonémicas con el fluoróforo lipofílico Dil, se inyectaron por vía intravenosa en ratas control y se evaluó su presencia en cerebelo a las 72 h post-inyección (Fig. 21).

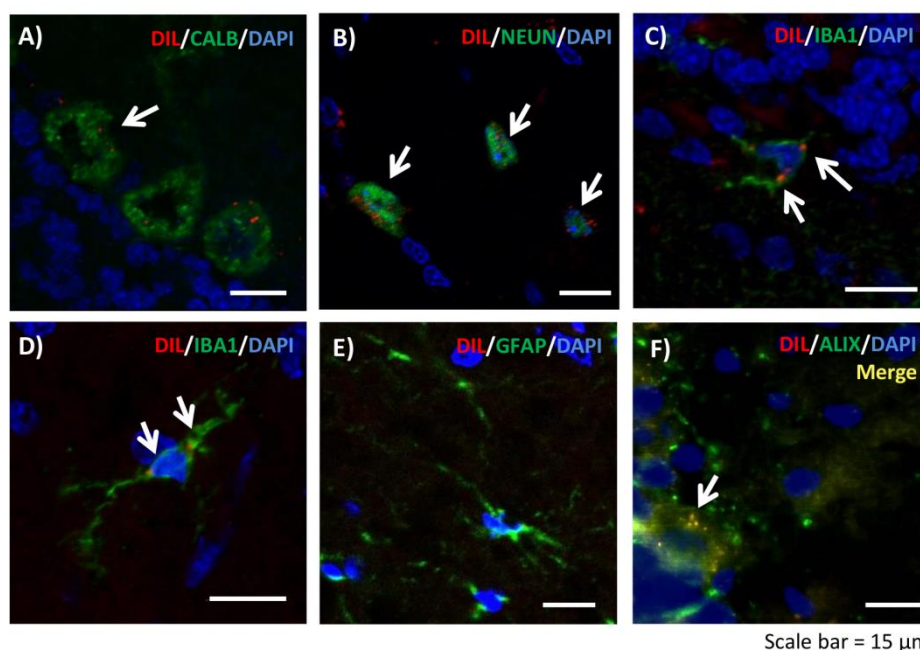


Figura 21. Las EVs marcadas con Dil (señal roja) alcanzan el cerebelo tras la inyección intravenosa. Se observó colocalización (señal verde) con (A) neuronas de Purkinje (marcadas con calbindina), (B) neuronas en la sustancia blanca (marcadas con NeuN), (C) microglía en la capa molecular (marcada con Iba1) y (D) microglía en la sustancia blanca (marcada con Iba1). (E) No se observó colocalización con astrocitos (marcados con GFAP) en la sustancia blanca. (F) Confirmamos que la señal roja colocalizaba con Alix, un marcador de vesículas extracelulares. Los núcleos aparecen marcados en azul (DAPI). Barra de escala = 15 μ m.

Se observó que las EVs marcadas (señal roja) colocalizaban con neuronas de Purkinje, marcadas en verde con calbindina (Fig. 21A), con neuronas en la sustancia blanca,

marcadas con NeuN (Fig. 21B), y con células de la microglía, marcadas con Iba1, tanto en la capa molecular (Fig. 21C) como en la sustancia blanca (Fig. 21D). No se observó co-localización con astrocitos, marcados con GFAP (Fig. 21E). La señal roja co-localizaba con Alix, un marcador de EVs, confirmando que correspondía a las EVs fluorescentes inyectadas (Fig. 21F).

1.2 Las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas inducen activación de microglía y astrocitos en cerebelo de ratas control.

A continuación se evaluó si las EVs de plasma de ratas hiperamonémicas transmiten efectos deletéreos al cerebelo de las ratas control.

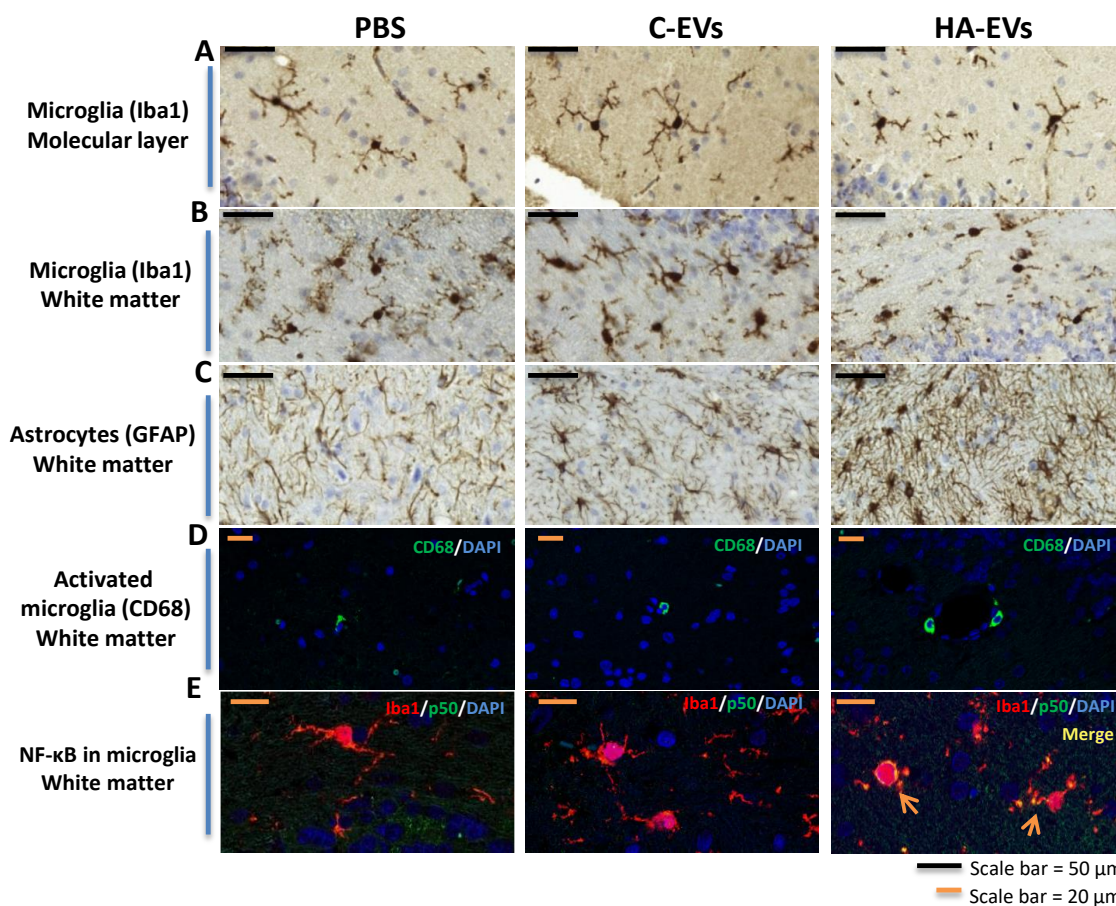


Figura 22. Efectos de las vesículas de ratas hiperamonémicas inyectadas sobre la activación de microglía y astrocitos en cerebelo de ratas control (I). Imágenes representativas de (A) inmunohistoquímica de Iba1 en capa molecular y (B) sustancia blanca, (C) inmunohistoquímica de GFAP en sustancia blanca, (D) inmunofluorescencia de CD68 en sustancia blanca y (E) subunidad p50 del factor NF-κB p50 en células de microglía en la sustancia blanca. Barras de escala = 50 y 20 μm, según se indica en la figura.

PBS = ratas control inyectadas con PBS; C-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de plasma de ratas control; HA-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas.

La microglía activada adquiere una forma más ameboide que la microglía en estado de reposo, pues disminuyen el tamaño y el número de sus ramificaciones. Por tanto, se analizó el área de las células de microglía (marcadas con Iba1), considerando una reducción en su área como una medida de activación.

Se observó que la inyección de HA-EVs inducía la activación de microglía en la capa molecular del cerebelo (Fig. 22A y 23A), reduciendo el área de las células positivas para Iba1 en comparación con las ratas inyectadas con vehículo ($354 \pm 20 \mu\text{m}^2$ en el grupo inyectado con HA-EVs respecto a $503 \pm 33 \mu\text{m}^2$ en el grupo inyectado con PBS, $p < 0.05$). Este efecto era específico para la inyección de HA-EVs y no se inducía en caso de inyectar EVs procedentes de plasma de ratas control (grupo C-EVs, $518 \pm 40 \mu\text{m}^2$).

La activación de microglía también se inducía de forma significativa en sustancia blanca ($393 \pm 8 \mu\text{m}^2$ en las ratas inyectadas con HA-EVs frente a $546 \pm 14 \mu\text{m}^2$ en las ratas control inyectadas con PBS, $p < 0.05$) (Fig. 22B y Fig. 23B), mientras que la inyección de EVs de ratas control no produjo ningún efecto ($553 \pm 23 \mu\text{m}^2$).

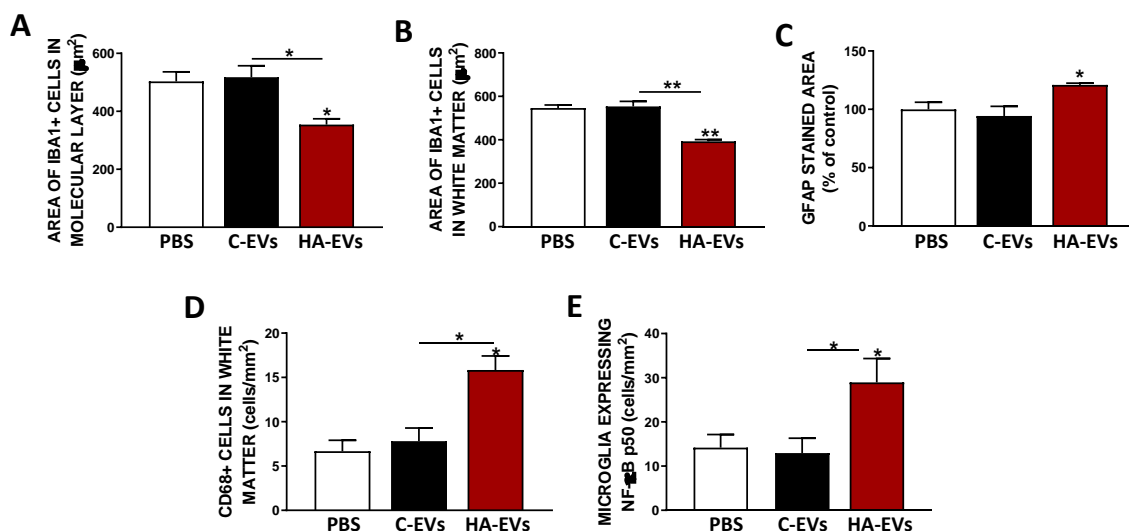


Figura 23. Efectos de las vesículas de ratas hiperamonémicas inyectadas sobre la activación de microglía y astrocitos en cerebelo de ratas control (II). (A) Área de la microglía (células marcadas con Iba1) en la capa molecular y (B) en la sustancia blanca. (C) Porcentaje de área teñida con GFAP en la sustancia blanca respecto al basal. (D) Número de células de microglía activadas por mm^2 (células positivas para CD68) en sustancia blanca. (E) Número de células de microglía que expresan la subunidad p50 de NF- κ B por mm^2 en la sustancia blanca. Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores son la media \pm SEM de 3-4 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes respecto al grupo de ratas inyectadas con vehículo (PBS) se indican con asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

PBS = ratas control inyectadas con PBS; C-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de plasma de ratas control; HA-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas.

La activación de microglía se confirmó por el aumento de células marcadas con CD68, un marcador de microglía activada, tal y como se muestra en la Figura 22D y 23D (16 ± 2 células positivas por mm^2 en ratas inyectadas con EVs de ratas hiperamonémicas frente a 7 ± 1 en ratas inyectadas con PBS, $p < 0.05$). La inyección de EVs de ratas control no alteró de forma significativa el número de células marcadas con CD68 (8 ± 1 células positivas por mm^2).

También se observó un aumento en el número de células de microglía que expresaban la subunidad p50 del factor de transcripción NF- κ B en las ratas inyectadas con EVs de ratas hiperamonémicas (29 ± 5 células doble positivas por mm^2 en ratas inyectadas con HA-EVs frente a 14 ± 3 en ratas inyectadas con PBS, $p < 0.05$) (Fig. 22E y Fig. 23E), mientras que la inyección de EVs de ratas control no produjo un efecto significativo (13 ± 3 células positivas por mm^2).

Respecto a la activación de los astrocitos, esta se evaluó analizando el porcentaje de área teñida por GFAP. En las Figuras 22C y 23C se observa que la inyección de EVs de ratas hiperamonémicas indujo un aumento significativo del área teñida por GFAP en sustancia blanca del cerebelo en comparación con las ratas inyectadas con vehículo (121 ± 2 %, $p < 0.05$). Este efecto no se observa en las ratas inyectadas con EVs de ratas control, que presentan valores similares a los del grupo inyectado con PBS (94 ± 8 %).

1.3 Las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas alteran el contenido en marcadores de neuroinflamación en cerebelo.

Para evaluar si la inyección de EVs de plasma de ratas hiperamonémicas inducía un aumento de marcadores pro-inflamatorios en cerebelo, se analizó el contenido de diferentes proteínas relacionadas con la neuroinflamación por Western blot en homogenados de cerebelo. También se analizó el contenido de proteínas implicadas en la inducción de incoordinación motora en hiperamonemia.

La inyección de EVs de ratas hiperamonémicas a ratas control aumentó el contenido del marcador de microglía activada CD68 (126 ± 7 %, $p < 0.05$) (Fig. 24A) y de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β (148 ± 10 %, $p < 0.01$) (Fig. 24B) y TNF α (152 ± 17 %, $p < 0.05$) (Fig. 24C), mientras que la inyección de EVs aisladas de ratas control no produjo este efecto (98 ± 7 %, 109 ± 10 % y 120 ± 16 %, respectivamente).

Por estudios previos del grupo, se sabe que en hiperamonemia hay un aumento en cerebelo de TNF α y de su receptor TNFR1, lo cual produce un aumento de expresión del factor NF- κ B en microglía y de glutaminasa 1, conduciendo a un aumento del transportador GAT3 en astrocitos activados y de la neurotransmisión GABAérgica, lo cual produce incoordinación motora (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018). Por ello, se analizó mediante Western blot el contenido en cerebelo de algunas de las proteínas clave en esta vía, además del TNF α mostrado arriba. Las ratas control inyectadas con HA-EVs hiperamonemia presentaban niveles aumentados de TNFR1 (133 ± 6 %, $p < 0.01$) (Fig. 24D), glutaminasa 1 (116 ± 6 %, $p < 0.05$) (Fig. 24E) y de GAT3 (142 ± 15 %, $p < 0.05$) (Fig. 24F) en comparación con las ratas inyectadas con PBS. La inyección de EVs de

ratas control no produjo ninguna alteración significativa en estas proteínas respecto a las inyectadas con PBS ($107 \pm 9 \%$, $97 \pm 5 \%$ y $113 \pm 9 \%$).

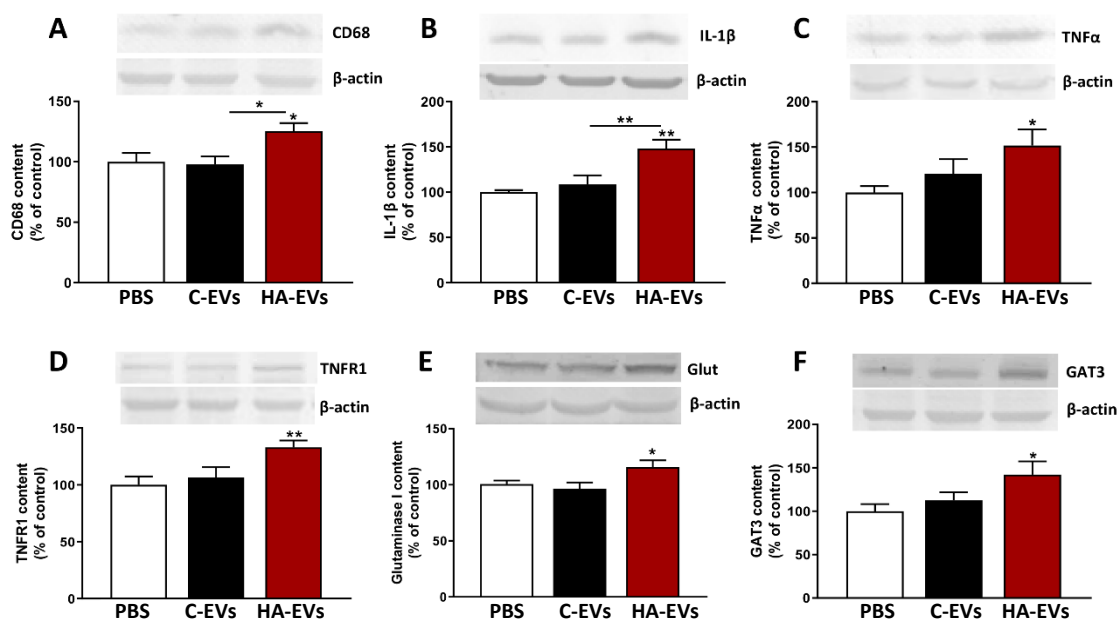


Figura 24. Contenido en cerebro de proteínas relacionadas con la neuroinflamación y la incoordinación motora. Contenido proteico analizado mediante Western blot de (A) CD68 (n = 9-11), (B) IL-1 β (n = 5-7), (C) TNF α (n = 9), (D) TNFR1 (n = 6-11), (E) glutaminasa 1 (n = 10-13) y (F) GAT3 (n = 10-12) en homogenados de cerebro. Se muestran imágenes representativas de las bandas para cada proteína, junto con las bandas correspondientes del control de carga (β -actina). Los valores se expresan como porcentaje respecto a las ratas control inyectadas con PBS y son la media \pm SEM. Para comparar los grupos se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes del grupo PBS o del grupo EV-C se indican con asterisco (*p < 0.05, **p < 0.01).

PBS = ratas control inyectadas con PBS; C-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de plasma de ratas control; HA-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas.

También se analizó el contenido de proteínas implicadas en la señalización purinérgica en los homogenados de cerebro, ya que esta se encuentra alterada en la microglía activada. Se midió el contenido proteico de los receptores purinérgicos P2X4R y P2X7R, aumentados en microglía activada; de BDNF, una citocina que aumenta cuando se activa P2X4R y de las citocinas CCL2 y CCL20, que contribuyen en los procesos de activación de la microglía, aumentando la expresión en membrana de los receptores purinérgicos (Tsuda e Inoue, 2016).

La inyección de HA-EVs aumentó los niveles de los receptores P2X4R ($130 \pm 10 \%$, p < 0.05) (Fig. 25A) y P2X7R ($128 \pm 8 \%$, p < 0.05) (Fig. 25B) respecto a las ratas inyectadas con PBS, mientras que las ratas inyectadas con EVs de ratas control no presentan un aumento significativo ($101 \pm 7 \%$ y $116 \pm 8 \%$, respectivamente).

Las ratas control inyectadas con HA-EVs también presentan un aumento en el contenido de BDNF, CCL2 y CCL20 respecto a las ratas inyectadas con PBS ($125 \pm 7 \%$, $p < 0.05$; $132 \pm 11 \%$, $p < 0.05$; y $142 \pm 12 \%$, $p < 0.001$, respectivamente) (Fig. 25C, 25D y 25E). La inyección de EVs de ratas control no produjo ninguna alteración significativa en el contenido de estas proteínas respecto a las inyectadas con PBS ($107 \pm 5 \%$, $101 \pm 5 \%$ y $111 \pm 5 \%$).

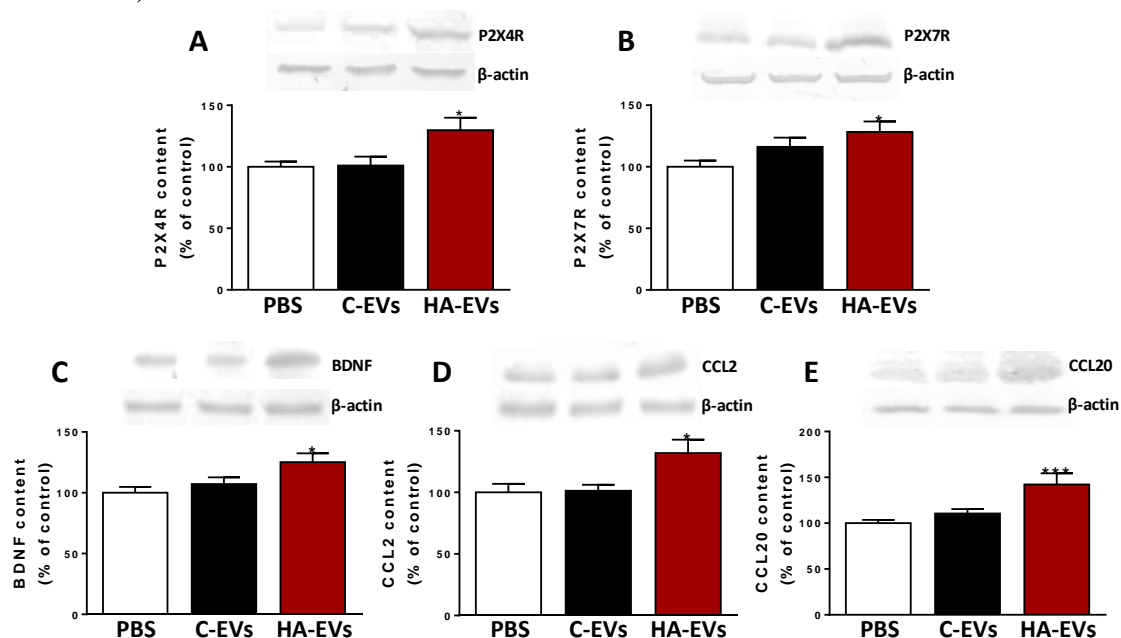


Figura 25. Contenido en cerebelo de proteínas relacionadas con la vía de activación de microglía mediante señalización purinérgica. Contenido proteico analizado mediante Western blot de (A) P2X4R (n = 12-18), (B) P2X7R (n = 14-18), (C) BDNF (n = 16-19), (D) CCL2 (n = 8-12) y (E) CCL20 (n = 9-12) en homogenados de cerebelo. Se muestran imágenes representativas de las bandas para cada proteína, junto con las bandas correspondientes del control de carga (β -actina). Los valores se expresan como porcentaje respecto a las ratas control inyectadas con PBS y son la media \pm SEM. Para comparar los grupos se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes del grupo PBS se indican con asterisco (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

PBS = ratas control inyectadas con PBS; C-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de plasma de ratas control; HA-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas.

Cabe destacar que los cambios observados en las ratas control inyectadas con EVs de ratas hiperamonémicas reproducen muchas de las alteraciones encontradas en cerebelo de ratas hiperamonémicas, como se comentará más en detalle en la Discusión.

1.4 Las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas inducen incoordinación motora en ratas control.

La hiperamonemia induce incoordinación motora, lo que se refleja en un aumento del número de resbalones en el test beam walking. En la Figura 26 se han incluido como referencia valores de ratas control y ratas hiperamonémicas (ambos grupos sin ningún tipo de inyección o tratamiento adicional): las ratas hiperamonémicas cometen 1.20 ± 0.12 resbalones, frente a los 0.83 ± 0.11 resbalones cometidos por las ratas control ($p < 0.05$). Las ratas control inyectadas con PBS o con EVs de ratas control presentaron un número de resbalones similar al de las ratas control sin inyección (Fig. 26), mostrando que la inyección *per se* no tenía un efecto sobre la incoordinación motora.

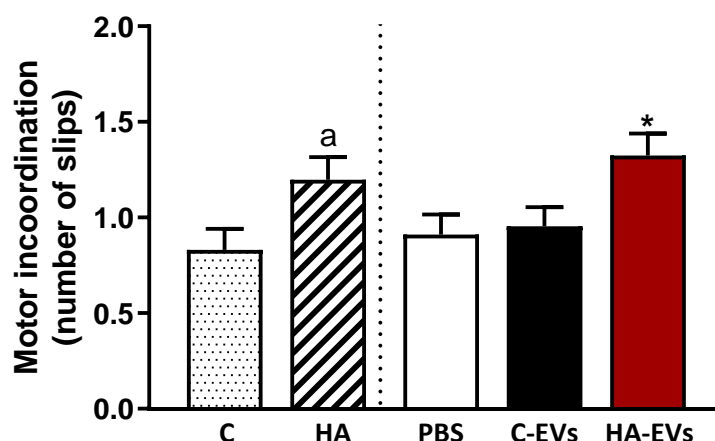


Figura 26. La inyección de vesículas extracelulares aisladas de plasma de ratas hiperamonémicas produce incoordinación motora en ratas control. Número de resbalones en el test Beam Walking. Se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey para comparar los grupos PBS, EV-C y EV-HA. Los valores son la media \pm SEM de 19-22 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes del grupo PBS o EV-C se indican con asterisco (* $p < 0.05$). Se han incluido como referencia el número de resbalones de ratas control (C) y ratas hiperamonémicas (HA) sin inyección ($n = 32-35$). Para comparar los grupos C y HA se realizó un T-test y los valores significativamente diferentes del grupo control se indican con a ($a = p < 0.05$).

C = ratas control; HA = ratas hiperamonémicas; PBS = ratas control inyectadas con PBS; C-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de plasma de ratas control; HA-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas.

Sin embargo, la inyección de vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas en ratas control aumentó significativamente el número de resbalones cometidos frente a las ratas control inyectadas con PBS o con EVs de ratas control, como se observa en la Figura 26 (1.32 ± 0.12 resbalones en comparación con 0.92 ± 0.11 en las ratas inyectadas con PBS y 0.95 ± 0.10 en las ratas inyectadas con EVs de ratas control, $p < 0.05$ en ambos casos). La incoordinación motora causada por la inyección de EVs de ratas hiperamonémicas fue comparable a la inducida por la hiperamonemia *per se* (1.32 ± 0.12 frente a 1.20 ± 0.12 resbalones).

EXPERIMENTOS *EX VIVO*

Para investigar en más detalle los mecanismos por los que las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas inducen neuroinflamación en cerebelo y producen incoordinación motora, utilizamos un sistema *ex vivo* en el que incubamos cortes de cerebelo de ratas control con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas.

En nuestro laboratorio se ha descrito previamente que, en las ratas hiperamonémicas, el TNF α activa a su receptor TNFR1, produciendo la translocación de NF- κ B al núcleo, lo que activa la transcripción de glutaminasa 1 en microglía activada. La glutaminasa genera glutamato, que es liberado al medio extracelular y captado por los astrocitos, junto con el ion sodio. Esta mayor entrada de sodio en los astrocitos lleva a la liberación de GABA hacia el medio extracelular a través del transportador GAT3, cuya función se encuentra invertida, y el aumento de GABA extracelular sería el responsable de la incoordinación motora en las ratas hiperamonémicas (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018).

Puesto que observamos un aumento de TNF α en las EVs de ratas hiperamonémicas, nuestra hipótesis es que este TNF α activa a su receptor TNFR1 en el cerebelo de las ratas control, llevando a la activación de NF- κ B y causando incoordinación motora mediante la misma vía que en las ratas hiperamonémicas. Para demostrar el papel del TNF α , investigamos si los efectos perjudiciales de las HA-EVs se prevenían si las vesículas se incubaban previamente con un anti-TNF α (infiximab) o si las vesículas se habían aislado de ratas hiperamonémicas tratadas con infiximab *in vivo*. También se comprobó si la adición de TNF α recombinante a los cortes de ratas control reproducía los efectos inducidos por la hiperamonemia o por las EVs de ratas hiperamonémicas.

Para las figuras de este apartado de experimentos *ex vivo*, las abreviaturas de los grupos experimentales corresponden a:

C = cortes de hipocampo de ratas control; HA = cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas; C+Infix = cortes de hipocampo de ratas control incubados con infiximab, anticuerpo contra TNF α ; C+rec TNF α = cortes de hipocampo de ratas control incubados con TNF α recombinante; C+HA-EVs = cortes de hipocampo de ratas control incubados con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas; C+HA-EVs+Infix = cortes de hipocampo de ratas control incubados con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas previamente incubadas con infiximab; C+HAInfix-EVs = cortes de hipocampo de ratas control incubados con vesículas extracelulares aisladas de ratas hiperamonémicas tratadas con infiximab.

1.5 La incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas induce activación de microglía y astrocitos en cortes de cerebelo de ratas control, en un proceso dependiente de TNF α .

La activación de la microglía se evaluó midiendo el área de las células marcadas con Iba1 mediante inmunohistoquímica. El área de las células de microglía se encontraba reducida en los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas frente a ratas control, tanto en la capa

molecular ($138 \pm 7 \mu\text{m}^2$ en comparación con $191 \pm 5 \mu\text{m}^2$, $p < 0.001$) como en sustancia blanca ($137 \pm 8 \mu\text{m}^2$ en comparación con $183 \pm 9 \mu\text{m}^2$, $p < 0.001$), indicando activación de la microglía (Fig. 27).

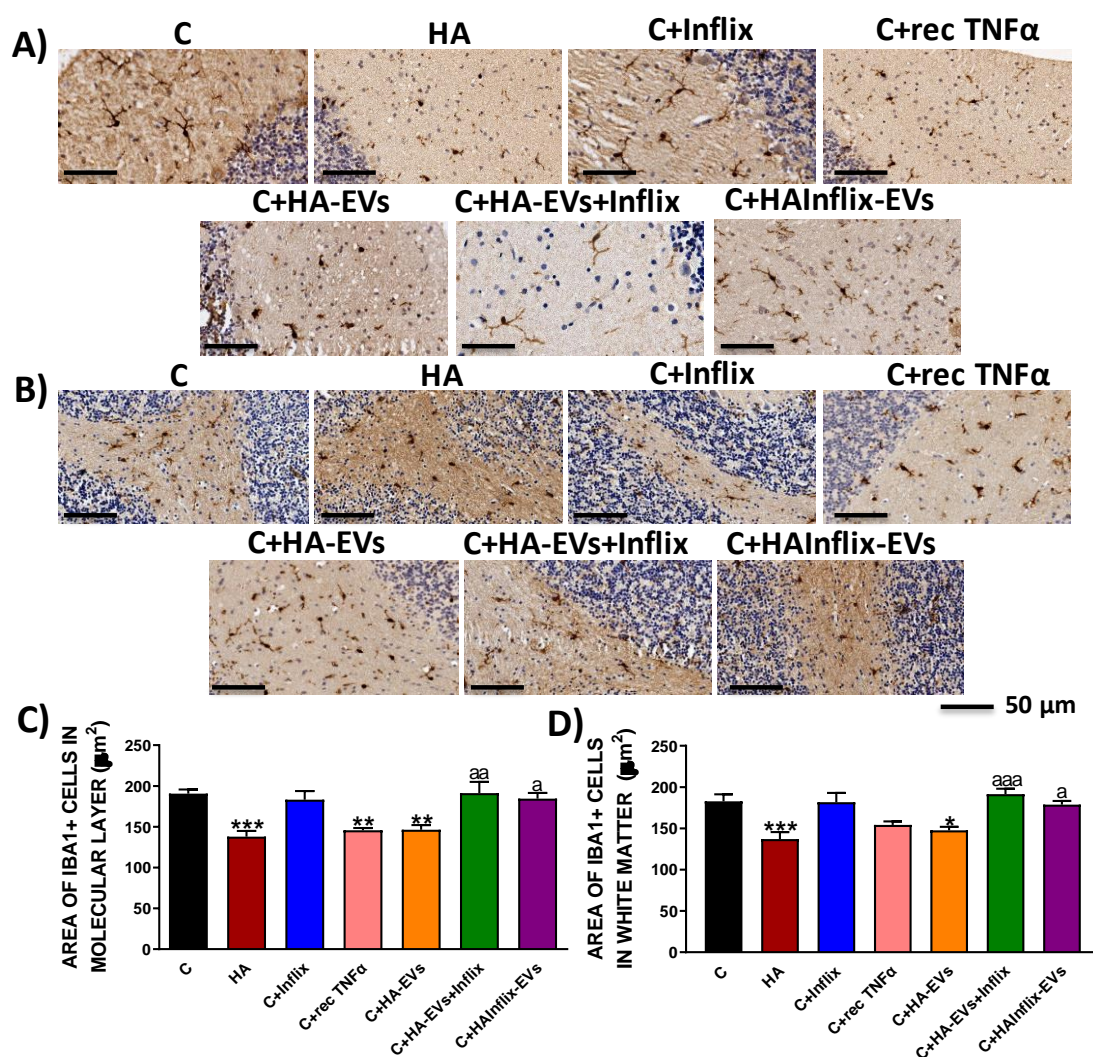


Figura 27. Activación de microglía en cortes de cerebelo tras la incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica contra Iba1 en cortes de cerebelo tras la incubación *ex vivo* (A) en la capa molecular y (B) en sustancia blanca. Área de la microglía (células marcadas con Iba1) (C) en la capa molecular ($n = 7-8$) y (D) en sustancia blanca ($n = 7-9$). Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores son la media \pm SEM. Los valores significativamente diferentes respecto al grupo control (C) se indican con asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) y los valores significativamente diferentes respecto al grupo C+HA-EVs se indican con a ($a = p < 0.05$, $aa = p < 0.01$, $aaa = p < 0.001$). Barra de escala = $50 \mu\text{m}$.

La incubación de cortes de cerebelo de ratas control con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas produjo una activación de la microglía similar a la de la hiperamonemia tanto en la capa molecular como en sustancia blanca ($146 \pm 6 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$ y $148 \pm 4 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$, respectivamente), que se prevenía si las EVs se habían tratado

previamente con infliximab para bloquear el TNF α (capa molecular: $191 \pm 14 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$; sustancia blanca: $191 \pm 7 \mu\text{m}^2$, $p < 0.001$) o si las EVs se habían aislado de ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab (capa molecular: $185 \pm 7 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$; sustancia blanca: $179 \pm 4 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$) (Fig. 27). La incubación de los cortes de ratas control con TNF α recombinante también indujo activación de la microglía en la capa molecular: $144 \pm 3 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$ y redujo el área de la microglía en sustancia blanca, aunque este efecto no fue significativo ($154 \pm 4 \mu\text{m}^2$) (Fig. 27).

La activación de los astrocitos se analizó midiendo el porcentaje de área teñida con GFAP en la sustancia blanca. El área teñida con GFAP se encontraba aumentada en los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas frente a ratas control ($121 \pm 5 \%$, $p < 0.05$), reflejando una activación de los astrocitos (Fig. 28). Este efecto se reprodujo al incubar *ex vivo* cortes de cerebelo de ratas control con EVs de ratas hiperamonémicas ($125 \pm 6 \%$, $p < 0.01$), pero no si las EVs se habían tratado previamente con infliximab ($105 \pm 5 \%$, $p < 0.05$) o si las EVs se habían aislado de ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab ($101 \pm 1 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 28). La incubación de los cortes control con TNF α recombinante también indujo activación de los astrocitos ($122 \pm 3 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 28).

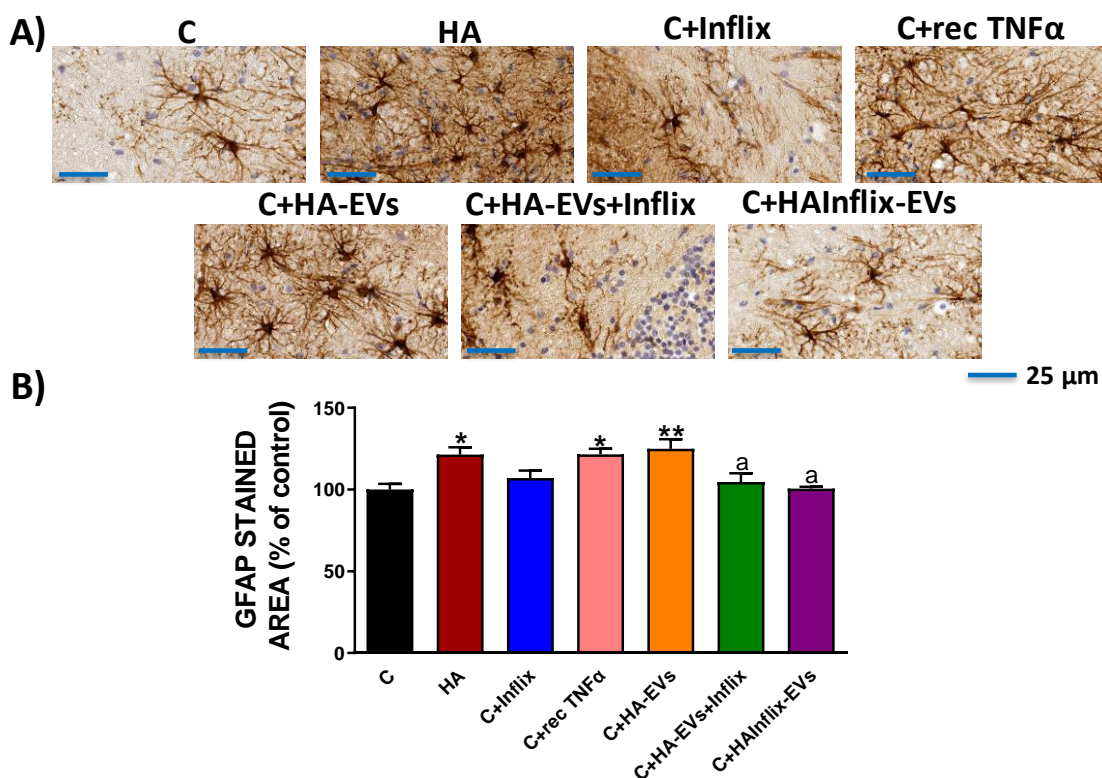


Figura 28. Activación de astrocitos en cortes de cerebelo tras la incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas. (A) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica contra GFAP en sustancia blanca. (B) Porcentaje de área teñida con GFAP respecto al grupo control (n = 6-9). Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores son la media \pm SEM. Los valores significativamente diferentes respecto al grupo control (C) se indican con asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) y los valores significativamente diferentes respecto al grupo C+HA-EVs se indican con a (a = $p < 0.05$). Barra de escala = 25 μm .

La incubación de los cortes de cerebelo control con infliximab no produjo ningún efecto significativo sobre la activación de microglía (capa molecular: $183 \pm 11 \mu\text{m}^2$; sustancia blanca: $182 \pm 11 \mu\text{m}^2$) (Fig. 27) o de astrocitos ($107 \pm 5 \%$) (Fig. 28).

1.6 El TNF α de las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas activa la vía de NF- κ B en cortes de cerebelo de ratas control.

Dado que la vía de señalización de NF- κ B en cerebelo es clave para la inducción de la incoordinación motora en ratas hiperamonémicas, se estudió si las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas activaban NF- κ B en cortes de cerebelo de ratas control y si este efecto era dependiente del TNF α de las EVs.

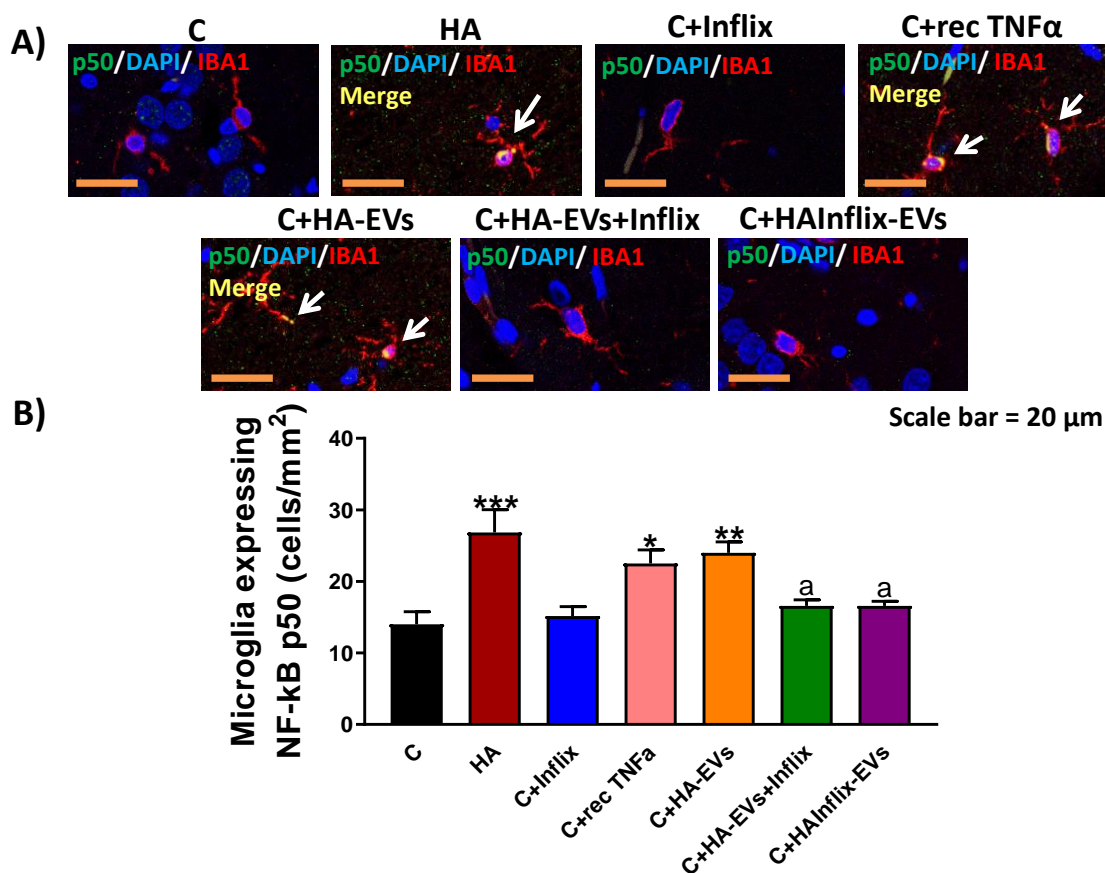


Figura 29. Activación de NF- κ B en microglía en cortes de cerebelo tras la incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas. (A) Imágenes representativas de doble inmunofluorescencia contra Iba1 (microglía, en rojo) y la subunidad p50 del factor NF- κ B p50 (en verde) en sustancia blanca. (B) Número de células de microglía que expresan la subunidad p50 de NF- κ B por mm 2 en la sustancia blanca (n = 6-7). Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores son la media \pm SEM. Los valores significativamente diferentes respecto al grupo control (C) se indican con asterisco (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001) y los valores significativamente diferentes respecto al grupo C+HA-EVs se indican con a (a = p < 0.05). Barra de escala = 20 μm .

Se observó que el número de células de microglía que expresaban la subunidad p50 del factor de transcripción NF- κ B en sustancia blanca estaba aumentado en los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas (27 ± 3 células/mm² frente a 14 ± 2 en cortes control, $p < 0.001$) y que la incubación de los cortes de cerebelo de ratas control con HA-EVs reprodujo este efecto (24 ± 2 células/mm², $p < 0.01$) (Fig. 29). En cambio, si se incubaban los cortes con EVs previamente tratadas con infliximab para bloquear el TNF α o con EVs procedentes de ratas tratadas con infliximab, no se producía la activación de NF- κ B (17 ± 1 células/mm², $p < 0.05$, en ambos casos) (Fig. 29). La incubación de los cortes de cerebelo de ratas control con TNF α recombinante aumentó la activación de NF- κ B en microglía (23 ± 2 células/mm², $p < 0.05$), mientras que la incubación con infliximab no indujo cambios en la activación de NF- κ B respecto a los cortes control (15 ± 1 células/mm²) (Fig. 29).

1.7 La incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas aumenta el contenido de proteínas relacionadas con la incoordinación motora en cortes de cerebelo de ratas control.

Tal y como se ha descrito previamente, algunas de las proteínas clave en la inducción de la incoordinación motora en ratas hiperamonémicas y que se encuentran aumentadas en el cerebelo de estas ratas son el TNF α , su receptor TNFR1, la enzima glutaminasa 1 y el transportador de GABA GAT3.

En la Figura 30 se observa el aumento de TNF α (134 ± 8 %, $p < 0.0001$) (Fig. 30A), TNFR1 (143 ± 9 %, $p < 0.0001$) (Fig. 30B), glutaminasa 1 (125 ± 6 %, $p < 0.01$) (Fig. 30C) y GAT3 (130 ± 6 %, $p < 0.0001$) (Fig. 30D) en los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas. La incubación de cortes de cerebelo de ratas control con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas produjo un aumento similar al de la hiperamonemia (TNF α : 127 ± 5 %, $p < 0.01$; TNFR1: 131 ± 6 %, $p < 0.01$; glutaminasa 1: 125 ± 4 %, $p < 0.01$; y GAT3: 125 ± 5 %, $p < 0.01$), que se prevenía si las EVs se habían tratado previamente con infliximab (TNF α : 98 ± 3 %, $p < 0.01$; TNFR1: 105 ± 7 %, $p < 0.05$; glutaminasa 1: 90 ± 8 %, $p < 0.0001$; y GAT3: 97 ± 4 %, $p < 0.01$) o si las EVs se habían aislado de ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab (TNF α : 103 ± 3 %, $p < 0.05$; TNFR1: 97 ± 2 %, $p < 0.01$; glutaminasa 1: 97 ± 2 %, $p < 0.01$; y GAT3: 97 ± 5 %, $p < 0.01$) (Fig. 30). La incubación de los cortes de cerebelo de ratas control con TNF α recombinante también aumentó el contenido de estas proteínas (TNF α : 121 ± 4 %, $p < 0.05$; TNFR1: 136 ± 7 %, $p < 0.01$; glutaminasa 1: 122 ± 3 %, $p < 0.05$; y GAT3: 120 ± 2 %, $p < 0.05$), mientras que la incubación de los cortes de cerebelo de ratas control con Infliximab no tuvo un efecto significativo sobre el contenido de ninguna de estas proteínas (TNF α : 102 ± 3 %; TNFR1: 102 ± 7 %; glutaminasa 1: 102 ± 3 %; y GAT3: 93 ± 4 %) (Fig. 30).

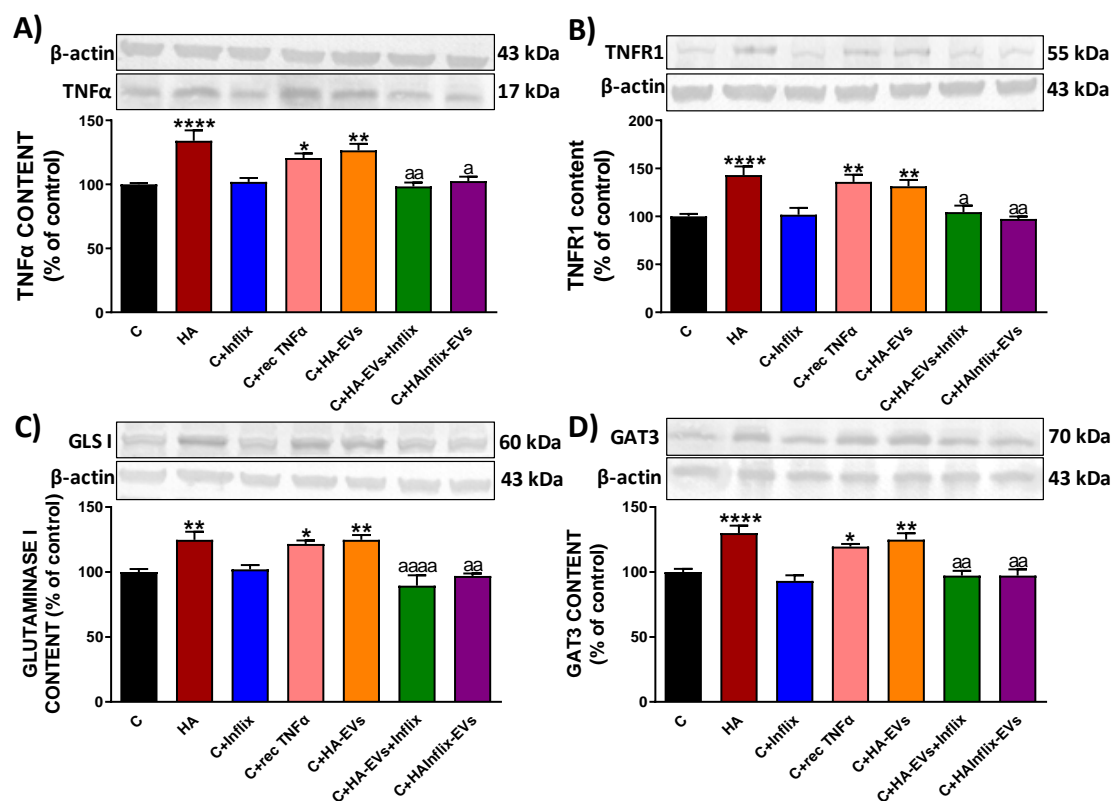


Figura 30. Efectos sobre el contenido de proteínas relacionadas con la incoordinación motora en cortes de cerebelo tras la incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas. Contenido proteico analizado mediante Western blot de (A) TNF α (n = 9-14), (B) TNFR1 (n = 8-12), (C) glutaminasa 1 (n = 9-13) y (D) GAT3 (n = 8-14) en homogenados de los cortes de cerebelo tras la incubación con los diferentes tratamientos *ex vivo*. Se muestran imágenes representativas de las bandas para cada proteína, junto con las bandas correspondientes del control de carga (β -actina). Los valores se expresan como porcentaje de contenido de proteína respecto a los cortes control y son la media \pm SEM. Para comparar los grupos se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes respecto al grupo control (C) se indican con asterisco (*p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001) y los valores significativamente diferentes respecto al grupo C+HA-EVs se indican con a (a = p < 0.05, aa = p < 0.01, aaaa = p < 0.0001).

DISCUSIÓN

Como se detalló en la introducción, los pacientes con cirrosis hepática pueden presentar encefalopatía hepática, un síndrome neuropsiquiátrico complejo que causa alteraciones cognitivas y motoras. La hiperamonemia y la inflamación son los principales factores que contribuyen al desarrollo de la encefalopatía hepática mínima (EHM). Los estudios en pacientes y en modelos animales muestran que la aparición de la EHM está asociada con cambios en el sistema inmune periférico que son transmitidos al cerebro, induciendo neuroinflamación, la cual conduce al deterioro cognitivo y motor (Dadsetan *et al.*, 2016a y 2016b; Mangas-Losada *et al.*, 2017; Cabrera-Pastor *et al.*, 2018 y 2019a; y Balzano *et al.*, 2020b). Los mecanismos por los que los cambios en el sistema inmune inducen alteraciones en el cerebro en respuesta a la inflamación crónica no se conocen en detalle.

En la literatura existen múltiples evidencias de que las vesículas extracelulares (EVs) podrían jugar un papel relevante en este proceso, ya que median parte de la respuesta inmune y de la respuesta inflamatoria en diferentes patologías con un componente inflamatorio (Ridder *et al.*, 2014; Hosseinkhani *et al.*, 2018; y Chan *et al.*, 2019). Las EVs pueden actuar como mediadores de la neuroinflamación (Gupta y Pulliam, 2014) y transmitir efectos patológicos de la periferia al cerebro. Por ejemplo, las EVs del suero de niños con autismo pueden estimular la microglía humana para que secrete IL-1 β , lo que podría ser el desencadenante de la inflamación en el cerebro de estos pacientes (Tsiloni y Theoharides, 2018). Sproviero *et al.* (2018) observaron que las EVs de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica transportan proteínas patológicas que podrían propagar la patología en el cerebro.

Han *et al.* (2019) demostraron que las EVs aisladas del suero de pacientes con enfermedad de Parkinson inducían agregación de proteínas como la α -sinucleína o la ubiquitina en cultivos de neuroblastos y desencadenaban la agregación de proteínas *in vivo* si se inyectaban por vía intravenosa a ratones control. Estas EVs también inducían cambios morfológicos en las neuronas y pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra*, similar a la observada en los pacientes. Se comprobó que las EVs inyectadas alcanzaban el cerebro, co-localizando con células de microglía, y que inducían neuroinflamación, activando la microglía en la *substantia nigra* y en el estriado y aumentando los niveles de la interleucina pro-inflamatoria IL-1 β . Además, los ratones inyectados con las EVs presentaban un deterioro de la coordinación motora. En cambio, la inyección de EVs aisladas de sujetos control no produjo estos efectos. Por tanto, la inyección de EVs de suero de pacientes con Parkinson a ratones control recapitulaba el fenotipo molecular y las alteraciones motoras presentes en los pacientes, indicando que las vesículas circulantes en sangre inducen efectos perjudiciales en cerebro y contribuyen a la patogénesis del Parkinson.

Este capítulo de la tesis se ha centrado en evaluar si las vesículas extracelulares periféricas (aisladas de plasma) de ratas hiperamonémicas pueden inducir neuroinflamación en cerebelo y producir alteraciones en la coordinación motora.

Los datos obtenidos muestran que las vesículas extracelulares aisladas de plasma de ratas hiperamonémicas alcanzan el cerebelo tras su inyección a ratas control y desencadenan los mecanismos que causan neuroinflamación e incoordinación motora en ratas hiperamonémicas. Esto confirma la hipótesis inicial de que las EVs circulantes en plasma contribuyen a la transmisión de los efectos de la inflamación periférica al cerebro para inducir neuroinflamación y déficits cognitivos y motores en hiperamonemia y encefalopatía hepática mínima. En cambio, la inyección de EVs aisladas de ratas control no indujo ningún efecto en el cerebro. Esto indica que los efectos observados son específicos de las EVs de hiperamonemia y que deben existir diferencias en el contenido de las vesículas procedentes de ratas hiperamonémicas respecto a las EVs de ratas control.

Por ello, se estudió el contenido de las EVs de plasma de ratas hiperamonémicas y de ratas control. El análisis de las proteínas diferencialmente expresadas muestra que las diferencias en el contenido proteico de las EVs están asociadas principalmente con procesos biológicos del sistema inmune, de la respuesta a estímulos y de procesos metabólicos. Respecto al tipo de proteínas alteradas, observamos diferencias en el contenido de proteínas relacionadas con la defensa/inmunidad, en moduladores enzimáticos y receptores, entre otras. Esto sugiere que la inflamación y los cambios en el sistema inmune inducidos por la hiperamonemia estarían alterando el contenido de las EVs en plasma. Resulta destacable el aumento del contenido de la citocina pro-inflamatoria TNF α y de su receptor TNFR1 en las EVs de ratas hiperamonémicas. Estas proteínas juegan un papel esencial en el mecanismo por el que la hiperamonemia y la encefalopatía hepática inducen incoordinación motora, por lo hipotetizamos que también serían responsables de los mecanismos inducidos por las EVs en ratas hiperamonémicas.

Otras proteínas enriquecidas en las EVs de ratas hiperamonémicas también podrían contribuir a este proceso, aunque su papel no se ha estudiado en detalle en el ámbito de esta tesis. Por ejemplo, la galectina-3 es un mediador inflamatorio (Thomas y Pasquini, 2018) que puede ser secretado en EVs (Bänfer *et al.*, 2018) y que está aumentado en las EVs de ratas hiperamonémicas. La galectina-3 actúa como un ligando endógeno del receptor TLR-4 e induce una respuesta inflamatoria dependiente de TLR-4 y su expresión está aumentada en células de microglía activadas con diferentes estímulos inflamatorios (Wesley *et al.*, 2013). La activación del TLR-4 dependiente de galectina-3 contribuye a la activación sostenida de la microglía, prolongando la respuesta inflamatoria en el cerebro (Burguillos *et al.*, 2015). Por tanto, sería posible que la galectina-3 contenida en las EVs de ratas hiperamonémicas pudiera estar contribuyendo a la inducción de la activación de la microglía en el cerebelo.

En esta tesis se ha observado que la hiperamonemia crónica aumenta la cantidad de EVs en plasma. Esto es consistente con investigaciones en otras patologías asociadas con la inflamación. Diferentes estudios han mostrado un aumento de EVs en el suero de pacientes con hepatitis alcohólica (Momen-Heravi *et al.*, 2015), β -talasemia (Manakeng *et al.*, 2019), cáncer de endometrio (Dziechciowski *et al.*, 2018) y cáncer de pulmón, correlacionando con el estado del tumor (Liu *et al.*, 2018), obesidad y diabetes mellitus

(Pardo *et al.*, 2018), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Tan *et al.*, 2017) y desórdenes del espectro autista (Tsilioni y Theoharides, 2018).

El tratamiento de ratas hiperamonémicas con el anti-TNF α infliximab normalizó los niveles de EVs en plasma, así como el contenido del TNF α y de su receptor TNFR1 en las vesículas. El infliximab es un anticuerpo monoclonal que actúa a nivel periférico, ya que no puede atravesar la barrera hematoencefálica, y se utiliza para el tratamiento de ciertas enfermedades con componente autoinmune e inflamatorio como la artritis reumatoide o la colitis ulcerosa. Previamente se ha demostrado que el infliximab revierte la inflamación periférica, la neuroinflamación en hipocampo y cerebelo, la incoordinación motora y los déficits de aprendizaje en ratas PCS, uno de los modelos animales de encefalopatía hepática investigados anteriormente en nuestro laboratorio (Dadsetan *et al.*, 2016a y 2016b). Balzano *et al.* (2020b) estudiaron los efectos de la administración de infliximab a ratas hiperamonémicas, observando que prevenía la inflamación periférica, activación de microglía y astrocitos en hipocampo y las alteraciones en la capacidad de aprendizaje, pero no la hiperamonemia. Esto indica que la neuroinflamación y los déficits cognitivos en las ratas hiperamonémicas no se deben principalmente a un efecto directo del exceso de amonio en el cerebro, sino a la inflamación periférica inducida por la hiperamonemia. Balzano *et al.* (2020b) indican que los mecanismos concretos por los que la inflamación periférica transmite los efectos al cerebro no se conocen en detalle y proponen como posibles mecanismos los siguientes: a) el transporte activo de citocinas pro-inflamatorias al cerebro; b) la activación de receptores de citocinas pro-inflamatorias en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, que desencadenarían la liberación de factores inflamatorios en el cerebro; c) la entrada directa de citocinas en regiones circundantes a los ventrículos cerebrales debido a un deterioro de la barrera hematoencefálica; y d) la infiltración de monocitos o linfocitos en el cerebro. A partir de la investigación realizada en esta tesis, podemos proponer como posible mecanismo adicional el transporte de citocinas pro-inflamatorias al cerebro mediante vesículas extracelulares circulantes en sangre. Este transporte podría estar aumentado en ratas hiperamonémicas, puesto que estas ratas presentan un mayor contenido de EVs en plasma en comparación con ratas control.

Las EVs circulantes en sangre pueden provenir de cualquier célula del organismo y en el futuro sería de interés estudiar si el aumento de EVs circulantes en ratas hiperamonémicas se debe a una mayor producción de vesículas por parte de un tipo o varios tipos celulares concretos, así como si el contenido de TNF α y de su receptor TNFR1 está aumentado en EVs que proceden de determinados tipos celulares o en todas las EVs circulantes. Aunque no podemos concretar la procedencia de las EVs de ratas hiperamonémicas, el hecho de que la administración de infliximab normalice los niveles de EVs en plasma y su contenido en TNF α y TNFR1 indica que las vesículas que transmiten los efectos patológicos al cerebro deben provenir del sistema inmune, ya que el infliximab actúa a nivel periférico.

En el experimento *in vivo*, demostramos que las vesículas inyectadas alcanzan el cerebelo, co-localizando principalmente con neuronas de Purkinje y microglía. Esto es consistente

con estudios previos en los que se muestra que las EVs pueden atravesar la barrera hematoencefálica. En el estudio de Han *et al.* (2019) citado anteriormente, las EVs de suero de pacientes con Parkinson alcanzaban el cerebro tras su inyección por vía intravenosa a ratones control, co-localizando con células de microglía. Li *et al.* (2018) demostraron que las vesículas aisladas de suero de ratones en los que se había inducido endotoxemia mediante LPS alcanzaban el cerebro tras ser inyectadas por vía intravenosa a ratones control, colocalizando principalmente con neuronas y microglía, y solo en un pequeño porcentaje con astrocitos. Ridder *et al.* (2014) purificaron EVs de células sanguíneas de ratones transgénicos que expresaban la recombinasa Cre de forma específica en el linaje hematopoyético y las inyectaron a ratones control. Estas vesículas transfirieron ARN funcional a diferentes tipos de neuronas, incluyendo neuronas de Purkinje en el cerebelo. La transferencia al cerebro de estas EVs estaba promovida por la inflamación periférica e inducía cambios fisiológicos relevantes, ya que las neuronas de Purkinje que incorporaban el ARN de las vesículas presentaban un perfil de microARNs diferente al de las neuronas que no lo habían incorporado. Estas observaciones revelan la existencia de un mecanismo de comunicación entre el sistema hematopoyético y el cerebro mediante EVs en respuesta a la inflamación.

Los efectos y el mecanismo de acción propuesto de las HA-EVs en ratas control se resumen en la Figura 31. La inyección de EVs aisladas de ratas hiperamonémicas indujo neuroinflamación e incoordinación motora en las ratas control, indicando que las EVs son suficientes para inducir alteraciones neurológicas asociadas a la hiperamonemia. El mecanismo por el que la hiperamonemia crónica induce incoordinación motora en las ratas se ha identificado recientemente en nuestro grupo, por lo que analizamos si este mismo mecanismo estaba siendo inducido por las EVs de ratas hiperamonémicas.

En ratas hiperamonémicas hay un aumento en cerebelo de TNF α y de su receptor TNFR1, lo cual produce un aumento de expresión del factor NF- κ B en la microglía y de la síntesis de proteínas como la glutaminasa 1, responsable de la producción de glutamato. En consecuencia, aumenta el contenido de glutamato, que es liberado al medio extracelular y captado por los astrocitos mediante los transportadores GLT1 y GLAST. Estos transportadores introducen iones de sodio en los astrocitos al internalizar el glutamato, alterando el gradiente de iones sodio, lo que induce la liberación del neurotransmisor GABA hacia el exterior de la célula por el transportador GAT3, cuya función está invertida en los astrocitos activados (libera GABA hacia el medio extracelular en vez de captarlo hacia el interior de la célula). Esta mayor concentración de GABA extracelular en el cerebelo es responsable de la incoordinación motora en las ratas hiperamonémicas (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018).

Observamos que la inyección de EVs de ratas hiperamonémicas (HA-EVs) a ratas control induce activación de microglía y astrocitos en cerebelo, al igual que sucede en el cerebelo de las ratas hiperamonémicas (Figura 31). Además, las HA-EVs aumentan el contenido de TNF α y de su receptor TNFR1 en cerebelo de ratas control, tanto *in vivo* como *ex vivo*. Una de las dianas de la vía de señalización canónica de TNFR1 es el factor de transcripción NF- κ B. Tras la unión del TNF α a su receptor, este se activa y recluta a un

conjunto de proteínas que activan las quinasas IKK, que fosforilan la proteína I κ B α , un inhibidor de la activación de NF- κ B. I κ B α se encuentra unido a las subunidades p50 y p65 de NF- κ B en el citosol, impidiendo su traslocación al núcleo. Al fosforilarse I κ B α , este se degrada en el proteasoma, liberando las subunidades p50 y p65 y permitiendo que se trasloquen al núcleo y activen la transcripción génica.

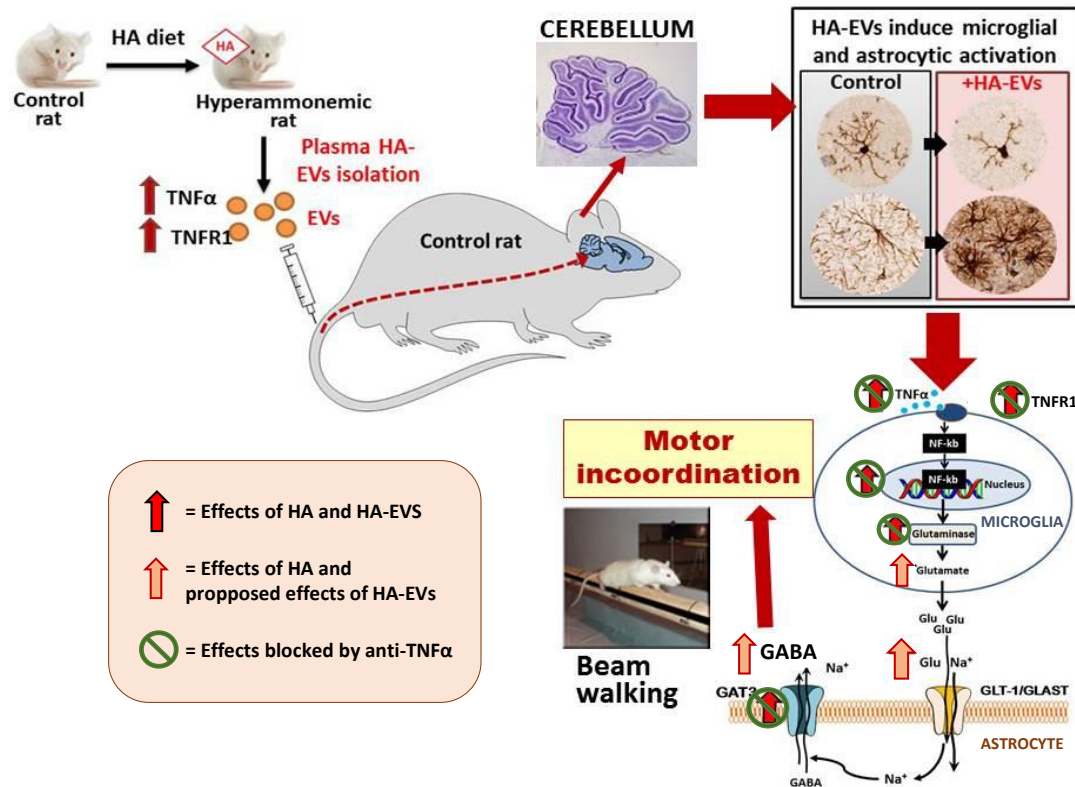


Figura 31. Resumen de los principales efectos de las vesículas extracelulares de plasma de ratas hiperamonémicas en cerebelo de ratas control: mecanismos subyacentes. Las vesículas extracelulares de plasma de ratas hiperamonémicas, con un mayor contenido en TNF α y TNFR1, alcanzan el cerebelo tras inyectarlas a ratas control, inducen activación de microglía y astrocitos y causan incoordinación motora. Los resultados obtenidos indican que estos efectos perjudiciales están mediados por el TNF α de las vesículas, que interacciona con su receptor TNFR1, activando el factor de transcripción NF- κ B. Esto induce la transcripción de genes como la glutaminasa, enzima que sintetiza glutamato. Con esto, se produce más glutamato, que es liberado al medio extracelular e internalizado en los astrocitos mediante transportadores GLT1 y GLAST. Estos transportadores introducen iones sodio (Na⁺) junto con el glutamato, modificando el gradiente de sodio. Esto a su vez revierte la función del transportador GAT3 en los astrocitos, que libera GABA hacia el espacio extracelular. El aumento de GABA extracelular es el responsable de incoordinación motora observada en ratas hiperamonémicas y en ratas control inyectadas con HA-EVs. *Imagen modificada de Cabrera-Pastor et al., 2018.*

Nuestros resultados muestran que las HA-EVs activan NF- κ B en la microglía en el cerebelo de las ratas control, ya que se detecta un aumento en el número de células de microglía positivas para p50 por inmunofluorescencia en el cerebelo de ratas control inyectadas con EVs de ratas hiperamonémicas y en los cortes de cerebelo de ratas control incubados con HA-EVs. Anteriormente se ha visto que la activación de NF- κ B induce la transcripción de la enzima glutaminasa (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018), por lo que medimos sus niveles en cerebelo tras la inyección de HA-EVs a ratas control y tras la incubación de los cortes de cerebelo de ratas control con HA-EVs, comprobando que aumentaba el contenido en glutaminasa. Esta enzima genera glutamato a partir de glutamina, con lo que aumentaría el contenido de glutamato en el interior de la célula y, en consecuencia, el contenido de glutamato extracelular. Esto concuerda tanto con los resultados de nuestro laboratorio en ratas hiperamonémicas como con otros estudios en los que se muestra que la microglía activada libera glutamato (Barger y Basile, 2001; Barger *et al.*, 2007) y que la liberación de glutamato inducida por TNF α en la microglía activada está mediada por un aumento de la expresión de glutaminasa (Takeuchi *et al.*, 2006). El glutamato extracelular es captado por los astrocitos mediante los transportadores de glutamato GLAST y GLT1. El transporte de cada molécula de glutamato mediante estos transportadores está acoplado al co-transporte de iones de sodio, lo que altera el gradiente electroquímico de la célula. Este gradiente de sodio afecta al transporte del neurotransmisor GABA.

En condiciones fisiológicas, los astrocitos captan GABA del medio extracelular a través del transportador GAT3, introduciendo sodio en el proceso. Sin embargo, el aumento de la concentración de Na⁺ es capaz de invertir el transporte de GABA mediado por GAT3 (Héja *et al.*, 2009 y 2012). Se ha demostrado que, en astrocitos activados, la función del transportador de GABA GAT3 se encuentra invertida, liberando GABA al medio extracelular. Wu *et al.* (2014) mostraron en un modelo murino de Alzheimer que los astrocitos activados en hipocampo liberaban GABA a través del transportador GAT3. Los astrocitos activados también liberan GABA mediante GAT3 en ratones con isquemia cerebral (Lin *et al.*, 2017). Las HA-EVs aumentaron el contenido del transportador GAT3 en el cerebelo de ratas control, al igual que ocurre en ratas hiperamonémicas. Con la información de la literatura, postulamos que la función de GAT3 está invertida en el cerebelo de las ratas control inyectadas con HA-EVs y en los cortes de cerebelo de ratas control incubados con HA-EVs, por lo que estaría aumentando el contenido de GABA extracelular. La neurotransmisión GABAérgica en cerebelo modula la coordinación motora y el aumento del tono GABAérgico produce incoordinación motora en diferentes condiciones (Hanchar *et al.*, 2005; Chiu *et al.*, 2005; Boix *et al.*, 2010). En ratas hiperamonémicas, reducir el GABA extracelular, modulando los receptores GABA_A con el neuroesteroide pregnenolona sulfato (Gonzalez-Usano *et al.*, 2014) o inhibiendo la vía TNFR1-NF- κ B-glutaminasa-GAT3 descrita mediante la administración de GMPc extracelular restaura la coordinación motora (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018). Por lo tanto, proponemos que las vesículas de ratas hiperamonémicas inducen incoordinación motora en ratas control debido al aumento del GABA extracelular producido por la inducción de la vía TNFR1-NF- κ B-glutaminasa-GAT3 en cerebelo.

Existen algunos estudios que sugieren un papel del TNF α contenido en las vesículas extracelulares en la inducción de efectos inflamatorios. Zhang *et al.* (2006) observaron que los exosomas derivados de fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide contenían TNF α , el cual era capaz de activar la vía de NF- κ B en fibroblastos. Obregon *et al.* (2009) observaron que las vesículas derivadas de células dendríticas activadas con LPS transportaban tanto TNF α soluble como sus receptores TNFR1 y TNFR2. En este estudio demostraron que las vesículas derivadas de las células dendríticas activadas eran internalizadas por células epiteliales e inducían la liberación de moléculas pro-inflamatorias. Gao *et al.* (2016) demostraron que las vesículas extracelulares derivadas de células dendríticas estimuladas con LPS aumentaban la producción de marcadores de inflamación al ser añadidas a cultivos de células endoteliales, en un proceso dependiente de TNF α y mediado por la activación de la vía de NF- κ B. En el estudio realizado por Han *et al.* (2019), en el que se observaba que las EVs de suero de pacientes con Parkinson transmitían efectos patológicos al cerebro tras ser inyectadas a ratones control, se detectó un aumento en el contenido de IL-1 β y de TNF α en las vesículas de pacientes respecto a las aisladas de sujetos control, sugiriendo que las EVs podían transportar estas citocinas pro-inflamatorias al cerebro, induciendo neuroinflamación.

Con esta información y tras demostrar que las EVs de ratas hiperamonémicas presentan un mayor contenido de TNF α , evaluamos el papel del TNF α contenido en las vesículas mediante experimentos *ex vivo* en cortes de cerebelo de ratas control. Los resultados de estos experimentos demuestran que el TNF α de las HA-EVs es una molécula clave en la inducción de los efectos patológicos en el cerebelo de ratas control, ya que los efectos de las HA-EVs sobre la activación de microglía y astrocitos en cortes de cerebelo de ratas control se prevenían si las EVs de ratas hiperamonémicas se incubaban previamente con un anti-TNF α (infiximab) o si las EVs provenían de ratas hiperamonémicas tratadas con infiximab. En cambio, los efectos se reproducían si los cortes de cerebelo de ratas control se incubaban con TNF α recombinante. Por ello, evaluamos si determinados pasos clave de la vía descrita como mecanismo de acción de las HA-EVs también eran dependientes de TNF α . Demostramos que el aumento de TNF α y de su receptor TNFR1 en los cortes de cerebelo de ratas control inducido por las HA-EVs no se producía si se bloqueaba el TNF α de las vesículas, mientras que se reproducía si se incubaban los cortes con TNF α recombinante. La incubación con EVs procedentes de ratas hiperamonémicas tratadas con infiximab, en las que el contenido de TNF α es similar al de las EVs aisladas de plasma ratas control, tampoco aumentó el contenido de TNF α ni de TNFR1 en cerebelo. De forma similar, la activación de NF- κ B en microglía inducida por las HA-EVs no se produjo al bloquear el TNF α de las EVs o al incubar los cortes con EVs de ratas tratadas con infiximab, y se reprodujo al añadir TNF α recombinante a los cortes. Por consiguiente, los niveles de glutaminasa y de GAT3 en los cortes de cerebelo de ratas control incubados con HA-EVs previamente incubadas con infiximab o con EVs de ratas tratadas con infiximab fueron similares a los de los cortes de cerebelo control basales, mientras que la incubación de los cortes de cerebelo de ratas control con TNF α recombinante aumentó el contenido de glutaminasa y GAT3.

En resumen, las EVs de plasma de ratas hiperamonémicas transportan los componentes necesarios y suficientes para inducir las alteraciones observadas en el cerebelo de las ratas hiperamonémicas que contribuyen a la incoordinación motora. Esto indica que el transporte al cerebro de EVs periféricas es un nuevo mecanismo por el que la inflamación periférica puede transmitir efectos perjudiciales al cerebro, induciendo neuroinflamación en el cerebelo y afectando a la función motora. En este capítulo hemos demostrado que estos efectos son dependientes del TNF α contenido en las vesículas y proponemos que las HA-EVs actuarían según el mecanismo esquematizado en la Figura 31.

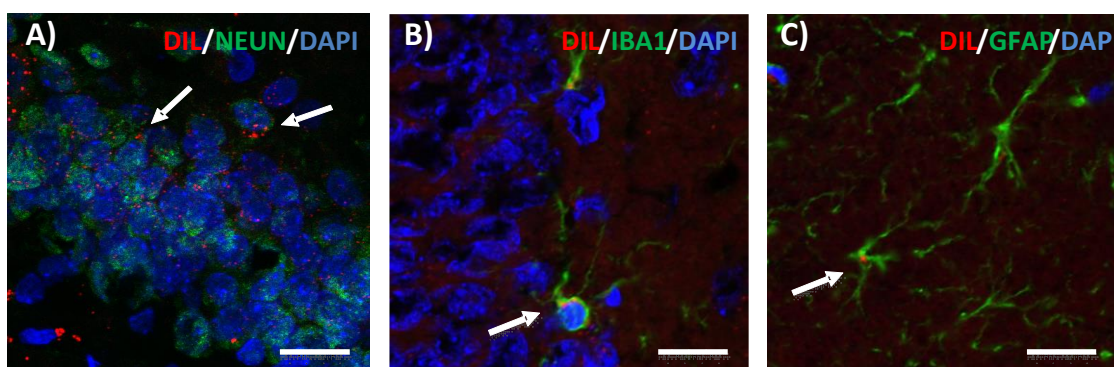
CAPÍTULO 2. Las EVs de plasma de ratas hiperamonémicas inducen neuroinflamación en el hipocampo y déficits de memoria en ratas control.

EXPERIMENTOS *IN VIVO*

En este apartado se describirán los resultados observados en hipocampo del experimento *in vivo* en el que se inyectaron EVs de ratas hiperamonémicas a ratas control.

2.1 Las vesículas inyectadas alcanzan el hipocampo.

Para confirmar que las vesículas inyectadas alcanzaban el hipocampo, se marcaron las EVs de plasma de ratas hiperamonémicas con el fluoróforo lipofílico Dil, se inyectaron por vía intravenosa en ratas control y se evaluó su presencia en hipocampo a las 72 h post-inyección (Fig. 32). Se observó que las EVs marcadas (señal roja) colocalizaban con neuronas de la capa granular, marcadas con NeuN (Fig. 32A), con microglía, marcada con Iba1 (Fig. 32B) y, en menor medida, con astrocitos, marcados con GFAP (Fig. 32C).



Scale bar = 15 μm

Figura 32. Las EVs marcadas con Dil (señal roja) alcanzan el hipocampo tras la inyección intravenosa. Se observó colocalización con (A) neuronas de la capa granular (marcada con NeuN), (B) microglía (marcada con Iba1) y (C) con astrocitos (marcados con GFAP). Núcleos marcados en azul con DAPI. Barra de escala = 15 μm.

2.2 Las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas inducen activación de microglía y astrocitos en hipocampo de ratas control.

La inyección de EVs de ratas hiperamonémicas indujo la activación de microglía en hipocampo (Fig. 33A y 33C), reduciendo el área de las células marcadas con Iba1 en comparación con las ratas inyectadas con vehículo ($491 \pm 44 \mu\text{m}^2$ en el grupo inyectado con EVs de ratas hiperamonémicas respecto a $637 \pm 27 \mu\text{m}^2$ en el grupo inyectado con PBS, $p < 0.05$). Este efecto era específico para la inyección de EVs de ratas hiperamonémicas y no se indujo cuando se inyectaron EVs procedentes de plasma de ratas control (grupo C-EVs, $607 \pm 29 \mu\text{m}^2$).

Las ratas inyectadas con EVs de ratas hiperamonémicas también presentaban activación de astrocitos en hipocampo (Fig. 33B y 33D) con un mayor porcentaje de area teñida con GFAP ($120 \pm 2 \%$ en el grupo HA-EVs respecto al grupo inyectado con PBS, $p < 0.05$),

mientras que las ratas inyectadas con EVs de ratas control presentaban niveles similares a las controles ($106 \pm 5 \%$).

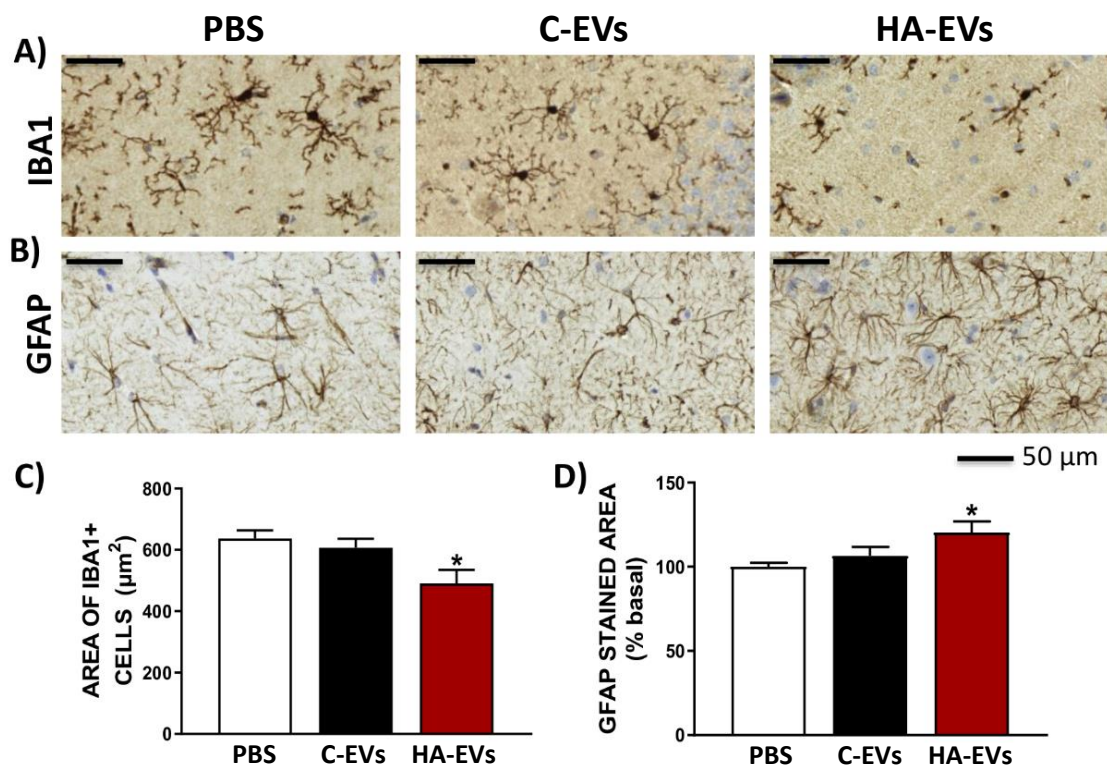


Figura 33. Efectos de las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas inyectadas sobre la activación de microglía y astrocitos en hipocampo de ratas control. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica contra (A) Iba1 y (B) GFAP en hipocampo. (C) Área de la microglía (células marcadas con Iba1, $n = 5$). (D) Porcentaje de área teñida con GFAP respecto a las ratas inyectadas con PBS ($n = 6-7$). Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores son la media \pm SEM. Los valores significativamente diferentes del grupo de ratas inyectadas con vehículo (PBS) se indican con asterisco (* $p < 0.05$). Barra de escala = 50 μm , según se indica en la figura.

PBS = ratas control inyectadas con PBS; C-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de plasma de ratas control; HA-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas.

2.3 Las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas alteran el contenido en marcadores de neuroinflamación en hipocampo.

Para evaluar si la inyección de EVs de plasma de ratas hiperamonémicas inducía un aumento de marcadores pro-inflamatorios en hipocampo, se analizó el contenido de diferentes proteínas relacionadas con la neuroinflamación por Western blot en homogenados de hipocampo.

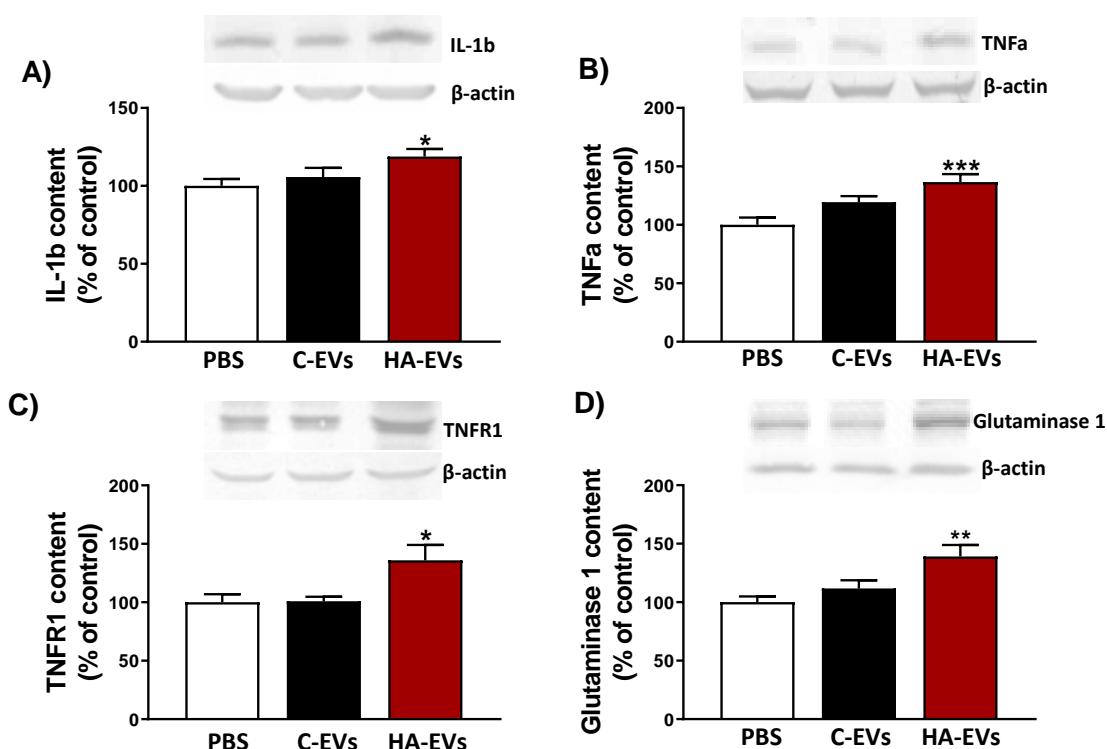


Figura 34. Contenido de proteínas relacionadas con la neuroinflamación en hipocampo. Contenido proteico analizado mediante Western blot de (A) IL-1 β (n = 11-12), (B) TNF α (n = 10-11), (C) TNFR1 (n = 8-10) y (D) Glutaminasa 1 (n = 11-14) en homogenados de hipocampo. Se muestran imágenes representativas de las bandas para cada proteína, junto con las bandas correspondientes del control de carga (β -actina). Los valores se expresan como porcentaje de contenido de proteína respecto a las ratas control inyectadas con PBS y son la media \pm SEM. Para comparar los grupos se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes del grupo de ratas inyectadas con PBS se indican con asterisco (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

PBS = ratas control inyectadas con PBS; C-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de plasma de ratas control; HA-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas.

La inyección de EVs de ratas hiperamonémicas (HA-EVs) a ratas control aumentó el contenido de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β (119 ± 5 %, p < 0.05) (Fig. 34A) y TNF α (137 ± 7 %, p < 0.001) (Fig. 34B), mientras que la inyección de EVs aisladas de ratas control no produjo este efecto (106 ± 6 % y 119 ± 5 %, respectivamente). Las ratas control inyectadas con HA-EVs también presentaban niveles aumentados de TNFR1 (136 ± 13 %, p < 0.05) (Fig. 34C) y de glutaminasa 1 (139 ± 10 %, p < 0.01) (Fig. 34D) en comparación con las ratas inyectadas con PBS. La inyección de EVs de ratas control no produjo ninguna alteración significativa en estas proteínas respecto a las inyectadas con PBS (101 ± 4 % y 112 ± 7 %, respectivamente).

En cuanto a las proteínas implicadas con la señalización purinérgica, la inyección de EVs de ratas hiperamonémicas aumentó los niveles de los receptores P2X4R (136 ± 9 %,

$p < 0.05$) (Fig. 35A) y P2X7R ($129 \pm 11 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 35B) respecto a las ratas inyectadas con PBS, mientras que las ratas inyectadas con EVs de ratas control no presentan un aumento significativo ($112 \pm 11 \%$ y $111 \pm 7 \%$, respectivamente). Las ratas control inyectadas con HA-EVs también presentaban un aumento en el contenido de BDNF, CCL2 y CCL20 en comparación con las ratas inyectadas con PBS ($124 \pm 6 \%$, $p < 0.05$; $140 \pm 10 \%$, $p < 0.05$; y $127 \pm 7 \%$, $p < 0.01$, respectivamente) (Fig. 35C, 35D y 35E). La inyección de EVs de ratas control no produjo ninguna alteración significativa en el contenido de estas proteínas respecto a las inyectadas con PBS ($89 \pm 7 \%$, $125 \pm 12 \%$ y $92 \pm 6 \%$).

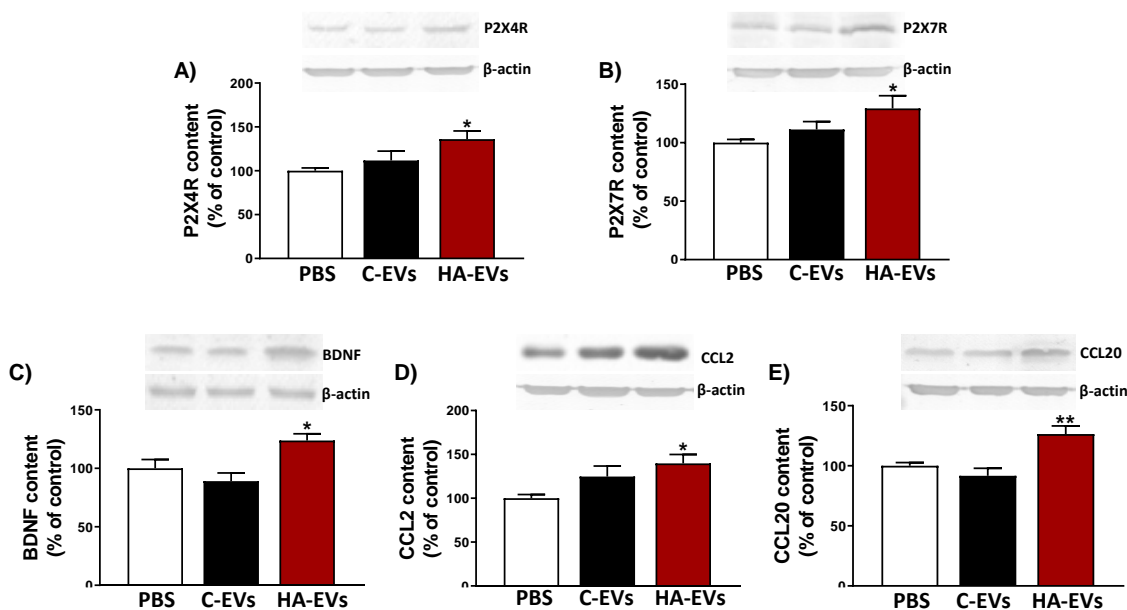


Figura 35. Contenido de proteínas relacionadas con la activación de microglía en hipocampo. Contenido proteico analizado mediante Western blot de (A) P2X4R (n = 9-11), (B) P2X7R (n = 11), (C) BDNF (n = 10-11), (D) CCL2 (n = 9-10) y (E) CCL20 (n = 8-10) en homogenados de hipocampo. Se muestran imágenes representativas de las bandas para cada proteína, junto con las bandas correspondientes del control de carga (β -actina). Los valores se expresan como porcentaje respecto a las ratas control inyectadas con PBS y son la media \pm SEM. Para comparar los grupos se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes del grupo de ratas control inyectadas con PBS se indican con asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

PBS = ratas control inyectadas con PBS; C-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de plasma de ratas control; HA-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas.

2.4 Las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas inducen déficits cognitivos en ratas control.

Las ratas hiperamonémicas presentan alteraciones cognitivas resultantes de la neuroinflamación y las alteraciones funcionales que ocurren en el hipocampo.

En la Figura 36 se muestra la ratio de discriminación en los test de memoria de localización de objetos (OLM o NOL) (Fig. 36A) y de memoria de reconocimiento de objetos (ORM o NOR) (Fig. 36B), incluyendo valores de referencia de ratas control (C) e hiperamonémicas (HA) sin inyección. Como puede observarse, las ratas hiperamonémicas presentan menores ratios de discriminación en comparación con las ratas control en el OLM (0.13 ± 0.03 frente a 0.32 ± 0.04 , $p < 0.05$) y en el ORM (0.37 ± 0.03 frente a 0.50 ± 0.03 , $p < 0.05$), indicando peor función cognitiva en estas tareas.

La inyección de EVs de ratas hiperamonémicas redujo la ratio de discriminación en ambos test cognitivos (OLM: 0.05 ± 0.03 frente a 0.22 ± 0.05 en el grupo PBS, $p < 0.05$; ORM: 0.34 ± 0.08 frente a 0.56 ± 0.03 en el grupo PBS, $p < 0.05$) (Fig. 36), indicando que las HA-EVs inducen un déficit tanto en la memoria de localización como la de reconocimiento de objetos. La disminución en ambas ratios fue similar a la observada en ratas hiperamonémicas, que presentaban valores de 0.13 ± 0.03 en el OLM y de 0.37 ± 0.03 en el ORM. Por otra parte, la inyección de EVs de ratas control a ratas control no produjo efectos en ninguno de los dos test (OLM: ratio de 0.24 ± 0.05 en el grupo C-EVs frente a 0.22 ± 0.05 en el grupo PBS; ORM: ratio de 0.56 ± 0.03 en el grupo C-EVs frente a 0.56 ± 0.03 en el grupo PBS) (Fig. 36).

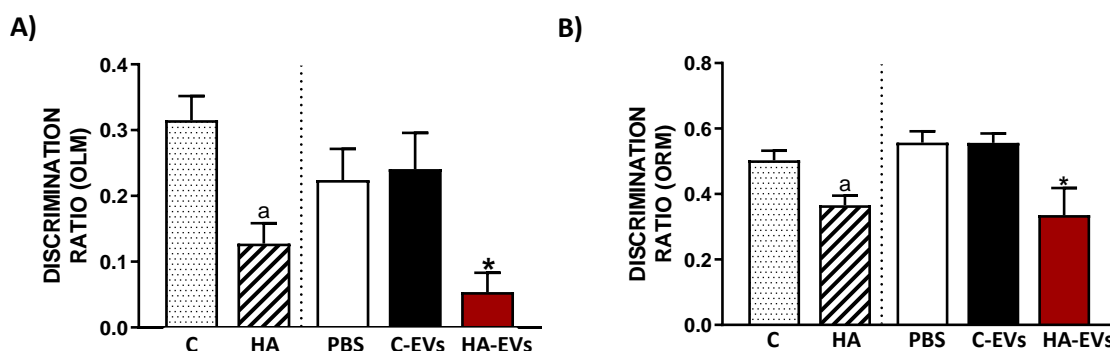


Figura 36. La inyección de vesículas extracelulares aisladas de plasma de ratas hiperamonémicas a ratas control deteriora la memoria de localización de objetos y la memoria de reconocimiento de objetos. Ratio de discriminación en los test de (A) memoria de localización de objetos (OLM) ($n = 10-13$) y (B) memoria de reconocimiento de objetos (ORM) ($n = 7-8$). Los valores son la media \pm SEM. Se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey para comparar los grupos PBS, C-EVs y HA-EVs. Los valores significativamente diferentes del grupo PBS se indican con asterisco (* $p < 0.05$). Se han incluido como referencia las ratios de discriminación de ratas control (C) y ratas hiperamonémicas (HA) sin inyección. Para comparar los grupos C y HA se realizó un T-test y los valores significativamente diferentes del grupo control se indican con a ($a = p < 0.05$).

C = ratas control; HA = ratas hiperamonémicas; PBS = ratas control inyectadas con PBS; C-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de plasma de ratas control; HA-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas.

También se evaluó la memoria a corto plazo medida en el laberinto en Y. Como se observa en la Figura 37, las ratas hiperamonémicas presentan una ratio de discriminación menor que las ratas control en esta tarea (0.46 ± 0.04 frente a 0.71 ± 0.06 , $p < 0.01$). Las ratas control inyectadas con EVs de ratas hiperamonémicas muestran una ratio significativamente inferior a la de las ratas inyectadas con vehículo (0.44 ± 0.05 en el grupo HA-EVs respecto a 0.67 ± 0.05 en el grupo PBS, $p < 0.01$) y comparable a la de las ratas hiperamonémicas incluidas como referencia (grupo HA: 0.46 ± 0.04) (Fig. 37). Este efecto no se observó en las ratas control inyectadas con EVs de ratas control, cuya ratio de discriminación es similar a la de las ratas inyectadas con PBS (0.60 ± 0.03 en el grupo C-EVs respecto a 0.67 ± 0.05 en el grupo PBS).

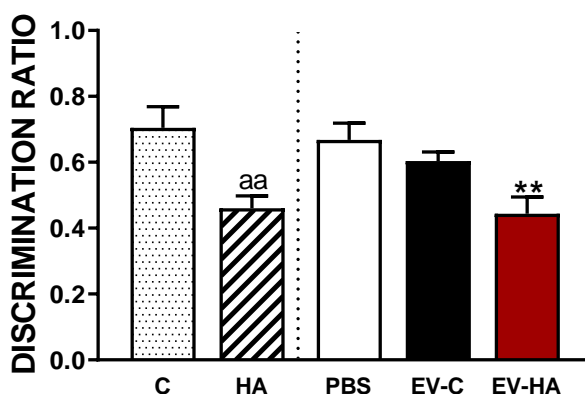


Figura 37. La inyección de EVs de ratas hiperamonémicas a ratas control reduce la memoria a corto plazo evaluada en el laberinto en Y. Ratio de discriminación en un paradigma de memoria a corto plazo medido en el laberinto en Y, según lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. Los valores son la media \pm SEM de 10-15 ratas por grupo. Se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey para comparar los grupos PBS, C-EVs y HA-EVs. Los valores significativamente diferentes del grupo PBS se indican con asterisco (** $p < 0.01$). Se han incluido como referencia las ratios de discriminación de ratas control (C) y ratas hiperamonémicas (HA) sin inyección. Para comparar los grupos C y HA se realizó un T-test y los valores significativamente diferentes del grupo control se indican con a (aa = $p < 0.01$).

C = ratas control; HA = ratas hiperamonémicas; PBS = ratas control inyectadas con PBS; C-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de plasma de ratas control; HA-EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas.

EXPERIMENTOS *EX VIVO*

Para investigar en más detalle los mecanismos por los que las vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas inducen neuroinflamación en hipocampo y producen déficits cognitivos, utilizamos un sistema *ex vivo* en el que incubamos cortes de hipocampo de ratas control con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas.

Al igual que en el Capítulo 1, partimos de la hipótesis de que las EVs de ratas hiperamonémicas estarían produciendo los efectos perjudiciales mediante el TNF α , que se encuentra aumentado en las HA-EVs. Para evaluar esta hipótesis, realizamos los mismos tratamientos descritos en el experimento *ex vivo* en cortes de cerebelo: HA-EVs previamente incubadas con un anti-TNF α (infiximab), EVs aisladas de ratas hiperamonémicas tratadas con infiximab *in vivo* o TNF α recombinante.

Para las figuras de este apartado de experimentos *ex vivo*, las abreviaturas de los grupos experimentales corresponden a:

C = cortes de hipocampo de ratas control; HA = cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas; C+Infix = cortes de hipocampo de ratas control incubados con infiximab, anticuerpo contra TNF α ; C+rec TNF α = cortes de hipocampo de ratas control incubados con TNF α recombinante; C+HA-EVs = cortes de hipocampo de ratas control incubados con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas; C+HA-EVs+Infix = cortes de hipocampo de ratas control incubados con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas previamente incubadas con infiximab; C+HAInfix-EVs = cortes de hipocampo de ratas control incubados con vesículas extracelulares aisladas de ratas hiperamonémicas tratadas con infiximab.

2.5 La incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas induce activación de microglía y astrocitos en cortes de hipocampo de ratas control.

Los efectos sobre la activación de la microglía se presentan en la Figura 38A y 38C. El área de las células de microglía, teñidas con Iba1, se encontraba reducida en los cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas frente a ratas control ($174 \pm 6 \mu\text{m}^2$ en comparación con $236 \pm 12 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$), indicando activación de la microglía. La incubación de cortes de hipocampo de ratas control con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas produjo una activación de la microglía similar a la de la hiperamonemia ($177 \pm 10 \mu\text{m}^2$ en comparación con $236 \pm 12 \mu\text{m}^2$ en los cortes control, $p < 0.05$), que se prevenía si las EVs se habían tratado previamente con infiximab para bloquear el TNF α ($223 \pm 14 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$) o si las EVs se habían aislado de ratas hiperamonémicas tratadas con infiximab ($229 \pm 9 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$). La incubación de los cortes control con TNF α recombinante también indujo activación de la microglía ($159 \pm 8 \mu\text{m}^2$, $p < 0.0001$).

La activación de los astrocitos se analizó midiendo el porcentaje de área teñida con GFAP y los resultados se muestran en la Figura 38B y 38C. El área teñida con GFAP se encontraba aumentada en los cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas frente a ratas control ($128 \pm 3 \%$, $p < 0.0001$), reflejando una activación de los astrocitos. Este efecto

se reproducía al incubar *ex vivo* cortes de hipocampo de ratas control con EVs de ratas hiperamonémicas ($124 \pm 3 \%$, $p < 0.001$), pero no si las EVs se habían tratado previamente con onfloximab ($101 \pm 3 \%$, $p < 0.01$) o si las EVs se habían aislado de ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab ($106 \pm 2 \%$, $p < 0.05$). La incubación de los cortes control con TNF α recombinante también indujo activación de los astrocitos ($139 \pm 7 \%$, $p < 0.0001$).

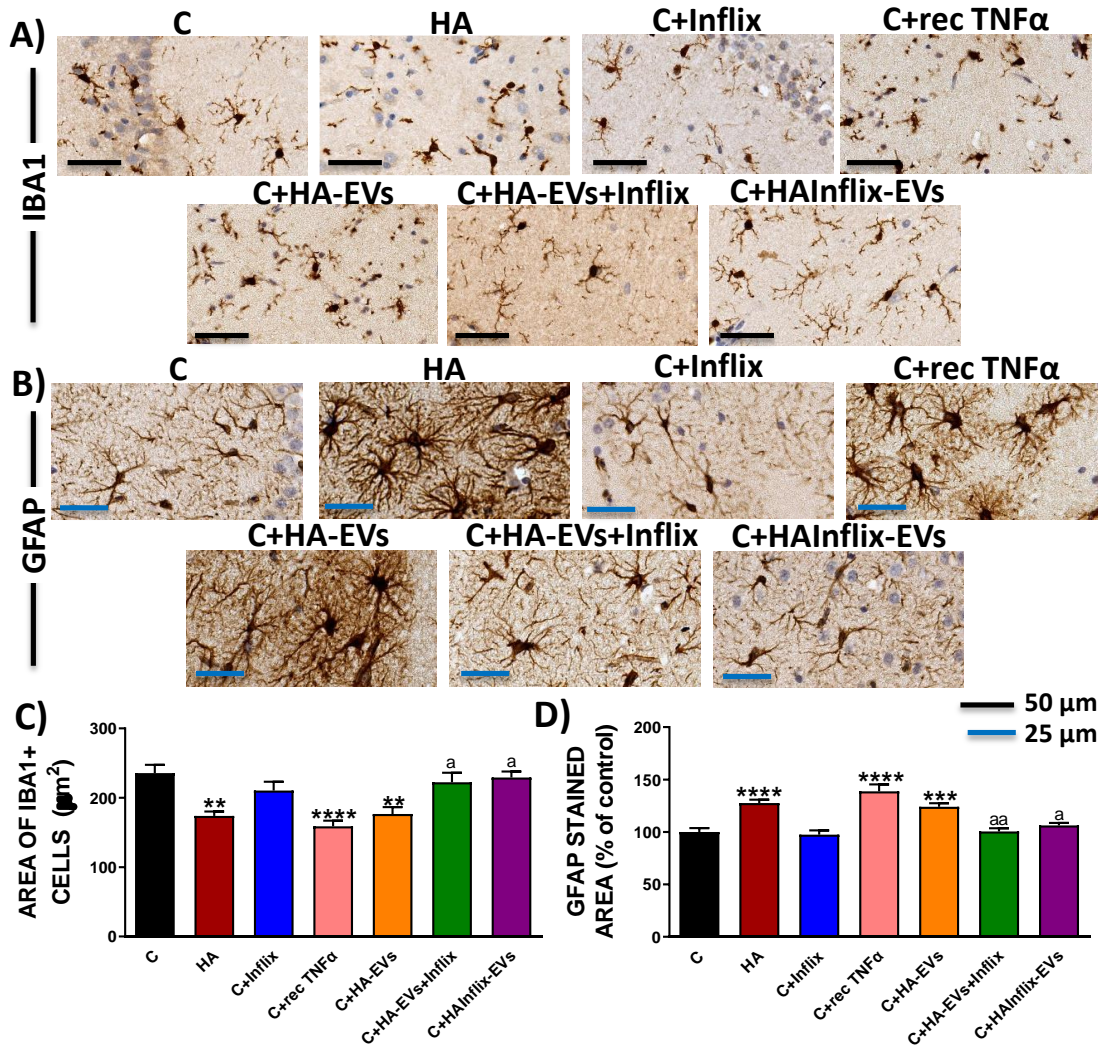


Figura 38. Activación de microglía y astrocitos en cortes de hipocampo tras la incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica contra (A) Iba1 y (B) GFAP en cortes de hipocampo tras la incubación *ex vivo*. (C) Área de la microglía (células marcadas con Iba1, $n = 6-8$). (D) Porcentaje de área teñida con GFAP respecto al grupo control ($n = 6-9$). Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores son la media \pm SEM. Los valores significativamente diferentes respecto al grupo control (C) se indican con asterisco (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) y los valores significativamente diferentes respecto al grupo C+HA-EVs se indican con a ($a = p < 0.05$, $aa = p < 0.01$). Barra de escala = 50 y 25 μm , según se indica en la figura.

La incubación de los cortes control con infliximab no produjo ningún efecto significativo sobre la activación de microglía ($210 \pm 13 \mu\text{m}^2$) o de astrocitos ($97 \pm 4 \%$).

2.6 La incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas aumenta el contenido de IL-1 β y TNF α en neuronas de cortes de hipocampo de ratas control.

El contenido en IL-1 β y TNF α en neuronas granulares de la región CA1 del hipocampo se analizó mediante inmunohistoquímica y los resultados se presentan en la Figura 39. Se observa que el contenido en IL-1 β y TNF α se encontraba aumentado en los cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas frente a ratas control ($158 \pm 11 \%$, $p < 0.05$ y $125 \pm 2 \%$, $p < 0.05$; respectivamente).

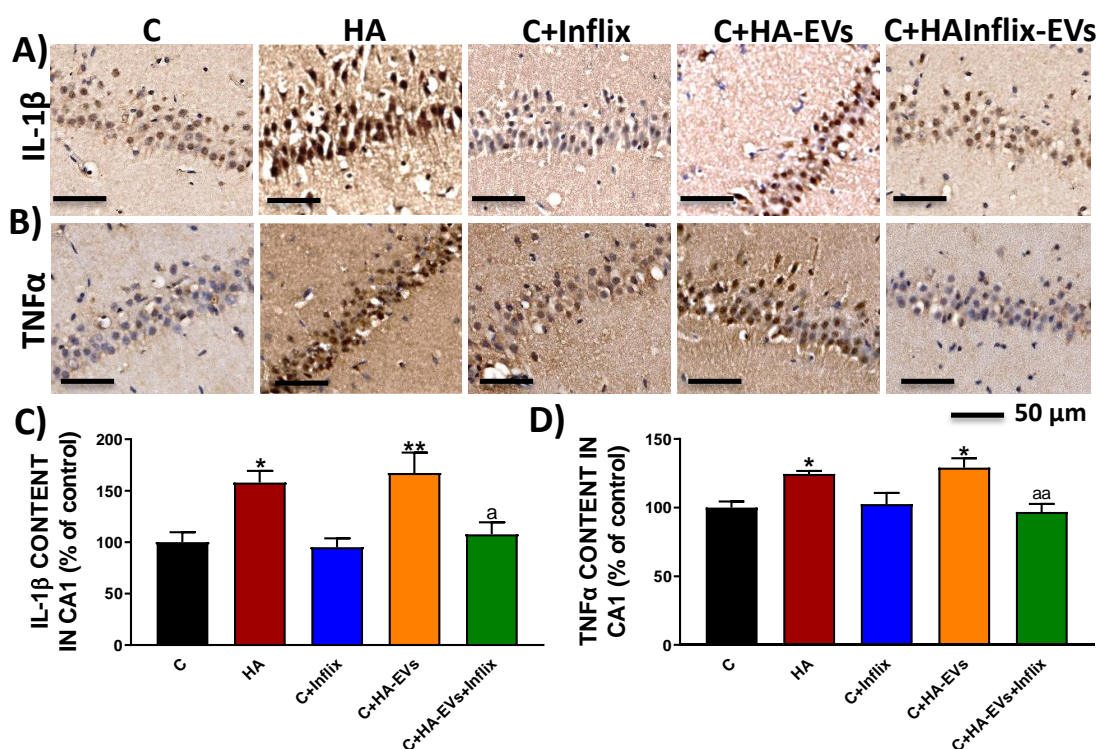


Figura 39. Contenido de IL-1 β y TNF α en neuronas de cortes de hipocampo tras la incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica contra (A) IL-1 β y (B) TNF α en neuronas granulares de la región CA1 en cortes de hipocampo tras la incubación *ex vivo*. (C) Contenido de IL-1 β (D) y de TNF α en neuronas de la capa CA1, expresado como porcentaje respecto al grupo control (n = 4-5). Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores son la media \pm SEM. Los valores significativamente diferentes respecto al grupo control (C) se indican con asterisco (*p < 0.05, **p < 0.01) y los valores significativamente diferentes respecto al grupo C+HA-EVs se indican con a (a = p < 0.05, aa = p < 0.01). Barra de escala = 50 μm , según se indica en la figura.

La incubación *ex vivo* de cortes de hipocampo de ratas control con EVs de ratas hiperamonémicas produjo un aumento similar al de la hiperamonemia *per se* en el

contenido de IL-1 β (167 ± 20 %, $p < 0.01$) y de TNF α (129 ± 7 %, $p < 0.05$). Este aumento se previno si las EVs se habían tratado previamente con infliximab (108 ± 12 %, $p < 0.05$ y 97 ± 6 %, $p < 0.01$; respectivamente). La incubación de los cortes de hipocampo control con infliximab no alteró el contenido de IL-1 β (95 ± 9 %) ni de TNF α (103 ± 8 %) en neuronas de la capa CA1.

2.7 La incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas induce una polarización en la microglía hacia un estado pro-inflamatorio en cortes de hipocampo de ratas control.

El contenido total de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF α y de los marcadores anti-inflamatorios IL-4, IL-10 y arginasa 1 se analizó mediante Western blot en homogenados de cortes de hipocampo tras la incubación *ex vivo* con los diferentes tratamientos. Como se observa en la Figura 40, la hiperamonemia aumenta el contenido de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β (145 ± 6 %, $p < 0.0001$), IL-6 (128 ± 5 %, $p < 0.0001$) y TNF α (129 ± 5 %, $p < 0.0001$) en cortes de hipocampo; mientras que reduce los marcadores anti-inflamatorios IL-4 (75 ± 4 %, $p < 0.01$), IL-10 (67 ± 3 %, $p < 0.0001$) y arginasa 1 (73 ± 3 %, $p < 0.0001$). Estos resultados indican una polarización de la microglía hacia un estado pro-inflamatorio en los cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas.

La incubación de los cortes de ratas control con EVs de ratas hiperamonémicas indujo efectos similares, aumentando el contenido de IL-1 β (146 ± 9 %, $p < 0.0001$), IL-6 (129 ± 3 %, $p < 0.001$) y TNF α (130 ± 7 %, $p < 0.0001$); y reduciendo los niveles de IL-4 (69 ± 8 %, $p < 0.01$), IL-10 (81 ± 4 %, $p < 0.001$) y arginasa 1 (76 ± 2 %, $p < 0.001$). La incubación previa de las EVs con infliximab o la incubación de los cortes con EVs aisladas de ratas HA tratadas con infliximab previno las alteraciones inducidas por las vesículas, observándose un contenido similar de los diferentes marcadores al de los cortes control basales: IL-1 β (102 ± 8 %, $p < 0.0001$; y 108 ± 4 %, $p < 0.01$), IL-6 (105 ± 4 %, $p < 0.05$; y 104 ± 9 %, $p < 0.05$), TNF α (105 ± 6 %, $p < 0.05$; y 98 ± 3 %, $p < 0.001$), IL-4 (98 ± 4 %, $p < 0.05$; y 100 ± 11 %, $p < 0.05$), IL-10 (99 ± 1 %, $p < 0.05$; y 101 ± 1 %, $p < 0.01$) y arginasa 1 (96 ± 5 %, $p < 0.05$; y 97 ± 4 %, $p < 0.01$) (Fig. 40).

La incubación con TNF α recombinante reprodujo la mayoría de cambios inducidos por la hiperamonemia o las EVs de ratas hiperamonémicas: IL-1 β (129 ± 5 %, $p < 0.01$), IL-6 (124 ± 4 %, $p < 0.01$), TNF α (128 ± 4 %, $p < 0.001$) y arginasa 1 (80 ± 4 %, $p < 0.01$). En el caso de la IL-4 y la IL-10, se observa una reducción tras la incubación con TNF α recombinante (80 ± 3 % y 88 ± 2 %, respectivamente), pero sin que este efecto llegue a ser significativo (Fig. 40).

La incubación de los cortes de hipocampo control con Infliximab no alteró el contenido de los marcadores analizados: IL-1 β (101 ± 4 %), IL-6 (102 ± 4 %), TNF α (105 ± 4 %), IL-4 (98 ± 7 %), IL-10 (99 ± 3 %) y arginasa 1 (98 ± 3 %) (Fig. 40).

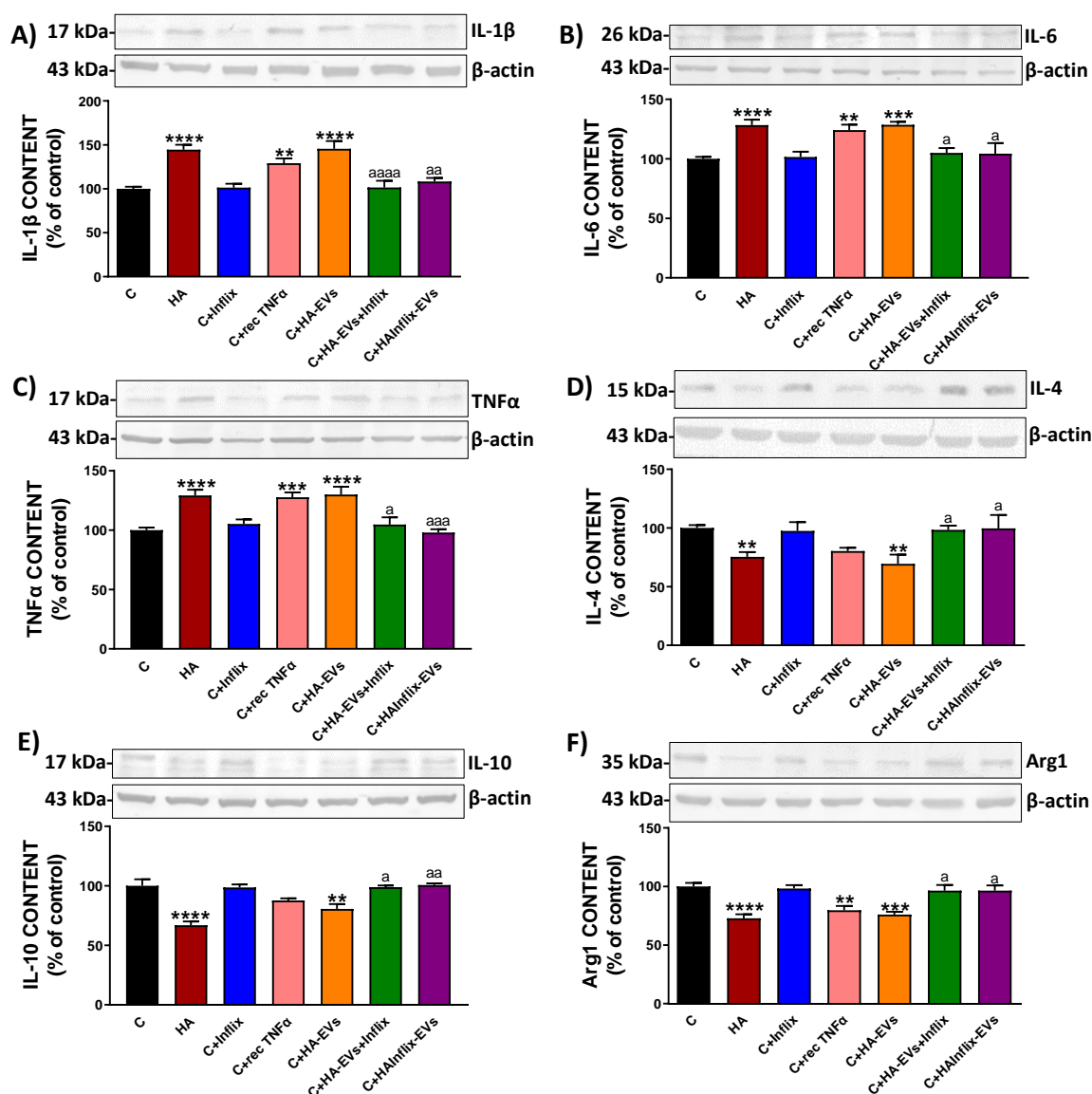


Figura 40. Contenido de marcadores pro- y anti-inflamatorios en cortes de hipocampo tras la incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas. Contenido proteico analizado mediante Western blot de (A) IL-1 β (n = 8-25), (B) IL-6 (n = 8-14), (C) TNF α (n = 8-22), (D) IL-4 (n = 9-24), (E) IL-10 (n = 8-12) y (F) arginasa 1 (n = 8-23) en homogenados de hipocampo. Se muestran imágenes representativas de las bandas para cada proteína, junto con las bandas correspondientes del control de carga (β -actina). Los valores se expresan como porcentaje respecto al control y son la media \pm SEM. Para comparar los grupos se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes respecto al grupo control (C) se indican con asterisco (**p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001) y los valores significativamente diferentes respecto al grupo C+HA-EVs se indican con a (a = p < 0.05, aa = p < 0.01, aaa = p < 0.001, aaaa = p < 0.0001).

2.8 La incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas altera la expresión en membrana de receptores AMPA y NMDA en cortes de hipocampo de ratas control.

En estudios previos del grupo se ha demostrado que la neuroinflamación induce alteraciones en la expresión en membrana de la subunidad NR2B de los receptores NMDA y de las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA en el hipocampo, lo cual es responsable de la alteración en el aprendizaje espacial en las ratas hiperamonémicas (Hernandez-Rabaza *et al.*, 2016a; Taoro-Gonzalez *et al.*, 2018 y 2019a; y Balzano *et al.*, 2020b).

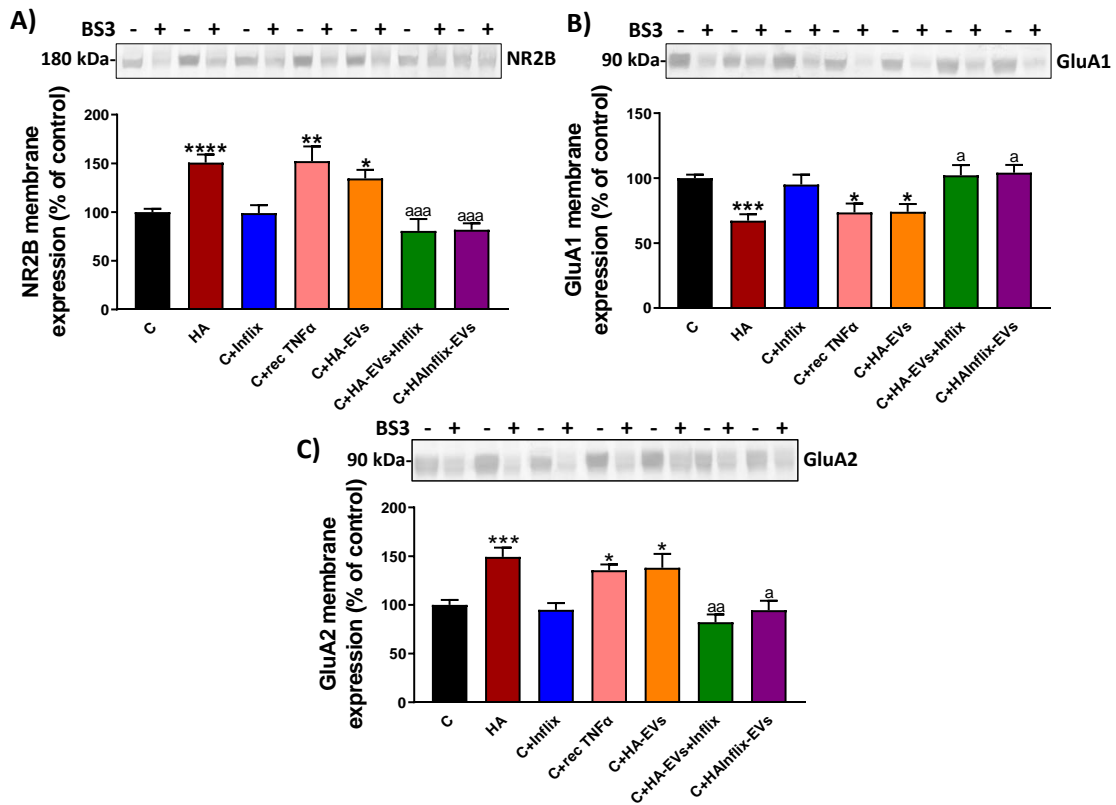


Figura 41. Expresión en membrana de la subunidad NR2B de los receptores NMDA y las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA en cortes de hipocampo tras la incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas. Expresión en membrana de (A) NR2B (n = 8-23), (B) GluA1 (n = 10-24) y (C) GluA2 (n = 9-18) en homogenados de cortes de hipocampo incubados en presencia (+) o ausencia (-) del *cross-linker* BS3, analizada por Western blot y calculada restando la intensidad de la banda de la muestra incubada con BS3 (fracción citosólica) a la intensidad de la banda de la muestra incubada en ausencia de BS3 (contenido total). Se incluyen imágenes representativas de los blots de cada proteína. Los valores son la media \pm SEM y se expresan como porcentaje respecto al grupo control. Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes del grupo control (C) se indican con asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) y los valores significativamente diferentes del grupo C+HA-EVs se indican con a (a = $p < 0.05$, aa = $p < 0.01$, aaa = $p < 0.001$).

Por ello, evaluamos si la incubación *ex vivo* de cortes de hipocampo de ratas control con vesículas de ratas hiperamonémicas altera la expresión en membrana de dichas subunidades. En la Figura 41 se observa que la hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de la subunidad NR2B ($151 \pm 8 \%$, $p < 0.0001$) y de la subunidad GluA2 ($150 \pm 10 \%$, $p < 0.001$) y reduce la expresión en membrana de la subunidad GluA1 ($67 \pm 5 \%$, $p < 0.001$) en cortes de hipocampo. La incubación con EVs de ratas hiperamonémicas indujo alteraciones similares, aumentando la expresión en membrana de NR2B ($135 \pm 9 \%$, $p < 0.05$) y de GluA2 ($138 \pm 4 \%$, $p < 0.05$), y reduciendo la expresión en membrana de GluA1 ($74 \pm 6 \%$, $p < 0.05$) en cortes de hipocampo de ratas control. Estos efectos se prevenían si las EVs se incubaban previamente con infliximab (NR2B: $81 \pm 12 \%$, $p < 0.001$; GluA2: $82 \pm 8 \%$, $p < 0.01$ y GluA1: $102 \pm 8 \%$, $p < 0.001$) o si las EVs se habían aislado de ratas HA tratadas con infliximab (NR2B: $82 \pm 7 \%$, $p < 0.001$; GluA2: $95 \pm 10 \%$, $p < 0.05$ y GluA1: $104 \pm 6 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 41).

La incubación de los cortes de ratas control con TNF α recombinante también aumentó la expresión en membrana de NR2B ($151 \pm 15 \%$, $p < 0.01$) y de GluA2 ($145 \pm 11 \%$, $p < 0.05$), y redujo la expresión en membrana de GluA1 ($74 \pm 7 \%$, $p < 0.05$); mientras que la incubación con infliximab no alteró la expresión en membrana de ninguna de estas subunidades (NR2B: $99 \pm 8 \%$, GluA2: $95 \pm 9 \%$ y GluA1: $95 \pm 8 \%$) (Fig. 41).

2.9 La incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas induce neuroinflamación y altera la neurotransmisión en cortes de hipocampo de ratas control activando la vía de señalización de NF- κ B mediante TNF α .

Dadsetan *et al.* (2016b) demostraron que en ratas PCS, otro modelo animal de EHM, los niveles aumentados de IL-1 β y TNF α en el hipocampo se debían a un aumento de la activación y de la traslocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B. Para avanzar en la investigación de los mecanismos por los que las EVs de ratas hiperamonémicas inducen neuroinflamación en el hipocampo, evaluamos si había una mayor traslocación al núcleo de NF- κ B en cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas y si las vesículas de ratas hiperamonémicas reproducían este efecto.

Observamos que el contenido en el núcleo de la subunidad p50 de NF- κ B se encontraba aumentado en las neuronas de la capa granular de la región CA1 en los cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas ($126 \pm 6 \%$, $p < 0.01$) (Fig. 42A y C). El número de células de microglía que expresaban p50 también estaba aumentado (31 ± 2 células/mm² frente a 15 ± 2 células/mm² en los cortes control, $p < 0.01$) (Fig. 42B y D). La incubación de cortes de ratas control con EVs de ratas hiperamonémicas reprodujo tanto el aumento de la traslocación al núcleo de p50 en neuronas ($137 \pm 6 \%$, $p < 0.001$) como el aumento de células de microglía que expresaban p50 (29 ± 2 células/mm², $p < 0.01$). Estos efectos no se produjeron si las EVs añadidas a los cortes control se habían tratado previamente con infliximab (ratio núcleo/citoplasma de p50: $110 \pm 7 \%$, $p < 0.05$; y microglía expresando p50: 18 ± 1 células/mm², $p < 0.05$) o si las EVs procedían de ratas a las que se les había administrado infliximab *in vivo* (ratio

núcleo/citoplasma de p50: $103 \pm 5 \%$, $p < 0.01$; y microglía expresando p50: 17 ± 1 células/mm², $p < 0.05$).

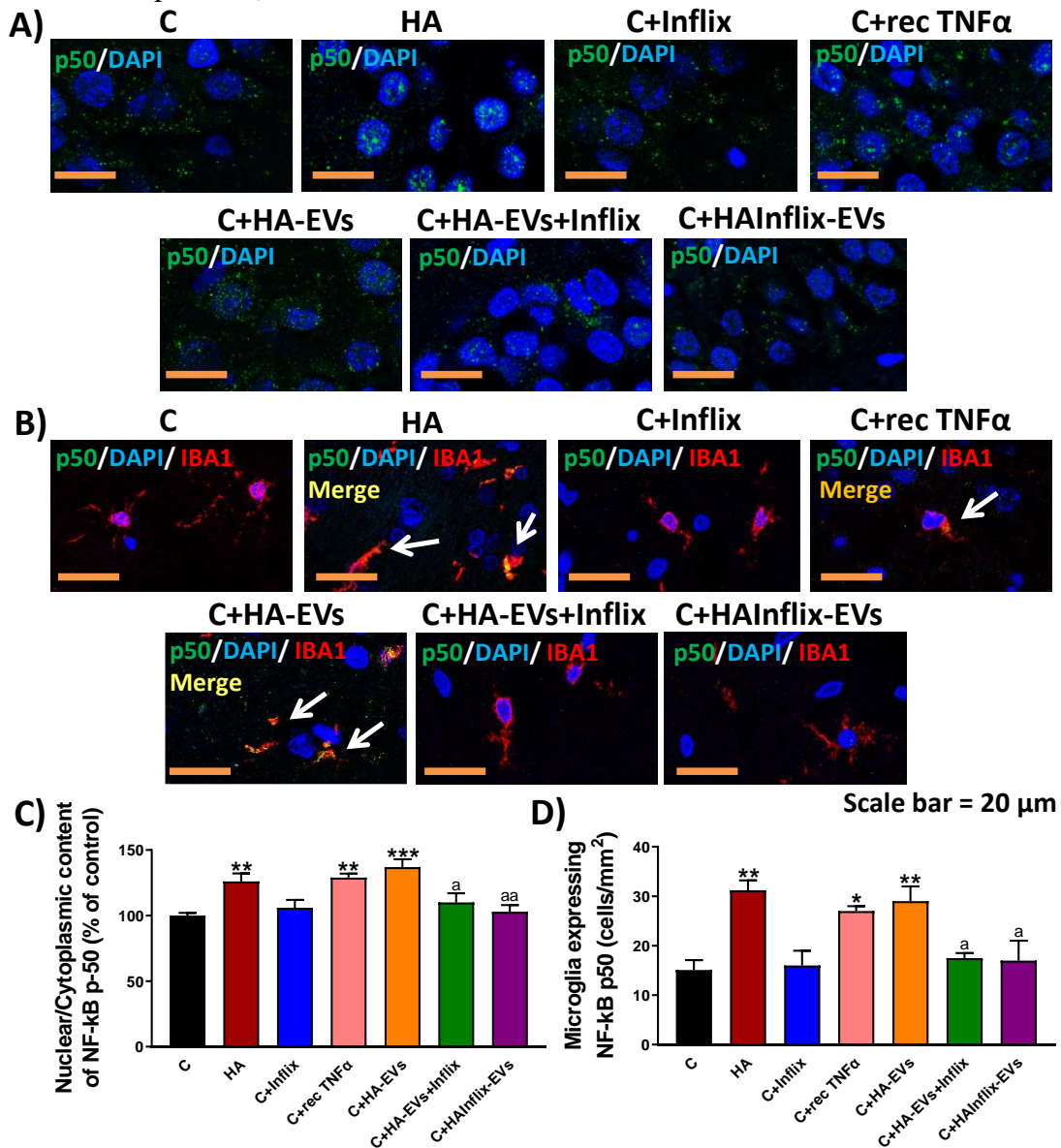


Figura 42. Activación de NF- κ B en cortes de hipocampo tras la incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas. Imágenes representativas de (A) inmunofluorescencia contra la subunidad p50 de NF- κ B (verde) y (B) de inmunofluorescencia doble contra la subunidad p50 de NF- κ B (verde) e Iba1 (en rojo, marcador de microglía). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). (C) Ratio Núcleo/Citoplasma de la subunidad p50 de NF- κ B en las neuronas de la región CA1 del hipocampo, medida por inmunofluorescencia y expresada como porcentaje respecto al control (n = 5-6). (D) Número de células de microglía que expresan la subunidad p50 de NF- κ B, medido por inmunofluorescencia doble y expresado como células/mm² (n = 5-6). Barra de escala = 20 μ m. Los valores son la media \pm SEM. Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes respecto al grupo control (C) se indican con asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) y los valores significativamente diferentes respecto al grupo C+HA-EVs se indican con a (a = $p < 0.05$, aa = $p < 0.01$)

La incubación de los cortes con TNF α aumentó el contenido nuclear de p50 en neuronas ($129 \pm 3 \%$, $p < 0.01$) y el número de microglía que expresaban p50 (27 ± 1 células/mm 2 , $p < 0.05$), mientras que la incubación con infliximab no modificó estos parámetros (ratio núcleo/citoplasma de p50: $106 \pm 6 \%$ y microglía expresando p50: 16 ± 3 células/mm 2).

A continuación, investigamos los mecanismos por los que las EVs de ratas hiperamonémicas inducen la activación de NF- κ B en cortes de hipocampo de ratas control. El TNF α puede inducir la activación de NF- κ B tras la unión a su receptor TNFR1, el cual se activa y recluta a un conjunto de proteínas que finalmente conduce a la activación de kinasas IKK que fosforilan I κ B α , que se encuentra unido a las subunidades p50 y p65 de NF- κ B, impidiendo su traslocación al núcleo. Al fosforilarse I κ B α , este se degrada en el proteasoma, liberando las subunidades p50 y p65 y permitiendo que se trasloquen al núcleo y activen la transcripción génica.

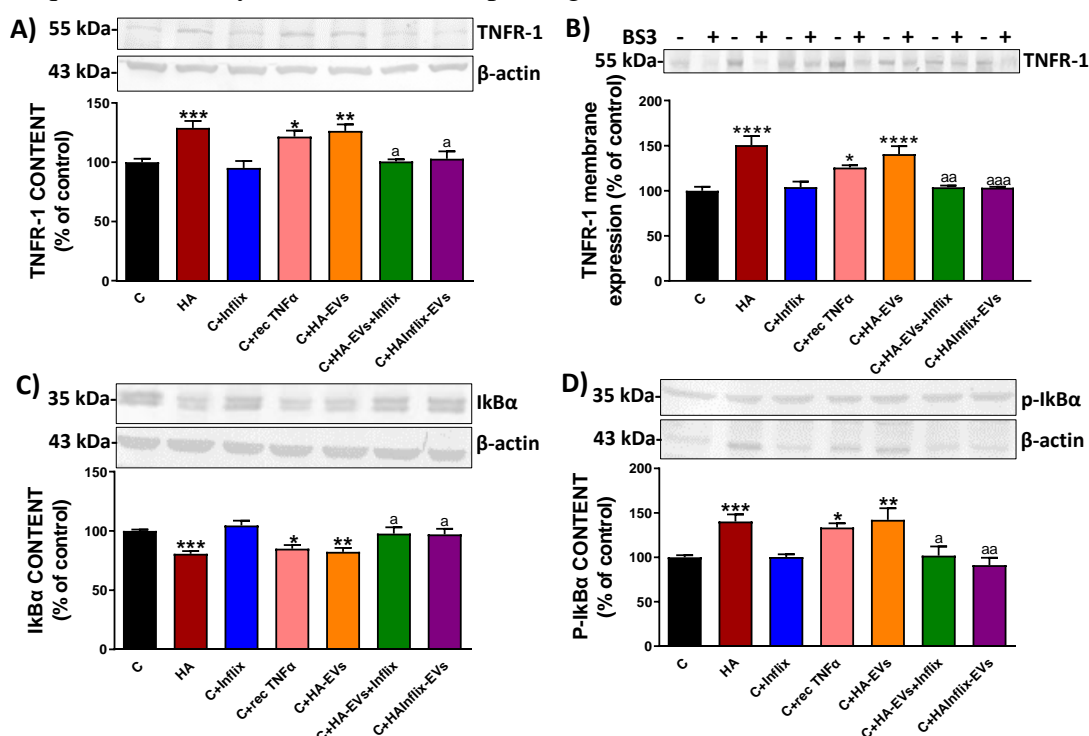


Figura 43. Mecanismos implicados en la activación de NF- κ B en cortes de hipocampo tras la incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas (I). (A) Contenido de TNFR1 (n = 8-22) y (B) expresión en membrana de TNFR1 (n = 8-22). Contenido de (C) I κ B α (n = 10-19) y (D) p-I κ B α (n = 8-18). El contenido total se midió mediante Western blot en homogenados de cortes de hipocampo y la expresión en membrana se midió mediante Western blot en homogenados de cortes de hipocampo incubados en presencia (+) o ausencia (-) del *cross-linker* BS3. Se muestran imágenes representativas de los blots de cada proteína y de su control de carga (β -actina) en los blots de contenido total. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al grupo control y son la media \pm SEM. Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes del grupo control (C) se indican con asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) y los valores significativamente diferentes del grupo C+HA-EVs se indican con a (a = $p < 0.05$, aa = $p < 0.01$, aaa = $p < 0.001$).

La hiperamonemia aumentó tanto el contenido total ($129 \pm 6 \%$, $p < 0.001$) como la expresión en membrana de TNFR1 ($151 \pm 10 \%$, $p < 0.0001$) en cortes de hipocampo, como se observa en la Figura 43A y B. El contenido total de I κ B α se encontraba reducido en cortes de ratas hiperamonémicas ($81 \pm 2 \%$, $p < 0.001$) (Fig. 43C), mientras que el contenido de I κ B α fosforilado se encontraba aumentado ($140 \pm 8 \%$, $p < 0.001$) (Fig. 43D). La incubación de los cortes de hipocampo de ratas control con EVs de ratas hiperamonémicas produjo efectos similares (contenido de TNFR1: $126 \pm 6 \%$, $p < 0.01$; expresión en membrana de TNFR1: $141 \pm 9 \%$, $p < 0.0001$; contenido de I κ B α : $82 \pm 3 \%$, $p < 0.01$; y contenido de p-I κ B α : $142 \pm 13 \%$, $p < 0.01$).

Se ha demostrado que Smad7, una diana de la señalización por TGF β , también es capaz de modular la activación de NF- κ B, aumentando la transcripción de I κ B α y reduciendo por tanto la activación de NF- κ B (Yan *et al.*, 2009). Por ello, se analizó este mecanismo alternativo en los experimentos *ex vivo*, observando que el contenido de Smad7 estaba reducido en cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas ($81 \pm 4 \%$, $p < 0.001$) y en cortes control incubados con EVs de ratas hiperamonémicas ($81 \pm 4 \%$, $p < 0.01$) (Fig. 44A). La hiperamonemia redujo el contenido de TGF β en los cortes de hipocampo ($69 \pm 5 \%$, $p < 0.01$), pero este efecto no se observó en los cortes control incubados con HA-EVs ($100 \pm 3 \%$) (Fig. 44B). La hiperamonemia también redujo el contenido total ($80 \pm 2 \%$, $p < 0.0001$) (Fig. 44C) y la expresión en membrana del receptor 2 de TGF β ($61 \pm 5 \%$, $p < 0.0001$) (Fig. 44D), y estos efectos se reprodujeron tras la incubación de los cortes control con HA-EVs ($85 \pm 2 \%$, $p < 0.05$; y $79 \pm 2 \%$, $p < 0.0001$, respectivamente).

Para evaluar el papel del TNF α contenido en las EVs en la inducción de la neuroinflamación y las alteraciones encontradas en los cortes de hipocampo control, incubamos los cortes con HA-EVs previamente tratadas con el anti-TNF α infliximab, con EVs de ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab *in vivo* o con TNF α recombinante (Figuras 43 y 44). Encontramos que los efectos previamente descritos de las HA-EVs sobre la activación de NF- κ B no se inducían si los cortes se incubaban con HA-EVs previamente tratadas con infliximab (contenido de TNFR1: $101 \pm 2 \%$, $p < 0.05$; expresión en membrana de TNFR1: $104 \pm 2 \%$, $p < 0.01$; contenido de I κ B α : $98 \pm 5 \%$, $p < 0.05$; contenido de p-I κ B α : $102 \pm 10 \%$, $p < 0.05$; contenido de Smad7: $98 \pm 2 \%$, $p < 0.05$; contenido de TGF β 2: $101 \pm 4 \%$, $p < 0.05$; y expresión en membrana de TGF β 2: $94 \pm 2 \%$, $p < 0.01$) o con EVs de ratas HA tratadas con infliximab (contenido de TNFR1: $103 \pm 6 \%$, $p < 0.05$; expresión en membrana de TNFR1: $103 \pm 1 \%$, $p < 0.001$; contenido de I κ B α : $97 \pm 5 \%$, $p < 0.05$; contenido de p-I κ B α : $91 \pm 8 \%$, $p < 0.01$; contenido de Smad7: $102 \pm 4 \%$, $p < 0.05$; contenido de TGF β 2: $104 \pm 4 \%$, $p < 0.05$; y expresión en membrana de TGF β 2: $98 \pm 2 \%$, $p < 0.001$), como se observa en las Figuras 43 y 44. En cambio, la incubación de los cortes de ratas control con TNF α recombinante inducía alteraciones similares a las producidas por la hiperamonemia o por las vesículas de ratas hiperamonémicas (contenido de TNFR1: $122 \pm 5 \%$, $p < 0.05$; expresión en membrana de TNFR1: $126 \pm 3 \%$, $p < 0.05$; contenido de I κ B α : $85 \pm 3 \%$, $p < 0.05$; contenido de p-I κ B α : $134 \pm 5 \%$, $p < 0.05$; contenido de Smad7: $83 \pm 5 \%$,

$p < 0.05$; contenido de TGF β R2: $81 \pm 6 \%$, $p < 0.01$; y expresión en membrana de TGF β R2: $84 \pm 3 \%$, $p < 0.01$). No se vio ninguna alteración en los cortes control tras la incubación con infliximab (contenido de TNFR1: $95 \pm 6 \%$, expresión en membrana de TNFR1: $104 \pm 6 \%$, contenido de I κ B α : $105 \pm 4 \%$, contenido de p-I κ B α : $100 \pm 3 \%$, contenido de Smad7: $100 \pm 2 \%$, contenido de TGF β R2: $95 \pm 3 \%$ y expresión en membrana de TGF β R2: $100 \pm 2 \%$).

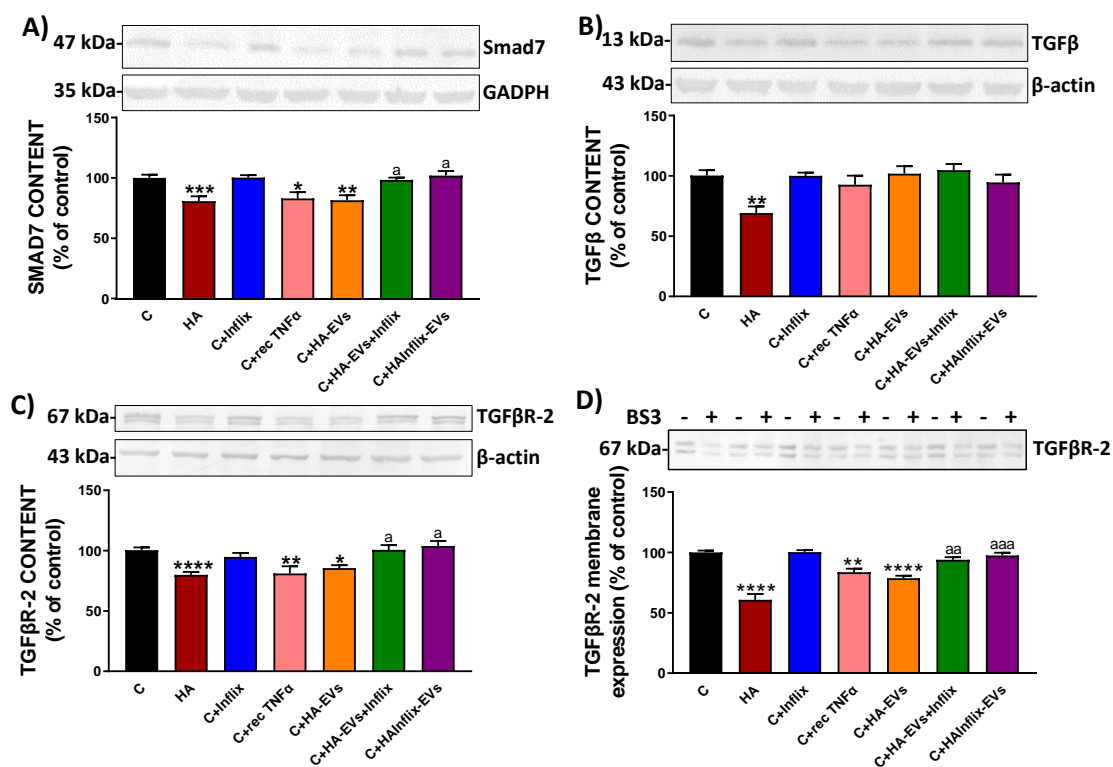


Figura 44. Mecanismos implicados en la activación de NF- κ B en cortes de hipocampo tras la incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de ratas hiperamonémicas (II). Contenido de (A) Smad7 (n = 8-16), (B) TGF β (n = 8-15) y (C) TGF β R2 (n = 10-22). (D) Expresión en membrana de TGF β R2 (n = 8-10). El contenido total se midió mediante Western blot en homogenados de cortes de hipocampo y la expresión en membrana se midió mediante Western blot en homogenados de cortes de hipocampo incubados en presencia (+) o ausencia (-) del *cross-linker* BS3. Se muestran imágenes representativas de los blots de cada proteína y de su control de carga (β -actina o GADPH) en los blots de contenido total. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al grupo control y son la media \pm SEM. Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes del grupo control (C) se indican con asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) y los valores significativamente diferentes del grupo C+HA-EVs se indican con a (a = $p < 0.05$, aa = $p < 0.01$, aaa = $p < 0.001$).

DISCUSIÓN

Tal y como se discutió en el Capítulo 1, uno de los mecanismos por los que la inflamación periférica puede transmitirse al cerebro es por el transporte de vesículas extracelulares (EVs) de la sangre periférica al cerebro. En condiciones patológicas, estas EVs podrían contener proteínas u otros componentes (como microARNs) que desencadenen neuroinflamación y/o deterioro cognitivo y motor. Por ejemplo, la inyección de EVs aisladas de pacientes con enfermedad de Parkinson en ratones induce síntomas similares a los observados en dichos pacientes, como activación de la microglía, degeneración de las neuronas dopaminérgicas y alteraciones del movimiento (Han *et al.*, 2019). Las EVs de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica también contienen proteínas patológicas que contribuyen a la propagación de la patología (Sproviero *et al.*, 2018).

Este capítulo de la tesis se ha centrado en evaluar si las vesículas extracelulares periféricas (aisladas de plasma) de ratas hiperamonémicas son capaces de inducir neuroinflamación en hipocampo y de afectar la función cognitiva, especialmente las funciones relacionadas con la memoria espacial. Los resultados obtenidos muestran que las EVs de ratas hiperamonémicas, modelo de encefalopatía hepática mínima (EHM), son capaces de inducir neuroinflamación en hipocampo y de producir déficits cognitivos en ratas control. Al igual que los resultados mostrados en el Capítulo 1, estos datos respaldan la hipótesis de que las vesículas extracelulares juegan un papel en la fisiopatología de la encefalopatía hepática, contribuyendo a la transmisión de los efectos patológicos al cerebro y al desarrollo de alteraciones cognitivas.

Los mecanismos implicados en estos efectos perjudiciales de las EVs en hiperamonemia se resumen en la Figura 45. En nuestro laboratorio se ha descrito previamente que las ratas hiperamonémicas presentan déficits en procesos de aprendizaje y memoria que son modulados por el hipocampo y que se producen por cambios en la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA, que a su vez se deben al aumento de la expresión en membrana de la subunidad NR2B de los receptores NMDA (Hernandez-Rabaza *et al.*, 2015 y 2016a; Taoro-Gonzalez *et al.*, 2018 y 2019a; Balzano *et al.*, 2020b; Cabrera-Pastor *et al.*, 2019a). En esta tesis, hemos demostrado que las EVs aisladas de plasma de ratas hiperamonémicas alteran la expresión en membrana de estas subunidades de receptores AMPA y NMDA e inducen déficits de memoria, evaluados mediante diferentes test (test de memoria de localización y de reconocimiento de objetos y memoria a corto plazo medida en el laberinto en Y). Taoro-Gonzalez *et al.* (2018) demostraron que las alteraciones en la expresión en membrana de GluA1, GluA2 y NR2B en hipocampo de ratas hiperamonémicas son consecuencia de un aumento de la activación del receptor de IL-1, debido al aumento de los niveles de IL-1 β . Nuestros datos indican que las EVs de ratas hiperamonémicas modifican la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA mediante el aumento de los niveles de IL-1 β . En el hipocampo, la IL-1 β es producida tanto por la microglía como por las neuronas. Las EVs de ratas hiperamonémicas aumentan la producción de IL-1 β en neuronas del hipocampo y también activan la microglía, con lo que aumentarían la IL-1 β proveniente de la microglía.

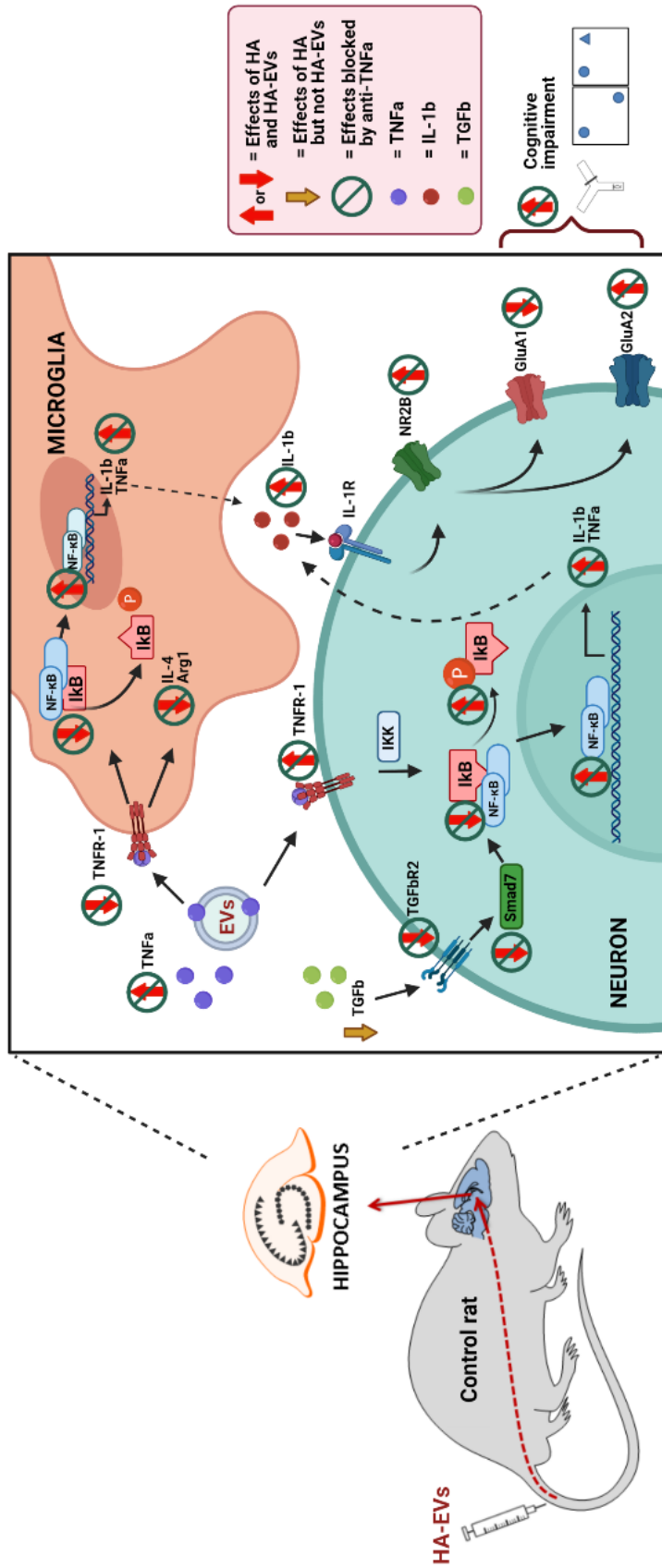


Figura 45. Resumen de los efectos principales de las HA-EVs en hipocampo de ratas control: mecanismos subyacentes. La hiperamonemia induce neuroinflamación en hipocampo, con activación de microglía, un aumento de los factores pro-inflamatorios (IL-1β, TNFα) y una reducción de los factores anti-inflamatorios (IL-4, Arg1). El aumento de IL-1β y la activación de su receptor alteran la expresión en membrana de las subunidades NR2B, GluA1 y GluA2 de los receptores NMDA y AMPA, causando un deterioro de la función cognitiva y déficits de memoria y aprendizaje. Las vesículas extracelulares de plasma de ratas hiperamonémicas alcanzan el hipocampo tras inyectarlas en ratas control e inducen un cambio en la polarización de la microglía hacia un estado pro-inflamatorio, causan neuroinflamación en hipocampo y producen diferentes déficits de memoria. Los resultados obtenidos indican que estos efectos perjudiciales están mediados por el TNFα de las vesículas, que interacciona con su receptor TNFR1 en microglía y aumenta la fosforilación de IκBα, activando el factor de transcripción NF-κB. Como mecanismo alternativo, el TNFα de las vesículas también es capaz de disminuir los niveles de TGFβR2 y de Smad7, lo cual contribuye a menores niveles de IκBα sin fosforilar y a la activación de NF-κB. NF-κB aumenta los niveles de IL-1β y, en consecuencia, altera la expresión en membrana de las subunidades NR2B, GluA1 y GluA2, responsables de los déficits en la función cognitiva. *Esta imagen ha sido creada con BioRender.com*

Se ha observado que las EVs de ratas hiperamonémicas inducen activación de la microglía y astrocitos en hipocampo. Además, provocan un cambio en el fenotipo de la microglía, promoviendo un estado pro-inflamatorio, caracterizado por niveles elevados de IL-1 β , TNF α e IL-6 y niveles bajos de IL-4, IL-10 y arginasa 1. Este cambio en la polarización de la microglía se asocia con la activación del factor de transcripción NF- κ B, que a su vez induce la transcripción de proteínas pro-inflamatorias.

Respecto a las neuronas, el aumento de IL-1 β en hiperamonemia y EHM se debe a un aumento de la translocación al núcleo de NF- κ B, el cual promueve la transcripción de IL-1 β , TNF α y otros factores pro-inflamatorios (Dadsetan *et al.*, 2016b). Las EVs de ratas hiperamonémicas inducen la activación de la señalización por NF- κ B en neuronas de cortes de hipocampo de ratas control, induciendo la translocación al núcleo de NF- κ B, y aumentando con ello los niveles de IL-1 β y TNF α en neuronas.

Otros estudios indican que las EVs periféricas son capaces de inducir neuroinflamación. Li *et al.* (2018) purificaron EVs de suero de un modelo de ratón en el que se inducía inflamación periférica con LPS e inyectaron estas vesículas a ratones control. Observaron que las EVs inducían activación de microglía, astrogliosis y un aumento de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF α en el hipocampo y la corteza de los ratones inyectados. Tsilioni y Theoharides (2018) observaron que la cantidad de EVs estaba aumentada en el suero de pacientes con desórdenes del espectro autista y que eran capaces de estimular la secreción de IL-1 β en cultivos de microglía humana, lo que podría ser desencadenante de la inflamación en el cerebro de estos pacientes.

Con esta información, investigamos los mecanismos por los que las EVs de ratas hiperamonémicas eran capaces de inducir la translocación al núcleo de NF- κ B y los eventos subsiguientes mencionados anteriormente, resumidos en la Figura 45.

En la literatura existen algunos estudios que sugieren un papel del TNF α contenido en las vesículas en la inducción de efectos inflamatorios en determinadas patologías. Zhang *et al.* (2006) observaron que los exosomas derivados de fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide contenían TNF α , el cual era capaz de activar la vía de NF- κ B e inducir la expresión de MMP-1 en cultivos de fibroblastos. Si los exosomas se añadían a cultivos de linfocitos T CD4⁺, promovían la proliferación y la resistencia de las células a la apoptosis. Estos datos indican que el TNF α contenido en los exosomas derivados de fibroblastos podría estar contribuyendo a la inflamación articular, caracterizada por la infiltración y proliferación de linfocitos T CD4⁺ en las articulaciones y la degradación de la matriz extracelular. Obregon *et al.* (2009) observaron que las vesículas derivadas de células dendríticas activadas con LPS transportaban tanto TNF α soluble como sus receptores TNFR1 y TNFR2. En este estudio demostraron que las vesículas derivadas de las células dendríticas activadas eran internalizadas por células epiteliales e inducían la liberación de moléculas pro-inflamatorias como IL-8, MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5), MIP-1 β y G-CSF. Si se incubaban previamente las EVs con un anticuerpo que bloqueara el TNF α , se inhibía la liberación de IL-8, MCP-1, y G-CSF. Obregon *et al.* (2009) proponen que el TNF α soluble contenido en las vesículas se internalizaría en las células

epiteliales y activaría el TNFR1, induciendo la activación del factor NF- κ B y la liberación de citocinas pro-inflamatorias. Otro estudio que refuerza la relevancia del TNF α contenido en vesículas en el desarrollo y la promoción de la inflamación es el publicado por en el contexto de la aterosclerosis. En primer lugar, comprobaron que las células dendríticas maduras estimuladas con LPS aumentaban los marcadores de inflamación y adhesión (VCAM-1, ICAM-1, E-selectina) en células endoteliales si se cultivaban ambos tipos celulares en un sistema transpocillo. Este efecto se reproducía si se añadían solamente las vesículas derivadas de las DCs a las células endoteliales. Se vio que los marcadores de inflamación y adhesión no se veían aumentados si se inhibía el TNF α de las EVs derivadas de DCs, ya fuera silenciando su expresión en las células de origen o incubando las vesículas con un anticuerpo anti-TNF α , y que la inflamación se desencadenaba por la activación de la vía NF- κ B. Por último, se comprobó que los efectos también ocurrían *in vivo*: la inyección de EVs derivadas de DCs en ratones aumentaba los marcadores de inflamación y adhesión a las 24 y a las 72 h, y aumentaba el tamaño de las lesiones ateroscleróticas a las 12 semanas (Gao *et al.*, 2016).

En base a estos estudios y al descubrimiento de que tanto el TNF α como su receptor TNFR1 se encuentran aumentados en las EVs de ratas hiperamonémicas, planteamos la hipótesis de que las HA-EVs inducían la translocación al núcleo de NF- κ B en las neuronas del hipocampo de ratas control mediante el TNF α presente en la membrana de las vesículas. Comprobamos que las EVs no eran capaces de activar NF- κ B ni en neuronas ni en microglía en cortes de hipocampo de ratas control si las vesículas se incubaban previamente con el anti-TNF α infliximab para bloquear el TNF α de las vesículas. La activación de NF- κ B también se prevenía si los cortes se incubaban con EVs aisladas de ratas hiperamonémicas a las que se les había administrado infliximab *in vivo*, cuyo contenido en TNF α se reducía hasta niveles de ratas control en comparación con las EVs de ratas hiperamonémicas. En cambio, la activación de NF- κ B se reproducía si los cortes de hipocampo de ratas control se incubaban con TNF α recombinante. Estos datos indican que el TNF α de las EVs induce la activación del factor de transcripción NF- κ B.

A continuación, intentamos averiguar cómo el TNF α de las vesículas activa la señalización de NF- κ B. El TNF α puede inducir la activación de NF- κ B tras la unión a su receptor TNFR1, el cual se activa y recluta a un conjunto de proteínas que finalmente conduce a la activación de kinasas IKK que fosforilan I κ B α , que se encuentra unido a las subunidades p50 y p65 de NF- κ B, impidiendo su traslocación al núcleo. Al fosforilarse I κ B α , este se degrada en el proteasoma, liberando las subunidades p50 y p65 y permitiendo que se trasloquen al núcleo y activen la transcripción génica.

Observamos que la hiperamonemia aumenta tanto el contenido total como la expresión en membrana de TNFR1 en cortes de hipocampo. El contenido total de I κ B α se encuentra reducido en cortes de ratas hiperamonémicas, mientras que el contenido de I κ B α fosforilado se encuentra aumentado. La incubación de los cortes de hipocampo de ratas control con EVs de ratas hiperamonémicas produjo efectos similares, aumentando el contenido y la expresión en membrana de TNFR1, reduciendo el contenido de I κ B α y

umentando el contenido de I κ B α fosforilado. Estos efectos se reproducían al incubar los cortes de hipocampo control con TNF α recombinante y no ocurrían si se incubaban los cortes con EVs de ratas hiperamonémicas previamente incubadas con el anti-TNF α infliximab o con EVs aisladas de ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab *in vivo*. Estos datos confirman que el TNF α de las EVs de ratas hiperamonémicas está activando a su receptor TNFR1 y aumentando la fosforilación de I κ B α , lo que sería responsable de liberar la subunidad p50 de NF- κ B para su traslocación al núcleo.

Por otra parte, se ha demostrado que Smad7, una proteína que media la señalización por TGF β , también es capaz de modular la activación de NF- κ B, aumentando la transcripción de I κ B α , lo que aumenta la retención en citosol de p50 y p65, reduciendo por tanto la activación de NF- κ B (Yan *et al.*, 2009). Por ello, se evaluó este mecanismo alternativo en los experimentos *ex vivo*, observando que el contenido de Smad7 estaba reducido en cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas y en cortes control incubados con EVs de ratas hiperamonémicas. La hiperamonemia redujo el contenido de TGF β en los cortes de hipocampo, pero este efecto no se observó en los cortes control incubados con EVs de ratas hiperamonémicas. La hiperamonemia también redujo el contenido total y la expresión en membrana del receptor 2 de TGF β y estos efectos se reprodujeron tras la incubación de los cortes control con HA-EVs. Por lo tanto, este mecanismo estaría actuando tanto en el hipocampo de ratas hiperamonémicas como en los cortes de hipocampo control incubados con EVs de ratas hiperamonémicas, llevando a la reducción del contenido de I κ B α y liberando así a NF- κ B para su translocación al núcleo. Esta vía también es dependiente de TNF α , ya que la reducción del receptor 2 de TGF β y de Smad7 también se produjo en cortes incubados con TNF α recombinante, mientras que no se observó en los cortes de hipocampo control tratados con EVs de ratas hiperamonémicas en las que se había bloqueado el TNF α con infliximab ni en los cortes incubados con EVs procedentes de ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab *in vivo*, en las cuales se normaliza el contenido de TNF α . Yamane *et al.* (2003) demostraron que el TNF α disminuye la señalización por TGF β mediante la reducción de la expresión del receptor TGF β de tipo 2 en fibroblastos. Aunque el mecanismo concreto por el que el TNF α es capaz de reducir el contenido de TGF β R2 en hipocampo se desconoce, en el estudio de Yamane *et al.* (2003) se observó que esta reducción se debe al aumento de la degradación del receptor por proteasas como la calpaína en fibroblastos tras la incubación con TNF α .

En resumen (Figura 45), los datos obtenidos muestran que las ratas hiperamonémicas presentan un aumento de TNF α y de la expresión en membrana de su receptor TNFR1 en el hipocampo. Esto conduce a la activación de la microglía y a su polarización hacia un estado pro-inflamatorio, así como a una reducción de I κ B α y un aumento de I κ B α fosforilado, lo cual promueve la translocación al núcleo de NF- κ B. Además, las ratas hiperamonémicas presentan una reducción de TGF β , de su receptor TGF β R2 y de Smad7, una de sus dianas intracelulares. Esta disminución de Smad7 causa una reducción del contenido de I κ B α , contribuyendo a la liberación y translocación al núcleo de NF- κ B. Tanto la activación de la microglía como la translocación de NF- κ B inducen y aumentan la síntesis de IL-1 β en microglía y neuronas. Este aumento en los niveles de IL-1 β

conduce a la activación del receptor de IL-1, el cual, a su vez, altera la expresión en membrana de subunidades de receptores AMPA y NMDA, induciendo el deterioro cognitivo.

Las vesículas extracelulares de plasma de ratas hiperamonémicas alcanzan el hipocampo tras su inyección en ratas control y deterioran la función cognitiva, causando déficits de memoria. Estas alteraciones de memoria se encuentran mediadas por el TNF α presente en la superficie de las EVs, que se une a su receptor TNFR1 en microglía y neuronas. El TNF α conduce a un cambio en el fenotipo de la microglía hacia un estado pro-inflamatorio, induciendo la translocación nuclear de NF- κ B y aumentando la producción de IL-1 β . Esta mayor traslocación también es inducida en neuronas, lo que contribuye a la mayor producción de IL-1 β . Al aumentar los niveles de IL-1 β , se aumenta la activación del receptor de IL-1 y se inducen cambios en la expresión en membrana de NR2B, GluA1 y GluA2, responsables de alterar la función cognitiva.

Como conclusión de la Sección A, los datos obtenidos demuestran que las vesículas extracelulares de plasma de ratas hiperamonémicas son capaces de inducir neuroinflamación tanto en cerebelo (Capítulo 1) como en hipocampo (Capítulo 2) y de producir déficits cognitivos y motores asociados con estas áreas que reproducen las alteraciones presentes en hiperamonemia. En encefalopatía hepática, la hiperamonemia y la inflamación periférica actúan de forma sinérgica para producir neuroinflamación, alterar la neurotransmisión e inducir las alteraciones en la función cognitiva y motora. Sin embargo, los mecanismos por los cuales las alteraciones periféricas son transmitidas al cerebro no se conocen por completo. Los datos obtenidos en esta tesis indican que las vesículas extracelulares circulantes en el torrente sanguíneo son capaces de alcanzar el cerebro y de contribuir a la patogénesis de la encefalopatía hepática, suponiendo por tanto un nuevo mecanismo de transmisión de los efectos deletéreos entre la periferia y el cerebro.

SECCIÓN B. Evaluación del efecto del tratamiento con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales sobre la neuroinflamación y las alteraciones cognitivas y motoras en ratas hiperamonémicas

Para analizar si las vesículas extracelulares (EVs) derivadas de células madre mesenquimales (MSCs) son capaces de revertir la neuroinflamación y el deterioro cognitivo y motor en hiperamonemia, se diseñó un experimento en el cual se aislaron EVs de MSCs y se inyectaron *in vivo* a ratas hiperamonémicas. Se analizó si las EVs inyectadas revertían la neuroinflamación y los déficits cognitivos y motores presentes en ratas hiperamonémicas. A continuación, se estudiaron en más detalle los mecanismos moleculares implicados en experimentos *ex vivo* en cortes de cerebelo e hipocampo.

Caracterización de las vesículas extracelulares aisladas de células madre mesenquimales (MSC-EVs).

En primer lugar, se caracterizaron las vesículas aisladas mediante microscopía electrónica, análisis de seguimiento de nanopartículas y Western blot.

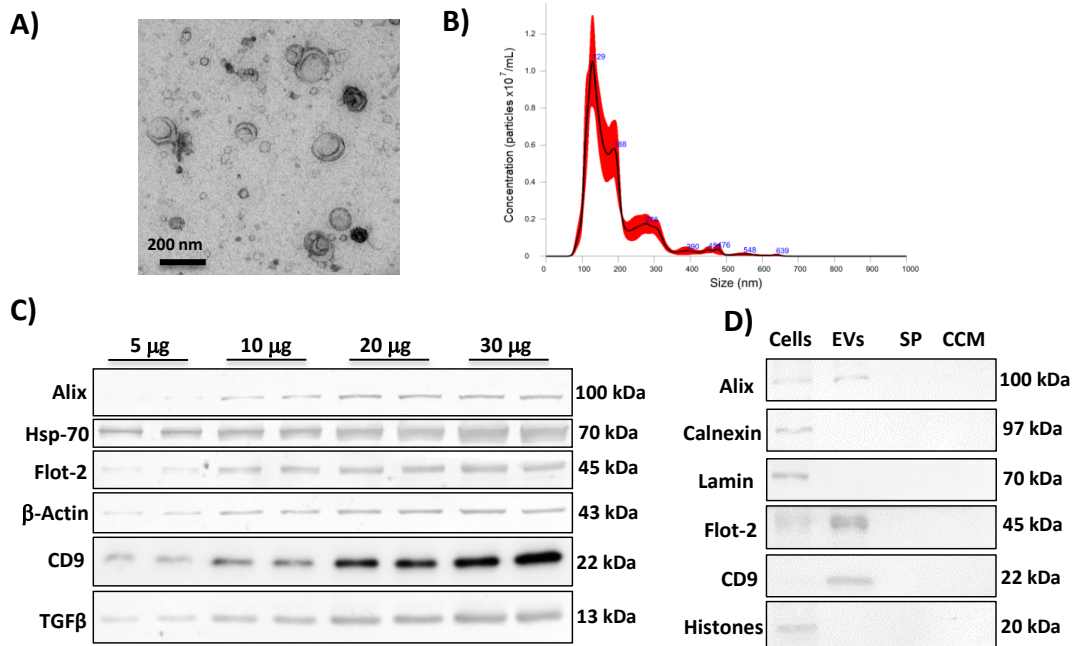


Figura 46. Caracterización de vesículas extracelulares (EVs) aisladas de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano. (A) Imagen representativa de las EVs obtenida por microscopía electrónica de transmisión tras tinción negativa. (B) Perfil de tamaños representativo de las EVs obtenido por análisis de seguimiento de nanopartículas. (C) Bandas representativas de marcadores de EVs (Alix, Hsp70, Flotilina-2 y CD9), de TGFβ y del control de carga β-actina medidos por Western blot con diferentes cantidades de proteína (5, 10, 20 y 30 μg). (D) Bandas representativas de marcadores de EVs (Alix, Flotilina-2 y CD9) y de marcadores negativos de EVs (calnexina, laminina e histonas) medidos por Western blot en los lisados de las células de origen (Cells), en las EVs, en el sobrenadante descartado tras el último paso de ultracentrifugación (SP) y el medio de cultivo celular (CCM).

La tinción negativa de las vesículas observada por microscopía electrónica de transmisión confirmó la presencia de vesículas extracelulares pequeñas (< 200 nm) con forma cóncava, características compatibles con exosomas (Fig. 46A). El análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) mostró que las EVs tenían un diámetro de 126 ± 8 nm y una concentración de $1.14 \pm 0.09 \times 10^{11}$ partículas/mL. En la Figura 46B se muestra un perfil de tamaños representativo obtenido por NTA. La presencia de marcadores de superficie característicos de EVs se analizó por Western blot (Fig. 46C), confirmando la presencia de los marcadores Alix, Hsp70, Flotilina-2 y CD9. También comparamos la presencia/ausencia de marcadores de EVs y marcadores de otros compartimentos celulares en distintas muestras obtenidas durante el proceso de aislamiento de las EVs a partir del medio de cultivo de las células madre mesenquimales: células MSC de origen, medio de cultivo celular (CCM), EVs aisladas y sobrenadante descartado tras el último paso de ultracentrifugación (SP) (Fig. 46D). Comprobamos que las EVs estaban enriquecidas en los marcadores Alix, Flotilina-2 y CD9, también presentes en las células de origen, y que carecían de calnexina (marcador de retículo endoplasmático), laminina (marcador de envoltura nuclear) y de histonas (marcador del interior del núcleo). Como era de esperar, no detectamos presencia de ninguno de estos marcadores ni en el medio de cultivo celular ni en el sobrenadante descartado tras la centrifugación. Además de los marcadores típicos de vesículas, también analizamos por Western blot la presencia de TGF β , observando un contenido elevado del mismo en las MSC-EVs (Fig. 46C)

CAPÍTULO 3. Las EVs de células madre mesenquimales revierten la neuroinflamación en cerebelo y la incoordinación motora asociada en ratas hiperamonémicas.

EXPERIMENTOS *IN VIVO*

3.1 Las vesículas inyectadas alcanzan el cerebelo.

Para confirmar que las vesículas inyectadas alcanzaban el cerebelo, las EVs derivadas de células madre mesenquimales se marcaron con el fluoróforo lipofílico Dil, se inyectaron por vía intravenosa en ratas hiperamonémicas y se analizó su presencia en cerebelo a las 72 h post-inyección (Fig. 47). Se observó que las EVs marcadas (señal roja) colocalizaban con neuronas de Purkinje, marcadas con calbindina (Fig. 47A); microglía (marcada con Iba1) en capa molecular (Fig. 47B) y en sustancia blanca (Fig. 47C); y con astrocitos en sustancia blanca (Fig. 47D).

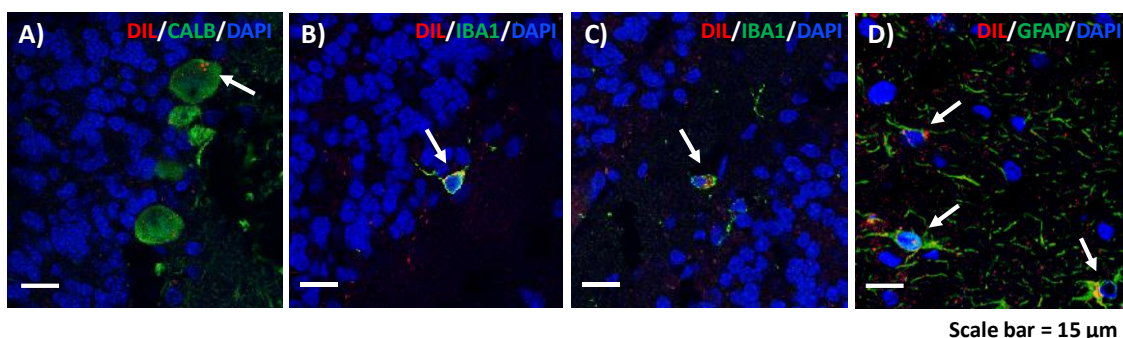


Figura 47. Las EVs marcadas con Dil (señal roja) alcanzan el cerebelo tras la inyección intravenosa. Se observó colocalización (señal verde) con (A) neuronas de Purkinje (marcadas con calbindina), (B) microglía (marcada con Iba1) en la capa molecular y en (C) la sustancia blanca y (D) astrocitos (marcados con GFAP) en la sustancia blanca. Los núcleos aparecen marcados en azul (DAPI). Barra de escala = 15 μm .

3.2 Las vesículas extracelulares de MSCs revierten la activación de microglía y astrocitos en cerebelo de ratas hiperamonémicas.

La activación de la microglía se analizó midiendo el área de las células marcadas con Iba1. La microglía activada reduce sus ramificaciones y adquiere una morfología ameboide, por lo que una reducción en el área de la microglía se consideró como activación de la misma.

Observamos una reducción del área de la microglía en el cerebelo de las ratas hiperamonémicas inyectadas con vehículo (PBS) en comparación con las ratas control, tanto en capa molecular ($194 \pm 9 \mu\text{m}^2$ en comparación con $248 \pm 14 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$) (Fig. 48A y 48D) como en sustancia blanca ($185 \pm 2 \mu\text{m}^2$ en comparación con $234 \pm 9 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$) (Fig. 48B y 48E). La inyección de EVs a ratas hiperamonémicas revirtió la activación de microglía en el cerebelo, tanto en capa molecular ($247 \pm 9 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$) (Fig. 48A y 48D) como en sustancia blanca ($225 \pm 13 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$) (Fig. 48B y 48E).

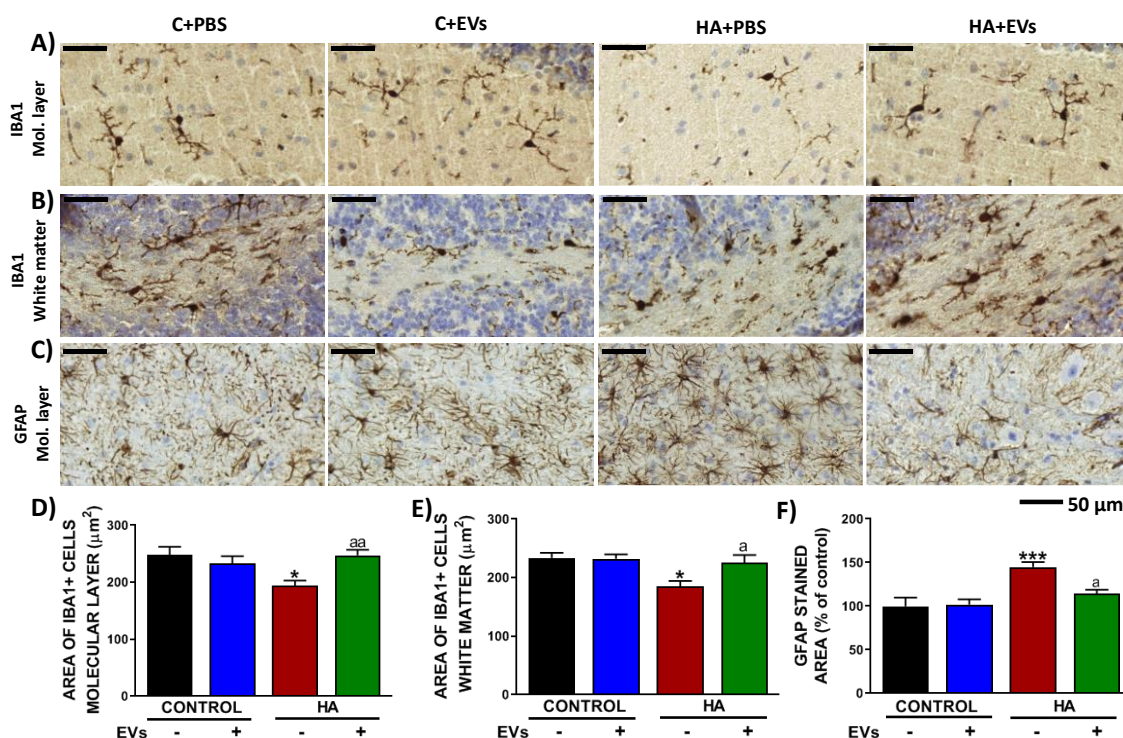


Figura 48. La inyección de vesículas extracelulares de MSCs revierte la activación de microglía y astrocitos en cerebelo de ratas hiperamonémicas. Imágenes representativas de inmunohistoquímica contra (A) Iba1 en la capa molecular, (B) Iba1 en sustancia blanca y (C) GFAP en cerebelo. Área de las células de microglía (marcadas con Iba1) (D) en capa molecular (n = 4-6) y (E) en sustancia blanca (n = 6). (F) Porcentaje de área teñida por anti-GFAP respecto a las ratas control inyectadas con PBS (n = 6-8) en cerebelo. Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores son la media ± SEM. Los valores significativamente diferentes del grupo control sin EVs se indican con asterisco (*p < 0.05, ***p < 0.001) y los valores significativamente diferentes del grupo HA sin EVs se indican con una a (a = p < 0.05, aa = p < 0.01). Barra de escala = 50 µm.

C+PBS = ratas control inyectadas con PBS; C+EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales; HA+PBS = ratas hiperamonémicas inyectadas con PBS; HA+EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales; HA = ratas hiperamonémicas; EVs = vesículas extracelulares de células madre mesenquimales.

El porcentaje de área teñida por GFAP aumentó en el cerebelo de ratas hiperamonémicas, reflejando un aumento en la activación de astrocitos (145 ± 15 % respecto a las ratas control inyectadas con PBS, $p < 0.001$) (Fig. 48B y 48F). Este efecto también se revirtió por la inyección de MSC-EVs (114 ± 5 %, $p < 0.05$).

Ninguno de estos parámetros se alteró de forma significativa en las ratas control inyectadas con MSC-EVs (área de la microglía: 234 ± 12 µm² en capa molecular y 232 ± 7 µm² en sustancia blanca; y porcentaje de área teñida por GFAP: 102 ± 6 %).

3.3 Las vesículas extracelulares de MSCs revierten las alteraciones en el contenido de marcadores de neuroinflamación en cerebelo de ratas hiperamonémicas.

Para evaluar si la inyección de MSC-EVs revertía la neuroinflamación en el cerebelo de ratas hiperamonémicas se analizó el contenido de marcadores pro-y anti-inflamatorios.

Puesto que uno de los posibles mecanismos por los que las EVs de células madre mesenquimales pueden ejercer un efecto beneficioso en patologías inflamatorias es la polarización de la microglía de un estado pro-inflamatorio hacia un estado anti-inflamatorio, se analizó el contenido de interleucinas características de microglía activada (IL-1 β , IL-6, IL-18) y de microglía anti-inflamatoria (IL-4, IL-10, arginasa 1) por Western blot.

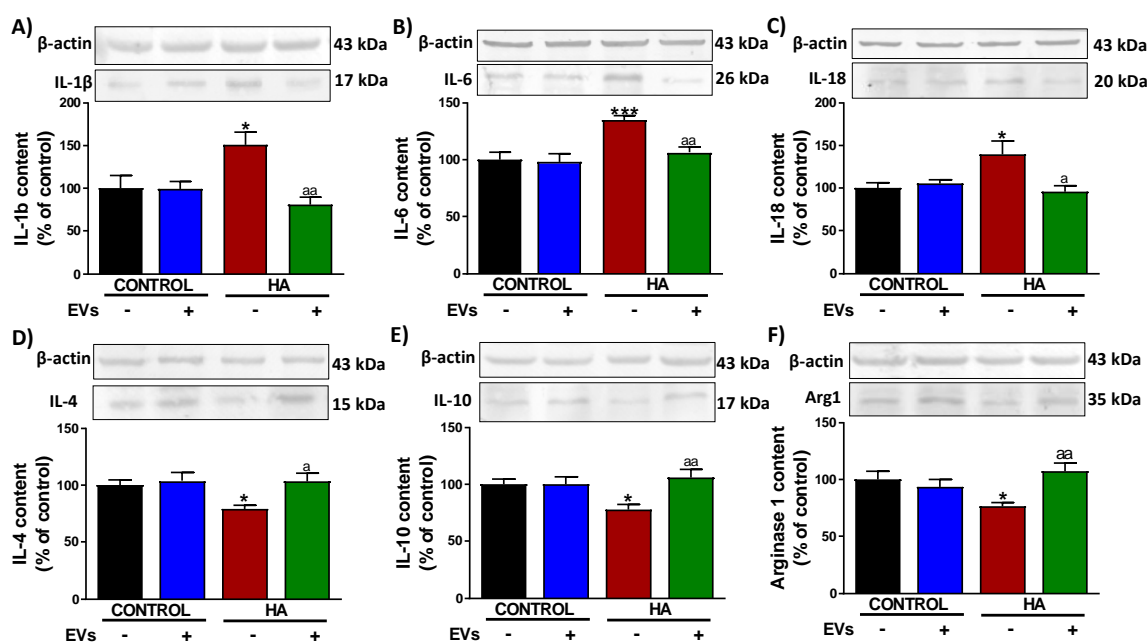


Figura 49. Las EVs de MSCs normalizan el contenido de marcadores pro- y anti-inflamatorios en cerebelo de ratas hiperamonémicas. Contenido proteico analizado mediante Western blot de (A) IL-1 β (n = 8-10), (B) IL-6 (n = 8), (C) IL-18 (n = 8-9), (D) IL-4 (n=8-9), (E) IL-10 (n = 9-11) y (D) arginasa 1 (n = 9-11) en homogenados de cerebelo. Se muestran imágenes representativas de las bandas para cada proteína, junto con las bandas correspondientes del control de carga (β -actina). Los valores se expresan como porcentaje de contenido de proteína respecto a las ratas control inyectadas con PBS y son la media \pm SEM. Para comparar los grupos se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes del grupo control sin EVs se indican con asterisco (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$) y los valores significativamente diferentes del grupo HA sin EVs se indican con a (a = $p < 0.05$, aa = $p < 0.01$).

HA = ratas hiperamonémicas; EVs = vesículas extracelulares de células madre mesenquimales.

Las interleucinas pro-inflamatorias se encuentran aumentadas en el cerebelo de las ratas hiperamonémicas inyectadas con vehículo en comparación con las ratas control: IL-1 β

($151 \pm 15 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 49A), IL-6 ($135 \pm 3 \%$, $p < 0.001$) (Fig. 49B) e IL-18 ($140 \pm 15 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 49C). La inyección de EVs derivadas de células madre mesenquimales en ratas hiperamonémicas normalizó los niveles de estas interleucinas (IL-1 β : $81 \pm 9 \%$, $p < 0.01$; IL-6: $106 \pm 5 \%$, $p < 0.01$; e IL-18: $96 \pm 7 \%$, $p < 0.05$). En cambio, los niveles de las interleucinas anti-inflamatorias IL-4 ($79 \pm 4 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 49D), IL-10 ($78 \pm 5 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 49E) y del marcador de microglía anti-inflamatoria arginasa 1 ($77 \pm 3 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 49F) estaban disminuidos en las ratas hiperamonémicas respecto a las ratas control. La inyección de MSC-EVs también revirtió este efecto, normalizando los niveles de estas proteínas (IL-4: $103 \pm 7 \%$, $p < 0.05$; IL-10: $106 \pm 7 \%$, $p < 0.01$; y arginasa 1: $107 \pm 8 \%$, $p < 0.01$).

Las ratas control inyectadas con MSC-EVs presentaban niveles comparables a los de las ratas control inyectadas con PBS en todos los parámetros medidos por Western blot (IL-1 β : $100 \pm 9 \%$; IL-6: $98 \pm 7 \%$; IL-18: $105 \pm 4 \%$; IL-4: $104 \pm 7 \%$; IL-10: $100 \pm 6 \%$; y Arg1: $94 \pm 6 \%$).

Por estudios previos del grupo, se sabe que las ratas hiperamonémicas presentan un aumento en cerebelo de TNF α y de su receptor TNFR1, lo cual aumenta la activación del factor NF- κ B en microglía. Esto aumenta la producción de glutaminasa 1, que genera glutamato. Este glutamato es liberado al espacio extracelular y captado por los astrocitos, junto con iones sodio. El cambio en el gradiente de sodio conduce a la liberación de GABA hacia el espacio extracelular mediante el transportador GAT3 en los astrocitos activados, alterando la neurotransmisión GABAérgica y produciendo incoordinación motora (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018). Por ello, se analizó mediante Western blot el contenido en cerebelo de algunas de las proteínas clave en esta vía.

Las ratas hiperamonémicas inyectadas con PBS presentaban un mayor contenido en cerebelo de TNF α ($130 \pm 11 \%$, $p < 0.01$) (Fig. 50A), TNFR1 ($126 \pm 5 \%$, $p < 0.01$) (Fig. 50B), glutaminasa 1 ($143 \pm 12 \%$, $p < 0.01$) (Fig. 50C) y de GAT3 ($136 \pm 13 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 50F) en comparación con las ratas inyectadas con PBS. La inyección de EVs de MSCs a ratas hiperamonémicas normalizó el contenido en cerebelo de estas proteínas (TNF α : $87 \pm 7 \%$, $p < 0.05$; TNFR1: $97 \pm 5 \%$, $p < 0.01$; glutaminasa 1: $101 \pm 4 \%$, $p < 0.01$; y GAT3: $92 \pm 6 \%$, $p < 0.01$). En cambio, la inyección de MSC-EVs a ratas control no alteró significativamente el contenido en estas proteínas (TNF α : $96 \pm 7 \%$, TNFR1: $104 \pm 5 \%$, glutaminasa 1: $107 \pm 6 \%$, y GAT3: $107 \pm 9 \%$).

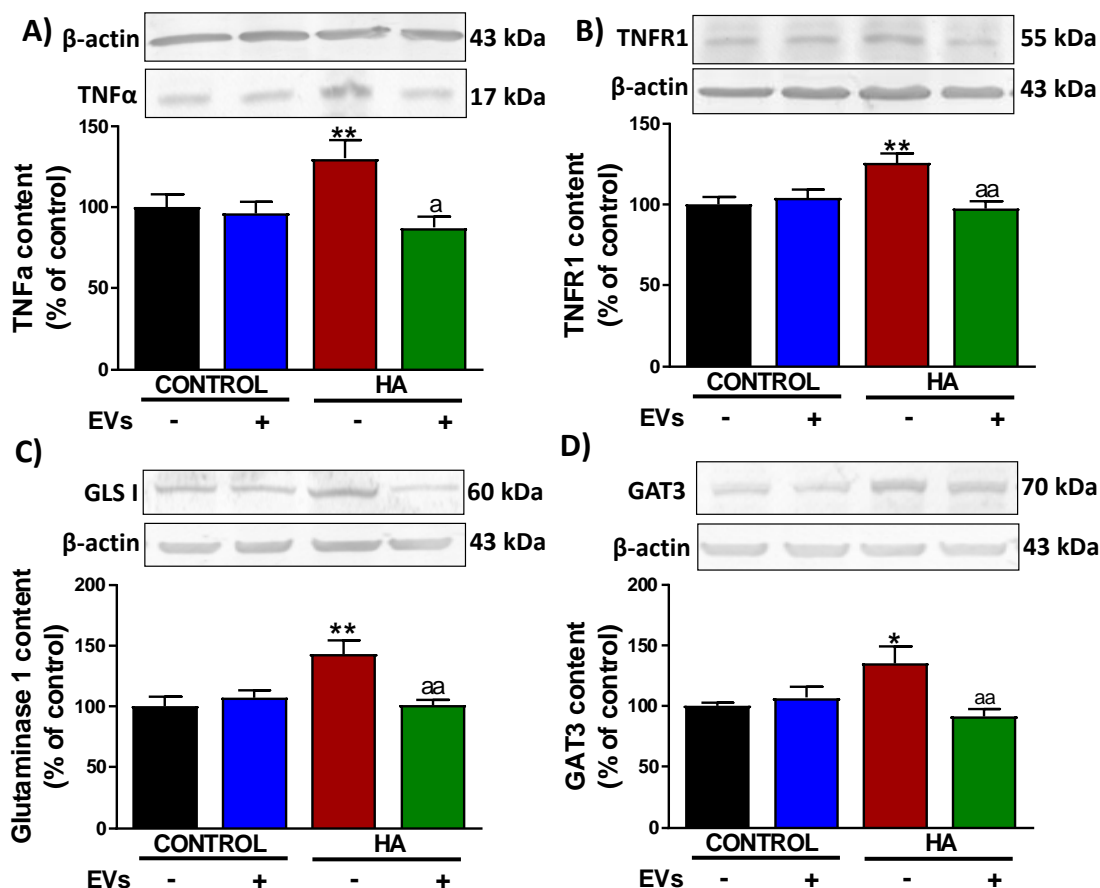


Figura 50. Las EVs de MSCs normalizan el contenido de proteínas relacionadas con la incoordinación motora en cerebelo. Contenido proteico analizado mediante Western blot de (A) TNFα (n = 8-11), (B) TNFR1 (n = 8), (C) glutaminasa 1 (n = 13-15) y (D) GAT3 (n = 8-12) en homogenados de cerebelo. Se muestran imágenes representativas de las bandas para cada proteína, junto con las bandas correspondientes del control de carga (β-actina). Los valores se expresan como porcentaje respecto a las ratas control inyectadas con PBS y son la media ± SEM. Para comparar los grupos se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes de grupo control sin EVs se indican con asterisco (*p < 0.05, **p < 0.01) y los valores significativamente diferentes del grupo HA sin EVs se indican con a (a = p < 0.05, aa = p < 0.01).

HA = ratas hiperamonémicas; EVs = vesículas extracelulares de células madre mesenquimales.

También se analizó el contenido de proteínas implicadas en la señalización purinérgica en los homogenados de cerebelo, ya que esta se encuentra alterada en la microglía activada. Se midió el contenido proteico de los receptores purinérgicos P2X4R y P2X7R, aumentados en microglía activada; de BDNF, una citocina que aumenta cuando se activa P2X4R y de las citocinas CCL2 y CCL20, que contribuyen en los procesos de activación de la microglía, aumentando la expresión en membrana de los receptores purinérgicos (Tsuda e Inoue, 2016).

La hiperamonemia aumentó los niveles en cerebelo de los receptores P2X4R ($124 \pm 6 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 51A) y P2X7R ($139 \pm 12 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 51B) respecto a las ratas control inyectadas con PBS. La inyección de MSC-EVs a ratas hiperamonémicas revirtió este aumento ($102 \pm 3 \%$, $p < 0.05$; y $90 \pm 8 \%$, $p < 0.05$, respectivamente), mientras que la inyección de MSC-EVs a ratas control no alteró los niveles de estos receptores ($98 \pm 7 \%$ y $102 \pm 12 \%$, respectivamente).

Las ratas hiperamonémicas también presentan un aumento en cerebelo en el contenido de BDNF, CCL2 y CCL20 respecto a las ratas control inyectadas con PBS ($148 \pm 19 \%$, $p < 0.05$; $133 \pm 7 \%$, $p < 0.01$; y $131 \pm 11 \%$, $p < 0.05$, respectivamente) (Fig. 51C-E). La inyección de MSC-EVs normalizó el contenido de estas citocinas en las ratas hiperamonémicas (BDNF: $94 \pm 5 \%$, $p < 0.01$; CCL2: $95 \pm 5 \%$, $p < 0.01$; y CCL20: $103 \pm 5 \%$, $p < 0.05$), sin producir ninguna alteración significativa al ser inyectadas a ratas control (BDNF: $97 \pm 12 \%$, CCL2: $99 \pm 8 \%$ y CCL20: $106 \pm 7 \%$).

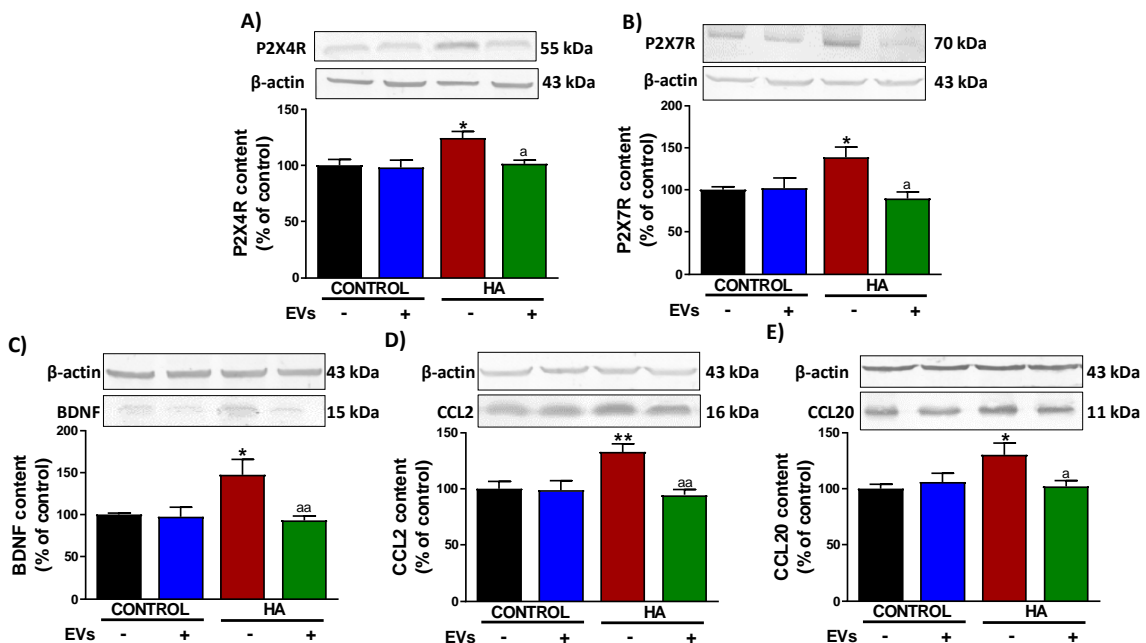


Figura 51. Contenido en cerebelo de proteínas relacionadas con la activación de microglía. Contenido proteico analizado mediante Western blot de (A) P2X4R (n = 8-10), (B) P2X7R (n = 7-9), (C) BDNF (n = 8-9), (D) CCL2 (n = 7-9) y (E) CCL20 (n = 9-10) en homogenados de cerebelo. Se muestran imágenes representativas de las bandas para cada proteína, junto con las bandas correspondientes del control de carga (β -actina). Los valores se expresan como porcentaje de contenido de proteína respecto a las ratas control inyectadas con PBS y son la media \pm SEM. Para comparar los grupos se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes del grupo control sin EVs se indican con asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) y los valores significativamente diferentes del grupo HA sin EVs se indican con a (a = $p < 0.05$, aa = $p < 0.01$).

HA = ratas hiperamonémicas; EVs = vesículas extracelulares de células madre mesenquimales.

3.4 Las vesículas extracelulares derivadas de MSCs restauran la coordinación motora en ratas hiperamonémicas.

Una de las alteraciones observadas en hiperamonemia es la pérdida de coordinación motora. Esta puede analizarse midiendo el número de resbalones cometidos por las ratas en el test beam walking. Como se observa en la Figura 52, las ratas hiperamonémicas inyectadas con PBS (-) cometen un mayor número de errores que las ratas control inyectadas con PBS (-) (0.47 ± 0.05 frente a 0.15 ± 0.05 , $p < 0.01$), es decir, presentan incoordinación motora. En cambio, las ratas hiperamonémicas inyectadas con vesículas de MSCs cometen un número de errores equivalente al de las ratas control y significativamente menor que las ratas HA inyectadas con vehículo (0.15 ± 0.05 frente a 0.47 ± 0.05 , $p < 0.01$). Por otra parte, la inyección de MSC-EVs a ratas control no produjo ningún efecto significativo (0.32 ± 0.07 errores).

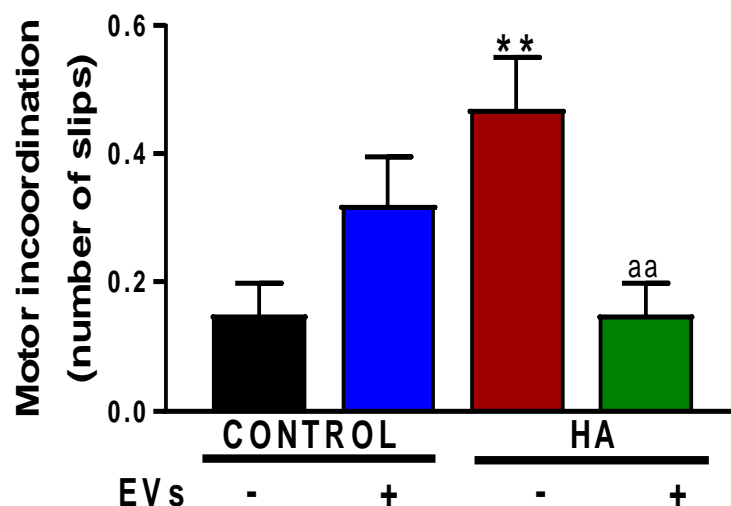


Figura 52. La inyección de vesículas extracelulares derivadas de MSCs revierte la incoordinación motora en ratas hiperamonémicas. Número de resbalones en el test beam walking. Se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey para comparar los grupos. Los valores son la media \pm SEM de 10 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes del grupo control sin EVs se indican con asterisco (** $p < 0.01$) y los valores significativamente diferentes del grupo HA sin EVs se indican con a (aa = $p < 0.01$).

HA = ratas hiperamonémicas; EVs = vesículas extracelulares derivadas de células madre mesenquimales.

EXPERIMENTOS *EX VIVO*

Para investigar en más detalle los mecanismos por los que las vesículas extracelulares de MSCs revierten la neuroinflamación en cerebelo y restauran la coordinación motora, utilizamos un sistema *ex vivo* en el que incubamos cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas con MSC-EVs.

Se ha propuesto que las células madre mesenquimales pueden modular la activación de la microglía mediante la secreción de TGF β y que las vesículas extracelulares de las MSCs contienen TGF β , lo que mediaría algunos de los efectos terapéuticos de estas vesículas (Wada *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2013; Noh *et al.*, 2016; Shelke *et al.*, 2019; Yao *et al.*, 2019). En base a estos estudios, planteamos la hipótesis de que los efectos beneficiosos de las EVs de MSCs sobre la neuroinflamación en ratas hiperamonémicas podrían estar mediados por el TGF β presente en sus membranas. Para evaluar esta posibilidad, investigamos si los efectos de las MSC-EVs se prevenían en el sistema *ex vivo* si se bloqueaba la acción del TGF β incubando previamente las vesículas con anti-TGF β . También se prepararon MSCs en las que se eliminó el TGF β por silenciamiento y se evaluó si las EVs de estas MSCs sin TGF β perdían sus efectos beneficiosos. Por último, se determinó si la adición de TGF β recombinante a los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas reproducía los efectos beneficiosos de las MSC-EVs.

Para las figuras de este apartado de experimentos *ex vivo*, las abreviaturas de los grupos experimentales corresponden a:

C = cortes de cerebelo de ratas control; HA = cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas; HA+anti-TGFb = cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas incubados con anticuerpo contra el factor de crecimiento transformante beta (TGF β); HA+rec TGFb = cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas incubados con TGF β recombinante; HA+EVs = cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas incubados con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales; HA+EVs+anti-TGFb = cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas incubados con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales previamente tratadas con anticuerpo contra TGF β ; HA+EVs lacking TGFb = cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas incubados con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales en las que se ha silenciado la expresión de TGF β

3.5 La incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de MSCs revierte la activación de microglía y astrocitos en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas, en un proceso dependiente de TGF β .

De forma similar a lo observado *in vivo*, el área de las células de microglía se encuentra reducida en los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas frente a los cortes de ratas control, tanto en la capa molecular ($138 \pm 7 \mu\text{m}^2$ en comparación con $191 \pm 5 \mu\text{m}^2$, $p < 0.0001$) (Fig. 53A y C) como en la sustancia blanca ($137 \pm 8 \mu\text{m}^2$ en comparación con $183 \pm 9 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$) (Fig. 53B y D), indicando que la microglía está activada. La incubación de los cortes de cerebelo de ratas HA con vesículas extracelulares de MSCs

revirtió la activación de la microglía en la capa molecular ($180 \pm 7 \mu\text{m}^2$, $p < 0.001$) (Fig. 53A y C) y en la sustancia blanca ($188 \pm 10 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$) (Fig. 53B y D), mostrando un área similar a la de las ratas control.

Estos resultados muestran que el sistema *ex vivo* reproduce los efectos sobre la activación de la microglía observados *in vivo* y que es adecuado para estudiar los mecanismos de acción de las MSC-EVs.

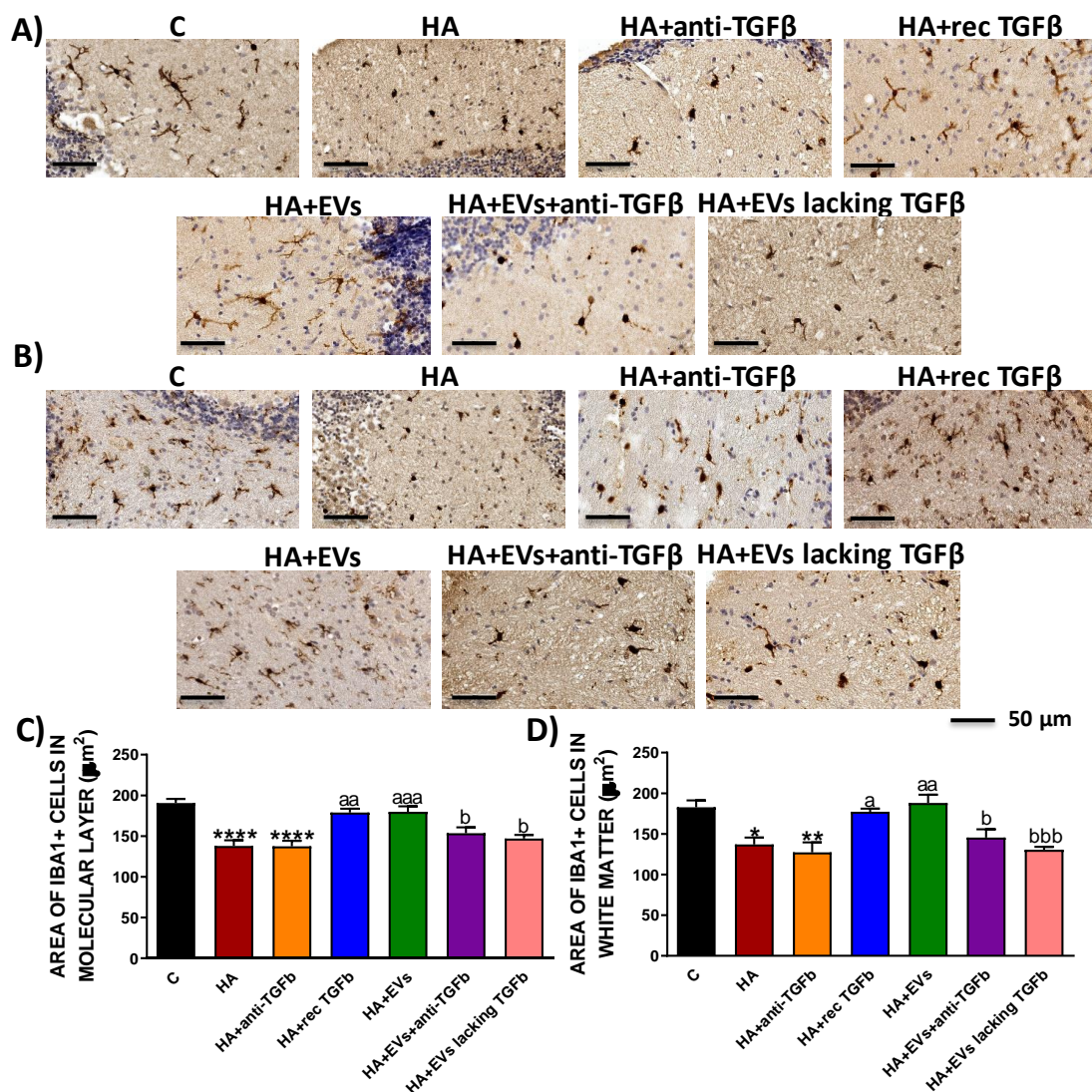


Figura 53. La incubación con EVs de MSCs revierte la activación de microglía en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas. Se muestran imágenes representativas de la inmunohistoquímica contra Iba1 (A) capa molecular y (B) sustancia blanca del cerebelo. Área de la microglía en (C) capa molecular ($n = 5-10$) y (D) sustancia blanca ($n = 7-10$). Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores son la media \pm SEM. Los valores significativamente diferentes respecto al grupo control se indican con asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$), los valores significativamente diferentes del grupo HA se indican con a (a = $p < 0.05$, aa = $p < 0.01$, aaa = $p < 0.001$) y los valores significativamente diferentes del grupo HA+EVs se indican con b (b = $p < 0.05$, bbb = $p < 0.001$). Barra de escala = $50 \mu\text{m}$.

La reversión de la activación de microglía se previene si se bloquea la acción del TGF β , tanto bloqueando el TGF β de la membrana de las vesículas con un anticuerpo anti-TGF β (capa molecular: $154 \pm 7 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$; sustancia blanca: $146 \pm 10 \%$, $p < 0.05$) o incubando los cortes con EVs que carecen de TGF β (capa molecular: $147 \pm 4 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$; sustancia blanca: $130 \pm 4 \%$, $p < 0.001$). En cambio, los efectos beneficiosos se reproducen si se incuban los cortes de cerebelo de ratas HA con TGF β recombinante (capa molecular: $179 \pm 5 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$; sustancia blanca: $177 \pm 4 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$). Esto indica que el TGF β juega un papel esencial en los efectos beneficiosos de las EVs de MSCs.

Los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas incubados con anti-TGF β presentan niveles de activación de microglía similares a los de los cortes de ratas HA basales (capa molecular: $138 \pm 7 \mu\text{m}^2$, $p < 0.0001$ respecto al grupo control; sustancia blanca: $127 \pm 12 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$ respecto al grupo control), indicando que la adición de anti-TGF β a los cortes no tiene un efecto sobre estos parámetros y no es responsable de la mejoría observada en los cortes incubados con vesículas de MSCs previamente tratadas con anti-TGF β .

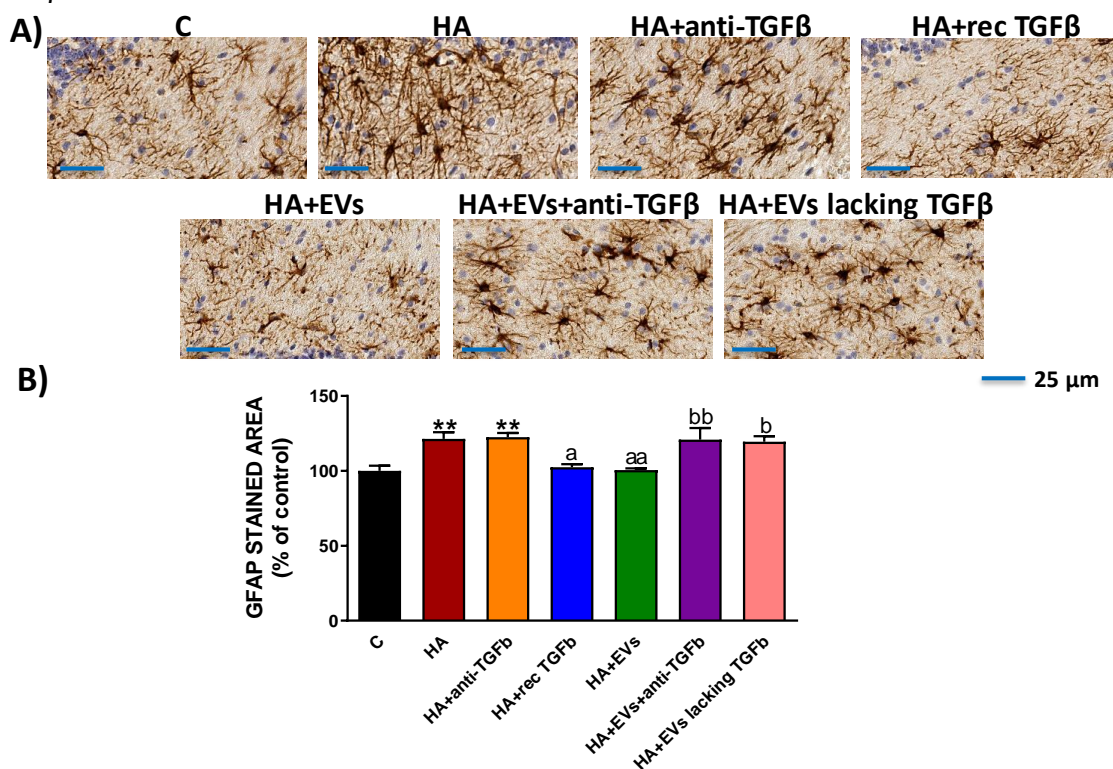


Figura 54. La incubación con EVs de MSCs revierte la activación de astrocitos en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas. (A) Se muestran imágenes representativas de la inmunohistoquímica contra GFAP en sustancia blanca del cerebelo. (B) Porcentaje de área teñida con GFAP en sustancia blanca respecto al grupo control ($n = 7-10$). Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores son la media \pm SEM. Los valores significativamente diferentes del grupo control se indican con asterisco (** $p < 0.01$), los valores significativamente diferentes del grupo HA se indican con a ($a = p < 0.05$, $aa = p < 0.01$) y los valores significativamente diferentes del grupo HA+EVs se indican con b ($b = p < 0.05$, $bb = p < 0.01$). Barra de escala = $25 \mu\text{m}$.

La activación de los astrocitos se analizó midiendo el porcentaje de área teñida con GFAP en la sustancia blanca y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 54. El área teñida con GFAP se encontraba aumentada en los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas frente a ratas control ($121 \pm 5 \%$, $p < 0.01$), reflejando una activación de los astrocitos. Este efecto se revirtió al incubar *ex vivo* cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas con MSC-EVs ($101 \pm 2 \%$, $p < 0.01$), pero no si las EVs se habían tratado previamente con anti-TGF β ($121 \pm 8 \%$, $p < 0.01$) o si se había eliminado el TGF β de las EVs ($120 \pm 4 \%$, $p < 0.05$). La incubación de los cortes de ratas hiperamonémicas con TGF β recombinante también redujo la activación de los astrocitos ($102 \pm 2 \%$, $p < 0.05$), mientras que la incubación de los cortes de cerebelo de ratas HA con el anti-TGF β no tuvo efectos sobre la activación de astrocitos ($123 \pm 3 \%$, $p < 0.01$ respecto a los cortes de ratas control).

3.6 La incubación *ex vivo* con vesículas extracelulares de MSCs normaliza el contenido de proteínas relacionadas con la incoordinación motora en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas.

Tal y como se ha descrito previamente, algunas de las proteínas clave en la inducción de la incoordinación motora en ratas hiperamonémicas y que se encuentran aumentadas en el cerebelo de estas ratas son el TNF α , su receptor TNFR1, la enzima glutaminasa 1 y el transportador de GABA GAT3.

En la Figura 55 se observa el aumento de TNF α ($134 \pm 8 \%$, $p < 0.001$) (Fig. 55A), TNFR1 ($143 \pm 9 \%$, $p < 0.0001$) (Fig. 55B), glutaminasa 1 ($125 \pm 6 \%$, $p < 0.01$) (Fig. 55C) y GAT3 ($130 \pm 6 \%$, $p < 0.0001$) (Fig. 55D) en los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas. La incubación de cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas con vesículas extracelulares de MSCs normalizó el contenido de estas proteínas (TNF α : $104 \pm 8 \%$, $p < 0.01$; TNFR1: $97 \pm 7 \%$, $p < 0.0001$; glutaminasa 1: $89 \pm 7 \%$, $p < 0.001$; y GAT3: $102 \pm 2 \%$, $p < 0.0001$). Sin embargo, el efecto de las MSC-EVs se previene si las EVs proceden de células en las que se había eliminado el TGF β (TNF α : $131 \pm 3 \%$, $p < 0.05$; TNFR1: $124 \pm 6 \%$, $p < 0.05$; glutaminasa 1: $126 \pm 6 \%$, $p < 0.001$; y GAT3: $123 \pm 3 \%$, $p < 0.05$). Al bloquear el TGF β de las EVs con un anti-TGF β se previenen parcialmente sus efectos beneficios, observándose una tendencia a la disminución en el contenido de TNF α ($123 \pm 5 \%$) y de TNFR1 ($117 \pm 5 \%$) y un efecto significativo en el contenido de glutaminasa 1 ($115 \pm 5 \%$, $p < 0.05$) y GAT3 ($121 \pm 2 \%$, $p < 0.05$). La incubación de los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas con TGF β recombinante también revierte el aumento en el contenido de estas proteínas (TNF α : $105 \pm 4 \%$, $p < 0.05$; TNFR1: $101 \pm 1 \%$, $p < 0.001$; glutaminasa 1: $102 \pm 3 \%$, $p < 0.05$; y GAT3: $105 \pm 2 \%$, $p < 0.01$), mientras que la incubación de los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas con anti-TGF β no tuvo un efecto significativo sobre el contenido de ninguna de estas proteínas (TNF α : $128 \pm 6 \%$, $p < 0.05$; TNFR1: $128 \pm 5 \%$, $p < 0.05$; glutaminasa 1: $127 \pm 5 \%$, $p < 0.05$; y GAT3: $125 \pm 7 \%$, $p < 0.01$ respecto al grupo control).

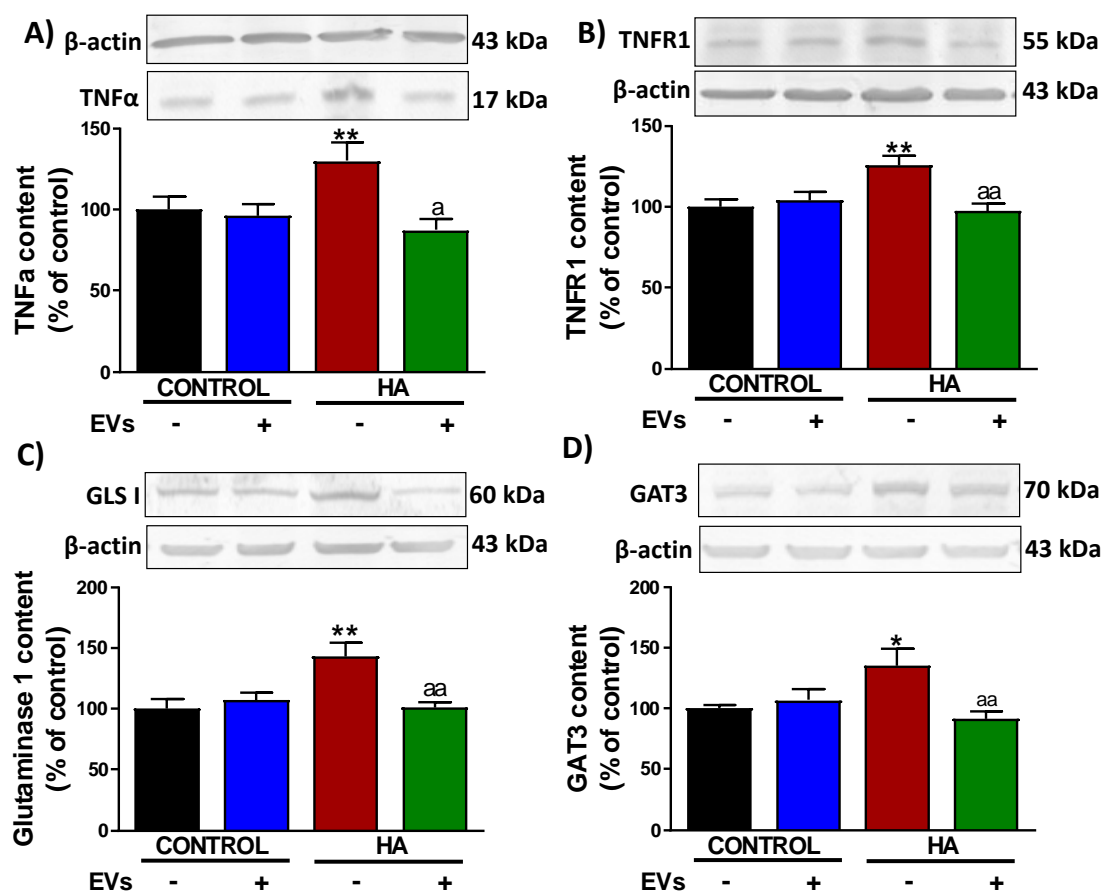


Figura 55. La incubación de los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas con EVs de MSCs normaliza el contenido de proteínas relacionadas con la incoordinación motora. Contenido proteico analizado mediante Western blot de (A) TNFα (n = 8-14), (B) TNFR1 (n = 8-15), (C) glutaminasa 1 (n = 8-13) y (D) GAT3 (n = 8-14) en homogenados de los cortes de cerebelo tras la incubación con los diferentes tratamientos *ex vivo*. Se muestran imágenes representativas de las bandas para cada proteína, junto con las bandas correspondientes del control de carga (β-actina). Los valores se expresan como porcentaje de contenido de proteína respecto a los cortes control y son la media ± SEM. Para comparar los grupos se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes del grupo control se indican con asterisco (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001), los valores significativamente diferentes del grupo HA se indican con a (a = p < 0.05, aa = p < 0.01, aaa = p < 0.001, aaaa = p < 0.0001) y los valores significativamente diferentes del grupo HA+EVs se indican con b (b = p < 0.05, bbb = p < 0.001).

3.7 El TGFβ de las vesículas extracelulares de MSCs reduce la activación de NF-κB en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas.

Puesto que la vía de señalización de NF-κB en cerebelo es clave para la inducción de la incoordinación motora en ratas hiperamonémicas, se estudió si las vesículas extracelulares de células madre mesenquimales revertían la activación de NF-κB en

cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas y si este efecto era dependiente del TGFβ de las EVs.

Se observó que el número de células de microglía que expresaban la subunidad p50 del factor de transcripción NF-κB estaba aumentado en los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas (27 ± 3 células/mm² frente a 14 ± 2 en cortes control, $p < 0.0001$) y que la incubación de los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas con MSC-EVs revirtió este aumento (17 ± 1 células/mm², $p < 0.01$) (Fig. 56).

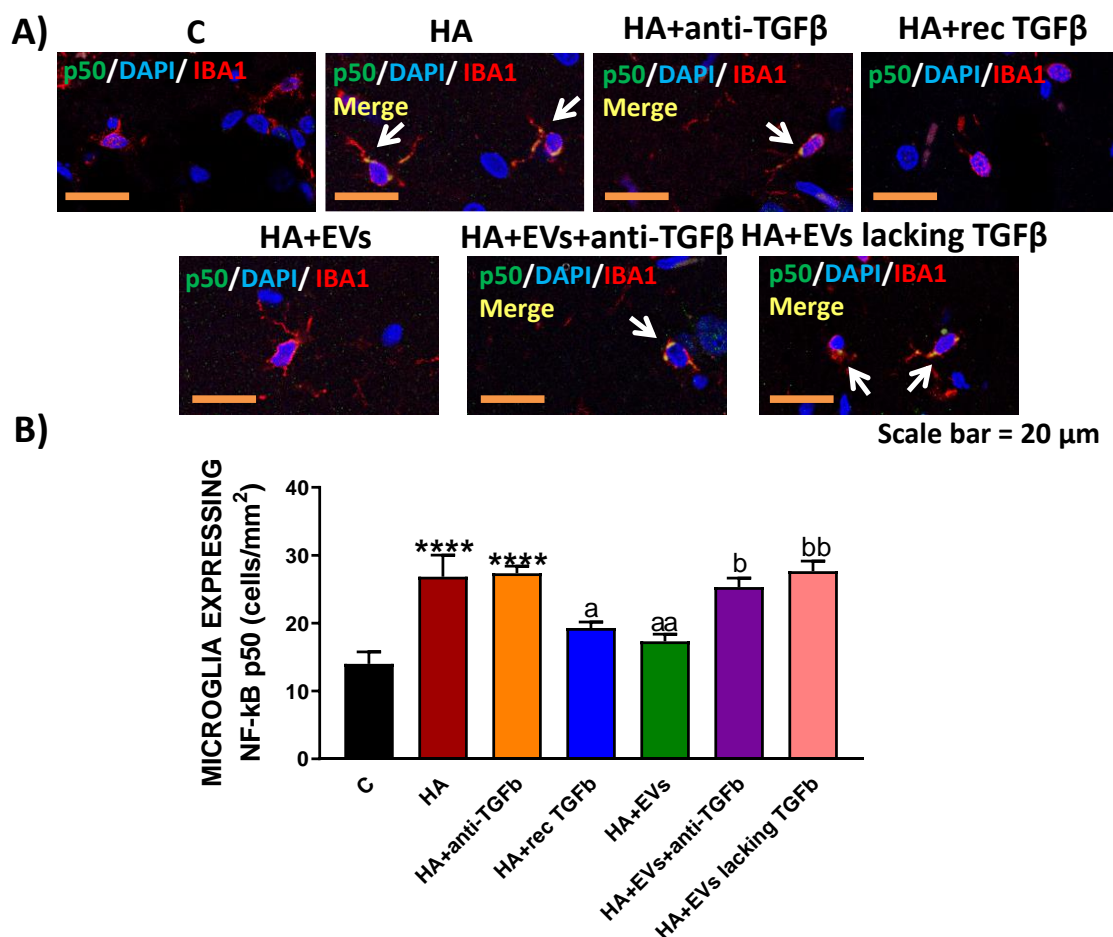


Figura 56. Las vesículas extracelulares de MSCs revierten la activación de NF-κB en microglía en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas. (A) Imágenes representativas de doble inmunofluorescencia contra Iba1 (microglía, en rojo) y la subunidad p50 del factor NF-κB p50 (en verde) en sustancia blanca. (B) Número de células de microglía por mm² que expresan la subunidad p50 de NF-κB en la sustancia blanca (n = 6-7). Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores son la media ± SEM. Los valores significativamente diferentes del grupo control se indican con asterisco (**** $p < 0.0001$), los valores significativamente diferentes del grupo HA se indican con a (a = $p < 0.05$, aa = $p < 0.01$) y los valores significativamente diferentes del grupo HA+EVs se indican con b (b = $p < 0.05$, bb = $p < 0.01$). Barra de escala = 20 μm.

En cambio, si se incubaban los cortes de ratas hiperamonémicas con EVs previamente incubadas con anti-TGF β o con EVs procedentes de células en las que se ha silenciado el TGF β , no se producía la activación de NF- κ B (25 ± 1 células/mm 2 , $p < 0.05$; y 28 ± 1 células/mm 2 , $p < 0.01$, respectivamente). La incubación de los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas con anti-TGF β no redujo el aumento de NF- κ B en microglía (27 ± 1 células/mm 2 , $p < 0.0001$ respecto al grupo control), indicando que los efectos observados de las MSC-EVs incubadas con el anti-TGF β no se deben a un efecto del anti-TGF β . La incubación de los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas con TGF β normalizó los niveles de NF- κ B (19 ± 1 células/mm 2 , $p < 0.05$).

DISCUSIÓN

En este capítulo se muestra que las vesículas extracelulares de células madre mesenquimales revierten la neuroinflamación en cerebelo y la incoordinación motora en ratas hiperamonémicas, modelo animal de encefalopatía hepática mínima.

La hiperamonemia es uno de los factores principales que contribuyen a las alteraciones neurológicas (cognitivas y motoras) en pacientes con EHM y EH clínica (Shawcross *et al.*, 2004; Felipo *et al.*, 2012; Felipo, 2013). De hecho, en las últimas décadas, el tratamiento de estos pacientes iba dirigido principalmente a reducir los niveles de amonio, mediante la administración de lactulosa, la restricción de la ingesta proteica u otros medios (Gluud *et al.*, 2016; Zucker y Redulla, 2019). Sin embargo, estudios más recientes demuestran que los efectos deletéreos de la hiperamonemia en la función cognitiva y motora están mediados por la neuroinflamación, la cual produce alteraciones en la neurotransmisión, que finalmente causan el deterioro en la función cognitiva y motora (revisado por Cabrera-Pastor *et al.* (2019a)). Los estudios en modelos animales de hiperamonemia y EHM muestran que la función cognitiva y motora se puede restaurar mediante diferentes aproximaciones farmacológicas, actuando sobre diferentes pasos de las vías implicadas en la inflamación, la neuroinflamación y la neurotransmisión GABAérgica (Cauli *et al.*, 2009; Rodrigo *et al.*, 2010; Agusti *et al.*, 2011; Johansson *et al.*, 2015; Hernández-Rabaza *et al.*, 2015, 2016a and 2016b; Dadsetan *et al.*, 2016a and 2016b; Cabrera-Pastor *et al.*, 2017 y 2018; Malaguarnera *et al.*, 2019). No obstante, estos tratamientos podrían tener efectos secundarios en pacientes con cirrosis y no se aplican en la práctica clínica como tratamiento para la EHM. Por ejemplo, Rodrigo *et al.* (2010) mostraron que el tratamiento de ratas hiperamonémicas con el anti-inflamatorio ibuprofeno en ratas hiperamonémicas revierte la activación de microglía y los niveles de IL-1 β y PGE2 en cerebelo, restaurando la capacidad de aprendizaje y la coordinación motora. Sin embargo, los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos como el ibuprofeno están asociados a un mayor riesgo de hemorragia varicosa y deterioro de la función renal, por lo que deben evitarse en la medida de lo posible en pacientes cirróticos (Chandok y Watt, 2010; Runyon, 2011). En consecuencia, resulta de interés investigar nuevos tratamientos para reducir la neuroinflamación y los déficits cognitivos asociados que produzcan menos efectos secundarios.

En los últimos años, se han publicado diversos estudios que muestran que las vesículas extracelulares de MSCs reducen la inflamación en diferentes situaciones patológicas. Las MSC son células multipotentes no hematopoyéticas que presentan propiedades regenerativas, inmunomoduladoras y anti-inflamatorias (Squillaro *et al.*, 2016; Galipeau y Sensébé, 2018; Trento *et al.*, 2018). Se ha demostrado que ejercen sus efectos terapéuticos principalmente de manera paracrina, secretando diferentes citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Deng *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2015; Gnecci *et al.*, 2016). Las vesículas extracelulares liberadas por las MSCs constituyen uno de los componentes del secretoma de mayor interés terapéutico, ya que recapitulan los efectos beneficiosos de las células parentales, suponiendo una alternativa prometedora a la terapia celular (Lou *et al.*, 2017; Bagno *et al.*, 2018). Las MSC-EVs

actúan como mediadores entre las MSCs y las células diana, portando proteínas bioactivas, microARNs y lípidos (Heldring *et al.*, 2015). El uso de las MSC-EVs presenta varias ventajas para su aplicación en clínica respecto a la terapia con células completas, incluyendo un mayor perfil de seguridad y una menor inmunogenicidad (Liew *et al.*, 2017).

La terapia con EVs de MSCs emerge como una estrategia prometedora para el tratamiento de enfermedades con un componente inflamatorio, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal, la artritis, la sepsis, la enfermedad de injerto contra huésped, la esclerosis múltiple o la diabetes de tipo I (Le Blanc *et al.*, 2004; Zappia *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Augello *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2009; Németh *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2013) y también se ha propuesto como terapia para pacientes con COVID-19 (Cheng *et al.*, 2021; Kirkham *et al.*, 2021). La administración intravenosa de EVs de MSCs aumentó la neurogénesis, la remodelación de las neuritas y la angiogénesis en un modelo de infarto cerebral en rata, mejorando la recuperación funcional de los animales tras el infarto (Xin *et al.*, 2013). Zhang *et al.* (2015) observaron resultados similares en modelo de lesión cerebral traumática, mostrando una reducción en la inflamación y mejor funcionalidad tras la administración de las MSC-EVs. Riazifar *et al.* (2019) observaron que las EVs de MSCs reducían la neuroinflamación y la desmielinización y mejoraban los resultados en los test de funcionalidad en un modelo murino de encefalomiелitis autoinmune. Reza-Zaldivar *et al.* (2019) mostraron que las MSC-EVs promovían la neurogénesis y restauraban la función cognitiva en un modelo murino de Alzheimer.

En base a los datos de la literatura, evaluamos si la inyección de EVs de MSCs reducía la neuroinflamación en cerebelo de ratas hiperamonémicas y los déficits de coordinación motora.

En primer lugar, comprobamos que las vesículas inyectadas alcanzaban el cerebelo de las ratas hiperamonémicas, co-localizando con neuronas de Purkinje, microglía en sustancia blanca y capa molecular y astrocitos en sustancia blanca. Esto es consistente con otros estudios en los que se ha demostrado que las EVs de MSCs pueden llegar al cerebro tras su inyección por vía intravenosa. Por ejemplo, Otero-Ortega *et al.* (2018) analizaron la biodistribución de MSC-EVs marcadas con el fluoróforo Dil, el mismo marcaje utilizado en esta tesis, en un modelo de hemorragia intracerebral en rata, observando que alcanzaban el cerebro tras su inyección intravenosa, co-localizando con neuronas y células de microglía.

Los efectos y el mecanismo de acción propuesto de las MSC-EVs en ratas hiperamonémicas se resumen en la Figura 57. Las ratas hiperamonémicas presentan neuroinflamación, con activación de microglía y astrocitos. Observamos que las MSC-EVs reducen la activación de la microglía y astrocitos en cerebelo e inducen un cambio en la polarización de la microglía desde un fenotipo pro-inflamatorio (caracterizado por niveles elevados de IL-1 β , IL-6 y TNF α , y niveles bajos de IL-4, IL-10 y arginasa 1) hacia un fenotipo anti-inflamatorio, en el que se normalizan los niveles de estos marcadores.

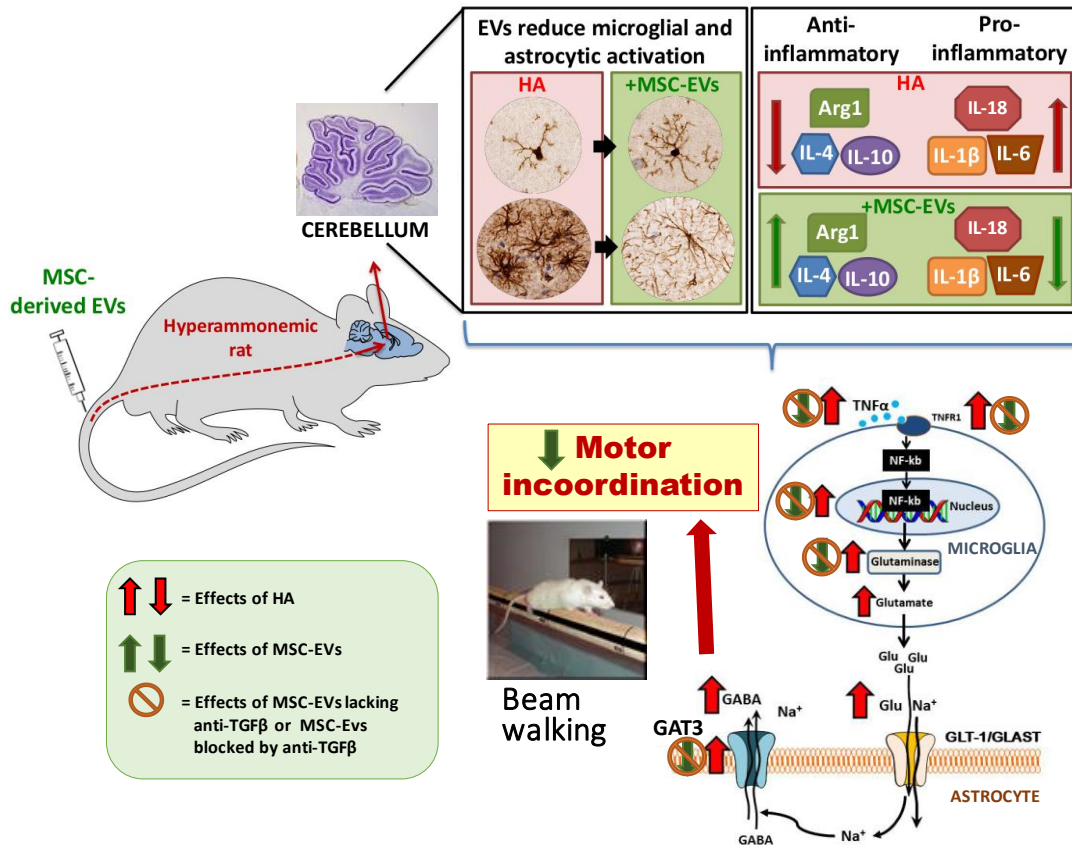


Figura 57. Resumen de los principales efectos de las vesículas extracelulares de células madre mesenquimales en cerebelo de ratas hiperamonémicas: mecanismos subyacentes. Las ratas hiperamonémicas presentan neuroinflamación en cerebelo, con activación de microglía y astrocitos; una polarización de la microglía hacia un estado pro-inflamatorio, con mayor contenido de IL-1 β , IL-6 e IL-18 y menor contenido de IL-4, IL-10 y Arg1; e incoordinación motora. Las vesículas extracelulares de MSCs alcanzan el cerebelo tras ser inyectadas a ratas hiperamonémicas, revierten la activación de astrocitos y microglía y su polarización hacia un estado pro-inflamatorio y restauran la coordinación motora. En el cerebelo de ratas hiperamonémicas hay un aumento de TNF α , que interacciona con su receptor TNFR1, activando el factor de transcripción NF- κ B. Esto induce la transcripción de genes como la glutaminasa, enzima que sintetiza glutamato. Con esto, se produce más glutamato, que es liberado al medio extracelular e internalizado en los astrocitos mediante los transportadores GLT1 y GLAST. Estos transportadores introducen iones sodio (Na⁺) junto con el glutamato, modificando el gradiente de sodio. Esto a su vez induce la liberación de GABA hacia el espacio extracelular porque revierte la función del transportador GAT3 en los astrocitos. El aumento de GABA extracelular es el responsable de incoordinación motora observada en ratas hiperamonémicas. Las MSC-EVs actúan sobre esta vía, en un proceso dependiente de TGF β , reduciendo el contenido de TNF α y TNFR1 y la activación de NF- κ B. De esta forma, se reducen los niveles de glutaminasa y de GAT3 y se normaliza su función, lo que normalizaría el contenido de GABA extracelular y, en consecuencia, la coordinación motora. *Imagen modificada de Cabrera-Pastor et al., 2018.*

En cuanto a las alteraciones neurológicas, la inyección de EVs de MSCs revierte la incoordinación motora en ratas hiperamonémicas.

El mecanismo por el que la hiperamonemia crónica induce incoordinación motora en las ratas se ha identificado recientemente en nuestro grupo, por lo que analizamos si las MSC-EVs estaban actuando sobre esta vía.

Las ratas hiperamonémicas presentan un aumento en cerebelo de TNF α y de su receptor TNFR1, lo cual produce un aumento de expresión del factor NF- κ B en la microglía y de la síntesis de proteínas como la glutaminasa 1, responsable de la producción de glutamato. En consecuencia, aumenta el contenido de glutamato, que es liberado al medio extracelular y captado por los astrocitos mediante los transportadores GLT1 y GLAST. Estos transportadores introducen iones de sodio en los astrocitos al internalizar el glutamato, alterando el gradiente de iones sodio, lo que induce la liberación del neurotransmisor GABA hacia el exterior de la célula por el transportador GAT3, cuya función está invertida en los astrocitos activados (libera GABA hacia el medio extracelular en vez de captarlo hacia el interior de la célula). Esta mayor concentración de GABA extracelular en el cerebelo es responsable de la incoordinación motora en las ratas hiperamonémicas (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018).

Observamos que las EVs de MSCs normalizan el contenido de TNF α y de su receptor TNFR1 en cerebelo de ratas hiperamonémicas, tanto *in vivo* como *ex vivo* (Figura 57). Los resultados obtenidos muestran que las MSC-EVs reducen la activación de NF- κ B en la microglía en el cerebelo de las ratas hiperamonémicas. En estudios anteriores del grupo se ha visto que las ratas con hiperamonemia crónica presentan activación del factor de transcripción NF- κ B en cerebelo: en neuronas, se da un cambio en la distribución celular del factor de transcripción, que se libera del factor I κ B α en el citosol y se transloca al núcleo; mientras que en microglía se observa un aumento del número de células que expresan NF- κ B (Balzano *et al.*, 2020a). Dado que la activación de NF- κ B induce la transcripción de la enzima glutaminasa, responsable de la síntesis de glutamato, en ratas hiperamonémicas (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018), medimos sus niveles en cerebelo tras la inyección de MSC-EVs a ratas hiperamonémicas y tras la incubación de los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas con MSC-EVs, comprobando que las MSC-EVs normalizaban el contenido en cerebelo tanto de glutaminasa 1 como de glutamato. Las EVs de MSCs también revierten el aumento en el contenido de GAT3 en el cerebelo de ratas hiperamonémicas. El aumento de GABA extracelular en el cerebelo de las ratas hiperamonémicas es el causante de la incoordinación motora (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018), por lo que los resultados indican que las EVs de MSCs revierten la incoordinación motora en ratas hiperamonémicas normalizando la vía TNFR1-NF- κ B-glutaminasa-GAT3 en cerebelo.

En la caracterización por Western blot de las MSC-EVs estudiadas en esta tesis observamos que estas contenían niveles elevados de TGF β . Varios estudios sugieren un papel del TGF β como mediador de algunos de los efectos beneficiosos de las MSCs y de las vesículas extracelulares liberadas por las MSCs. Noh *et al.*, (2016) observaron que las

MSCs modulan las propiedades funcionales de la microglía mediante la secreción de TGF β , promoviendo el cambio desde un fenotipo de activación clásica hacia un fenotipo anti-inflamatorio. Concretamente, este cambio en la polarización de la microglía se asocia con una reducción de la activación de NF- κ B, que a su vez reduce la transcripción de proteínas pro-inflamatorias. Islam *et al.* (2018) muestran que el TGF β ejerce efectos anti-inflamatorios sostenidos en la microglía: en la microglía estimulada con LPS se induce la fosforilación de la quinasa IKK, que a su vez se activa y fosforila I κ B α , liberando la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B y permitiendo su translocación al núcleo, que conduce a la producción de factores pro-inflamatorios. Sin embargo, en la microglía tratada con TGF β se prevenían estos efectos, sugiriendo que uno de los mecanismos de acción del TGF β es la inhibición del factor NF- κ B.

Por ello, evaluamos el papel del TGF β de las MSC-EVs en los experimentos *ex vivo* (Fig. 57). Observamos que las MSC-EVs pierden su capacidad de revertir la activación de microglía y astrocitos en los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas si se bloquea el TGF β en la superficie de las EVs con anti-TGF β o si se añaden EVs aisladas de células en las que se ha eliminado el TGF β . También comprobamos que la normalización de los niveles de TNF α , TNFR1, glutaminasa y GAT3, así como la reducción de la activación de NF- κ B, no ocurrían al incubar los cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas con EVs en las que se ha bloqueado el TGF β con anti-TGF β o con EVs aisladas de células sin TGF β . Además, los efectos beneficiosos de las MSC-EVs se reproducen al incubar los cortes con TGF β recombinante. Estos datos demuestran que el TGF β de las EVs de MSCs es un mediador clave de los efectos sobre la neuroinflamación y la neurotransmisión de estas vesículas en el cerebelo de las ratas hiperamonémicas. Los datos obtenidos en esta tesis y la información de la literatura indican que el TGF β de las MSC-EVs actuaría reduciendo la activación del factor de transcripción NF- κ B, lo que reduciría la producción de factores pro-inflamatorios como el TNF α , la IL-1 β y la IL-6, así como de la enzima glutaminasa, reduciendo el GABA extracelular en cerebelo y revertiendo así la incoordinación motora en ratas hiperamonémicas.

CAPÍTULO 4. Las EVs de células madre mesenquimales revierten la neuroinflamación en hipocampo y los déficits cognitivos asociados en ratas hiperamonémicas.

EXPERIMENTOS *IN VIVO*

4.1 Las vesículas inyectadas alcanzan el hipocampo.

Para confirmar que las vesículas inyectadas alcanzaban el hipocampo, se marcaron las MSC-EVs con el fluoróforo lipofílico Dil, se inyectaron por vía intravenosa en ratas control y se evaluó su presencia en hipocampo a las 72 h post-inyección (Fig. 58). Las EVs marcadas (señal roja) se detectaron principalmente en microglía (Fig. 58A) y en neuronas de la capa granular (Fig. 58B), mientras que no se observó co-localización con astrocitos (Fig. 58C). La señal roja de las EVs marcadas con Dil co-localizaba con Alix (señal verde), un marcador de EVs, confirmando que correspondía efectivamente a EVs inyectadas y no a una señal endógena del tejido o ruido de fondo (Fig. 58D). En la inmunofluorescencia contra Alix también se observa señal verde que no co-localiza con la señal roja, lo que correspondería a EVs endógenas.

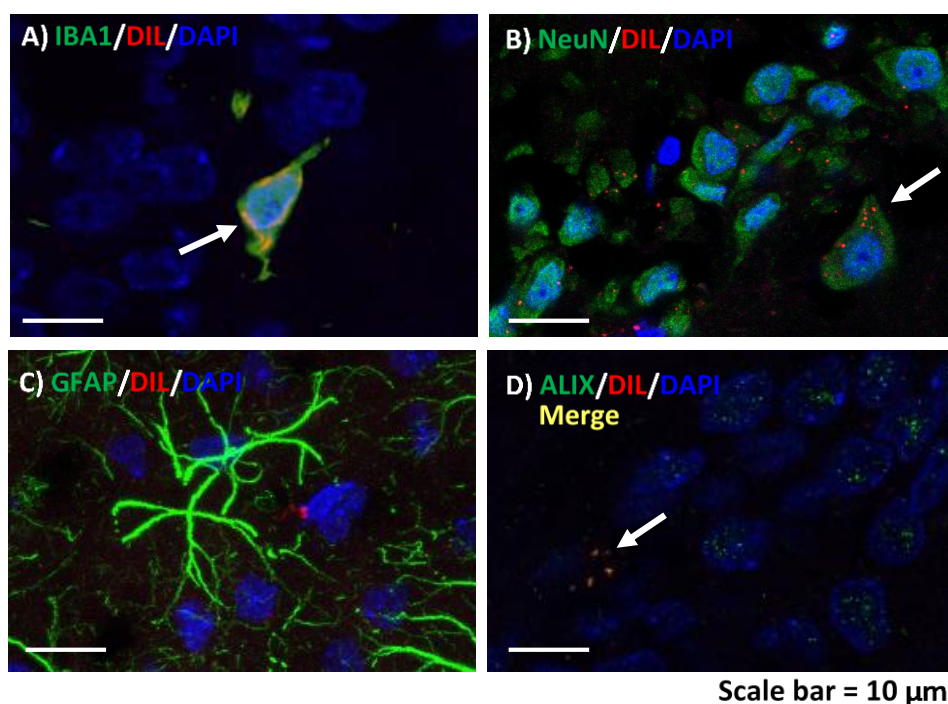


Figura 58. Las EVs de MSCs marcadas con Dil (señal roja) alcanzan el hipocampo tras la inyección intravenosa. Se observó co-localización (señal verde) con (A) microglía (marcada con Iba1), (B) neuronas granulares (núcleos marcados en azul con DAPI) y (C) astrocitos (marcados con GFAP). (D) La señal roja fluorescente co-localizaba con Alix, un marcador de vesículas extracelulares. Barra de escala = 10 μm .

4.2 Las vesículas extracelulares de MSCs revierten la activación de microglía y astrocitos en hipocampo de ratas hiperamonémicas.

Las ratas hiperamonémicas muestran neuroinflamación, con activación de microglía y astrocitos en hipocampo. Las células de microglía adquieren una forma amebode cuando se activan, reduciendo sus procesos y, por tanto, presentando una reducción en su área.

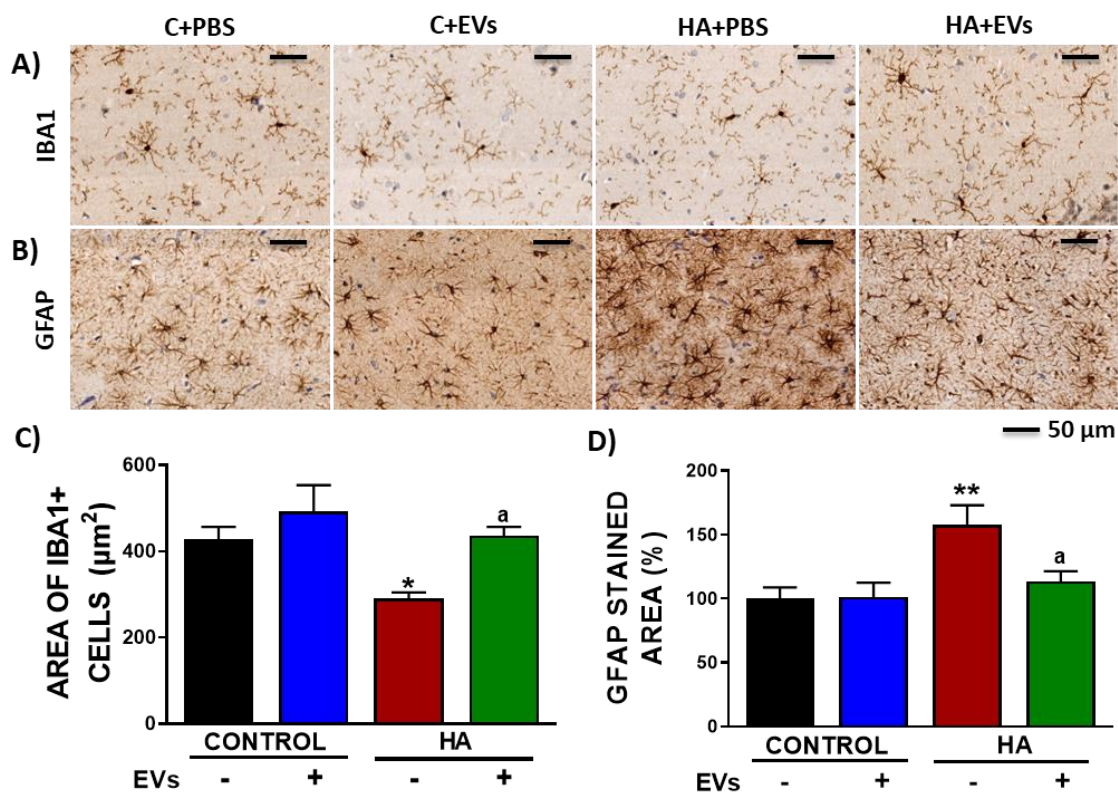


Figura 59. Las vesículas extracelulares de MSCs inyectadas revierten la activación de microglía y astrocitos en hipocampo de ratas hiperamonémicas. Imágenes representativas de inmunohistoquímica contra (A) Iba1 y (B) GFAP en hipocampo. (C) Área de las células de microglía (marcadas con Iba1) ($n = 5-6$) y (D) porcentaje de área teñida por anti-GFAP respecto a las ratas control inyectadas con PBS ($n = 6-8$) en hipocampo. Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores son la media \pm SEM. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) y los valores significativamente diferentes entre los grupos HA+PBS y HA+EVs se indican con una a ($a = p < 0.05$). Barra de escala = 50 μm .

C+PBS = ratas control inyectadas con PBS; C+EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales; HA+PBS = ratas hiperamonémicas inyectadas con PBS; HA+EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales; EVs = vesículas extracelulares derivadas de células madre mesenquimales.

El área de las células de microglía se encuentra reducida en las ratas hiperamonémicas frente a las ratas control ($290 \pm 15 \mu\text{m}^2$ en comparación con $428 \pm 28 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$),

indicando que la microglía está activada. La inyección de vesículas extracelulares de MSCs en ratas hiperamonémicas revirtió este efecto ($436 \pm 21 \mu\text{m}^2$ en comparación con $290 \pm 15 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$), mostrando un área similar a la de las ratas control (Fig. 59A y 59C), indicando que las EVs inyectadas revierten la activación de la microglía.

El porcentaje de área teñida por GFAP aumentó en el hipocampo de ratas hiperamonémicas, reflejando un aumento en la activación de astrocitos ($157 \pm 15 \%$ respecto a las ratas control inyectadas con PBS, $p < 0.01$) (Fig. 59B y 59D). Este efecto también se revirtió por la inyección de MSC-EVs ($113 \pm 8 \%$ de área teñida en las ratas hiperamonémicas inyectadas con MSC-EVs frente a las ratas hiperamonémicas inyectadas con PBS, $p < 0.05$).

Ninguno de estos parámetros se alteró de forma significativa en las ratas control inyectadas con MSC-EVs (área de la microglía $492 \pm 51 \mu\text{m}^2$ y porcentaje de área teñida por GFAP $101 \pm 11 \%$).

Los efectos sobre la activación de microglía se confirmaron evaluando mediante inmunofluorescencia el número de células marcadas con CD68, característico de microglía activada (Figura 60).

Se observó que las ratas hiperamonémicas presentaban un aumento en el número de células positivas para CD68 en hipocampo respecto a las ratas control (20 ± 2 células positivas/ mm^2 frente a 12 ± 1 células positivas/ mm^2 , $p < 0.05$). La inyección de MSC-EVs en ratas hiperamonémicas revirtió este efecto, reduciendo el número de células positivas para CD68 hasta niveles comparables con los controles (8 ± 3 células positivas/ mm^2 en las ratas hiperamonémicas inyectadas con MSC-EVs respecto a 20 ± 2 células positivas/ mm^2 en las ratas hiperamonémicas inyectadas con PBS, $p < 0.01$). En las ratas control inyectadas con MSC-EVs se observa una reducción del número de células marcadas con CD68 respecto a las ratas control, aunque este efecto no es significativo (4 ± 2 células positivas/ mm^2 frente a 12 ± 1 células positivas/ mm^2) (Fig. 60).

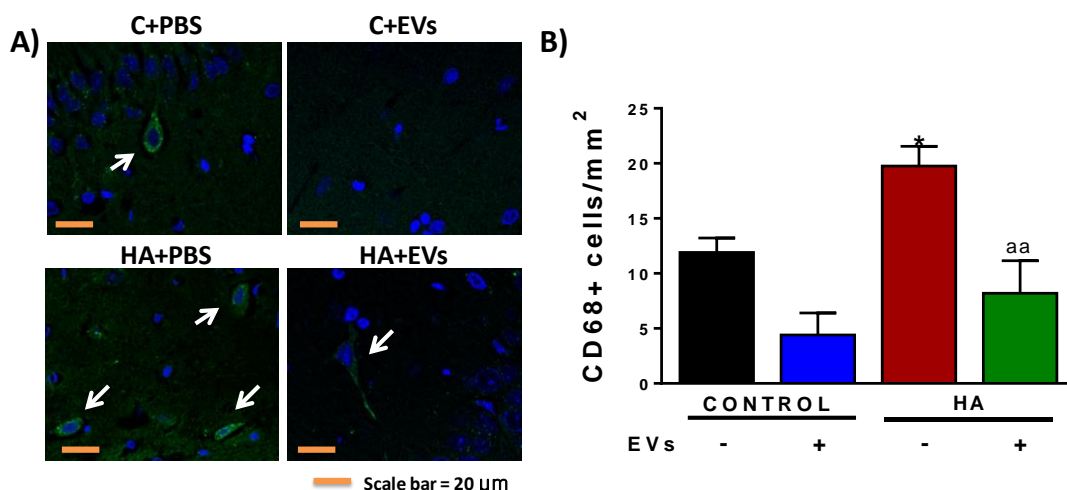


Figura 60. Las vesículas extracelulares de MSCs inyectadas reducen la cantidad de microglía activada en hipocampo de ratas hiperamonémicas. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra CD68 en hipocampo. **(B)** Número de células de microglía activadas por mm² (células positivas para CD68). Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores son la media ± SEM de 4-5 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asterisco (* $p < 0.05$) y los valores significativamente diferentes entre los grupos HA+PBS y HA+EVs se indican con una a (aa = $p < 0.01$). Barra de escala = 20 μm.

C+PBS = ratas control inyectadas con PBS; C+EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales; HA+PBS = ratas hiperamonémicas inyectadas con PBS; HA+EVs = ratas hiperamonémicas inyectadas con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales; EVs = vesículas extracelulares derivadas de células madre mesenquimales.

4.3 Las vesículas extracelulares derivadas de MSCs revierten las alteraciones en el contenido de marcadores de neuroinflamación en hipocampo de ratas hiperamonémicas.

Para evaluar si la inyección de MSC-EVs revertía la neuroinflamación en el hipocampo de ratas con hiperamonemia se analizó el contenido de marcadores pro- y anti-inflamatorios.

Mediante inmunohistoquímica, se observó un aumento de la expresión de las citocinas pro-inflamatorias TNF α ($131 \pm 5 \%$, $p < 0.01$) (Fig. 61A y Fig. 61C) e IL-1 β ($115 \pm 3 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 61B y Fig. 61D) en las neuronas granulares de la región CA1 del hipocampo en ratas hiperamonémicas. La inyección de MSC-EVs a ratas hiperamonémicas normalizó el contenido de ambas citocinas ($90 \pm 5 \%$, $p < 0.001$ y $92 \pm 5 \%$, $p < 0.001$, respectivamente). La inyección de EVs a ratas control no alteró el contenido de TNF α ni de IL-1 β ($113 \pm 7 \%$ y $103 \pm 1 \%$, respectivamente).

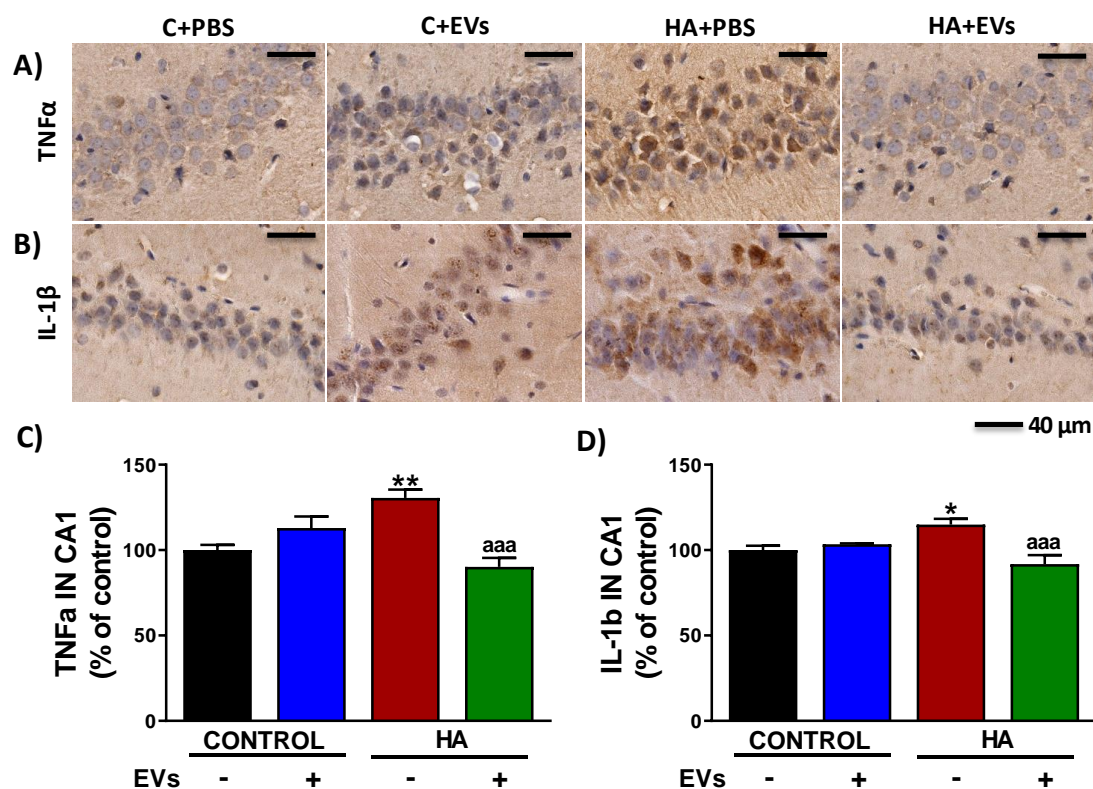


Figura 61. Las vesículas extracelulares de MSCs inyectadas reducen la expresión de los marcadores pro-inflamatorios TNF α e IL-1 β en hipocampo de ratas hiperamonémicas. Imágenes representativas de inmunohistoquímica contra (A) TNF α e (B) IL-1 β en la región CA1 del hipocampo. (C) Contenido de TNF α (n = 4-5) y de (D) IL-1 β (n = 5-6) en la región CA1 del hipocampo, expresado como porcentaje respecto a las ratas control inyectadas con PBS. Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores son la media \pm SEM. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) y los valores significativamente diferentes entre los grupos HA+PBS y HA+EVs se indican con a (aaa= $p < 0.001$). Barra de escala = 40 μ m.

C+PBS = ratas control inyectadas con PBS; C+EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales; HA+PBS = ratas hiperamonémicas inyectadas con PBS; HA+EVs = ratas hiperamonémicas inyectadas con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales; EVs = vesículas extracelulares derivadas de células madre mesenquimales.

Puesto que uno de los posibles mecanismos por los que las EVs de células madre mesenquimales pueden ejercer un efecto beneficioso en patologías inflamatorias es la polarización de la microglía de un estado pro-inflamatorio hacia un estado anti-inflamatorio, se analizó el contenido de interleucinas características de microglía pro-inflamatoria (IL-6, IL-1 β) y de microglía anti-inflamatoria (IL-4, IL-10) mediante Western blot. Se observó un aumento de las interleucinas pro-inflamatorias IL-6 ($131 \pm 10 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 62A) e IL-1 β ($126 \pm 6 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 62B) en hipocampo de las ratas hiperamonémicas en comparación con las ratas control. La inyección de MSC-

EVs en ratas hiperamonémicas normalizó los niveles de ambas interleucinas ($92 \pm 8 \%$, $p < 0.01$ y $78 \pm 7 \%$, $p < 0.001$, respectivamente). En contraste, los niveles de las interleucinas anti-inflamatorias IL-4 ($73 \pm 5 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 62C) e IL-10 ($81 \pm 5 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 62D) estaban disminuidos en las ratas hiperamonémicas. La inyección de MSC-EVs también revirtió este efecto, normalizando los niveles de estas interleucinas ($111 \pm 9 \%$, $p < 0.01$ y $102 \pm 5 \%$, $p < 0.05$, respectivamente).

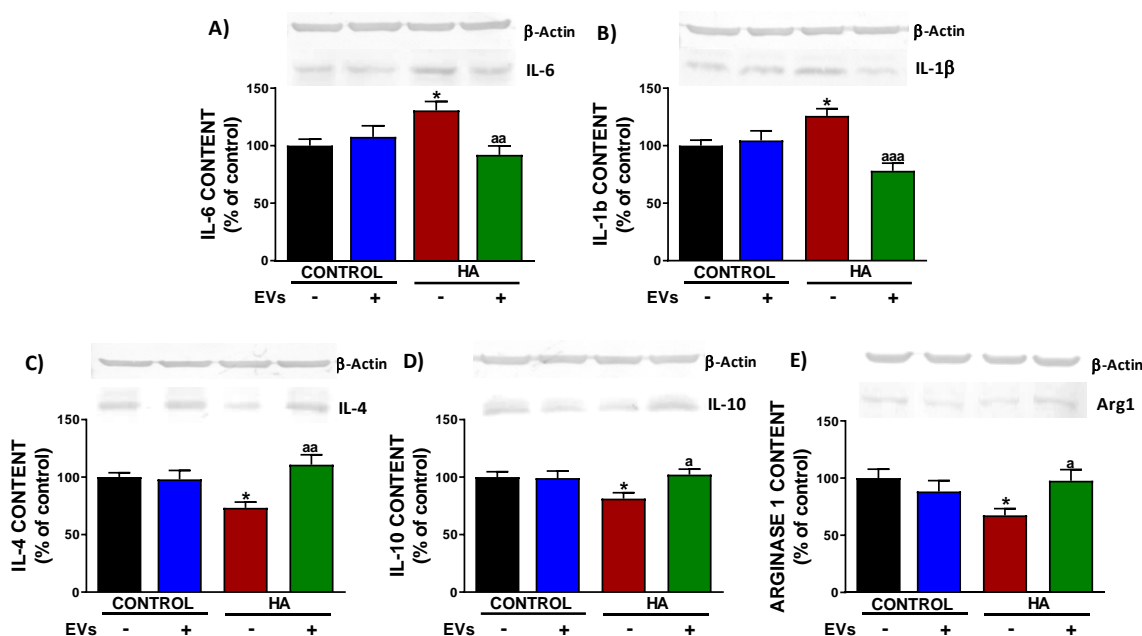


Figura 62. Las EVs de MSCs normalizan el contenido de marcadores pro- y anti-inflamatorios en hipocampo de ratas hiperamonémicas. Contenido proteico analizado mediante Western blot de (A) IL-6 (n = 10-11), (B) IL-1β (n = 10-12), (C) IL-4 (n = 10-11), (D) IL-10 (n = 13-17) y (E) arginasa 1 (n = 10-15) en homogenados de hipocampo. Se muestran imágenes representativas de las bandas para cada proteína, junto con las bandas correspondientes del control de carga (β-actina). Los valores se expresan como porcentaje de contenido de proteína respecto a las ratas control inyectadas con PBS y son la media \pm SEM. Para comparar los grupos se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asterisco (* $p < 0.05$) y los valores significativamente diferentes entre los grupos HA+PBS y HA+EVs se indican con a (a = $p < 0.05$, aa = $p < 0.01$, aaa = $p < 0.001$).

HA = ratas hiperamonémicas; EVs = vesículas extracelulares derivadas de células madre mesenquimales.

También se analizó el contenido en arginasa 1, un marcador de microglía anti-inflamatoria. El contenido en arginasa 1 se encontraba disminuido en el hipocampo de ratas hiperamonémicas en comparación con las ratas control ($67 \pm 6 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 62E) y la inyección de MSC-EVs en ratas hiperamonémicas lo normalizó ($98 \pm 10 \%$, $p < 0.05$).

Las ratas control inyectadas con MSC-EVs presentaban niveles comparables a los de las ratas control inyectadas con PBS en todos los parámetros medidos por Western blot (IL-6: 108 ± 10 %; IL-1 β : 105 ± 8 %; IL-4: 98 ± 8 %; IL-10: 99 ± 6 %; y Arg1: 88 ± 9 %).

4.4 Las vesículas extracelulares de MSCs restauran la memoria y el aprendizaje en ratas hiperamonémicas.

Las ratas hiperamonémicas presentan déficits en la función cognitiva, entre ellos déficits de memoria y aprendizaje que son consecuencia de una función alterada del hipocampo.

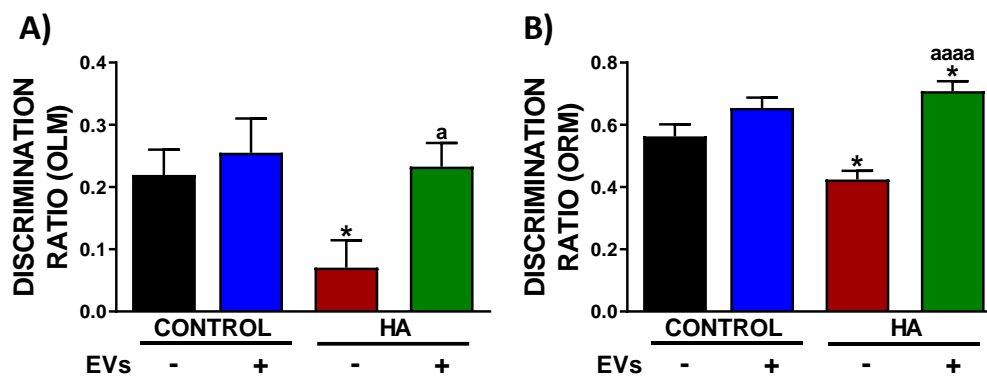


Figura 63. La inyección de EVs de MSCs restaura la memoria de localización de objetos y la memoria de reconocimiento de objetos en ratas hiperamonémicas. Ratio de discriminación en los test de (A) memoria de localización de objetos (OLM) (n = 15-18) y (B) memoria de reconocimiento de objetos (ORM) (n = 10-12). Los valores son la media \pm SEM. Para comparar los grupos se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asterisco (* $p < 0.05$) y los valores significativamente diferentes entre los grupos HA+PBS y HA+EVs se indican con a (a = $p < 0.05$, aaaa = $p < 0.0001$). OLM = memoria de localización de objetos; ORM = memoria de reconocimiento de objetos; HA = ratas hiperamonémicas; EVs = vesículas extracelulares de células madre mesenquimales.

En la Figura 63 se muestra la ratio de discriminación en los test de memoria de localización de objetos (OLM o NOL) y de memoria de reconocimiento de objetos (ORM o NOR). Como puede observarse, las ratas hiperamonémicas presentaban un deterioro en ambos tipos de memoria, con ratios de discriminación reducidos respecto a las ratas control tanto en el OLM (0.07 ± 0.04 frente a 0.22 ± 0.04 , $p < 0.05$) (Fig. 63A) como en el ORM (0.42 ± 0.03 frente a 0.56 ± 0.04 , $p < 0.05$) (Fig. 63B). La inyección de MSC-EVs a ratas hiperamonémicas revirtió estos déficits, aumentando las ratios de discriminación en ambos test hasta valores similares a los de las ratas control (0.23 ± 0.03 en el OLM, $p < 0.05$ respecto a las ratas hiperamonémicas inyectadas con PBS; y 0.71 ± 0.03 , $p < 0.0001$ respecto a las ratas hiperamonémicas inyectadas con PBS). Las ratas control inyectadas con MSC-EVs presentaban ratios de discriminación similares a las ratas control inyectadas con PBS (0.26 ± 0.05 respecto a 0.22 ± 0.04 en el OLM y 0.65 ± 0.03 respecto a 0.56 ± 0.04 en el ORM).

Las ratas hiperamonémicas también presentaron déficits en la memoria a corto plazo, evaluada con el laberinto en Y, presentando una ratio de discriminación de 0.47 ± 0.02 frente a 0.72 ± 0.06 en los controles ($p < 0.01$), como se observa en la Figura 64. La inyección de MSC-EVs a las ratas hiperamonémicas restauró la memoria a corto plazo, aumentando la ratio de discriminación hasta valores similares a los de los controles (0.67 ± 0.03 frente a 0.47 ± 0.02 en las ratas hiperamonémicas inyectadas con PBS, $p < 0.05$). La inyección de MSC-EVs a ratas control no afectó este parámetro (0.71 ± 0.06 respecto a 0.72 ± 0.06 en las ratas control inyectadas con PBS).

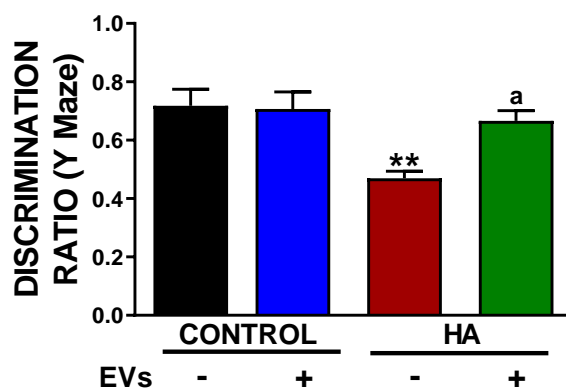


Figura 64. La inyección de EVs de MSCs restaura la memoria a corto plazo en el laberinto en Y en ratas hiperamonémicas. Ratio de discriminación obtenido en el laberinto en Y con un paradigma de memoria a corto plazo. Los valores son la media \pm SEM de 9-11 ratas por grupo. Para comparar los grupos se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asterisco (** $p < 0.01$) y los valores significativamente diferentes entre los grupos HA+PBS y HA+EVs se indican con a ($a = p < 0.05$).

HA = ratas hiperamonémicas; EVs = vesículas extracelulares de células madre mesenquimales.

Por último, se evaluaron el aprendizaje, la memoria de referencia y la memoria de trabajo en el laberinto radial de 8 brazos (Figura 65). El índice de aprendizaje fue significativamente inferior en las ratas hiperamonémicas en comparación con las ratas control en el día 4 del test (7.6 ± 0.7 respecto a 11 ± 0.6 , $p < 0.01$) y se normalizó por la inyección de EVs de células madre mesenquimales (10 ± 0.7 , $p < 0.05$) (Fig. 65A). Las ratas control inyectadas con MSC-EVs presentaban un índice de aprendizaje equiparable al de las ratas control inyectadas con PBS (9.4 ± 0.6).

Las ratas hiperamonémicas presentaban un déficit en la memoria de referencia (número de brazos sin comida en los que entran), con un aumento de los errores de memoria de referencia respecto al grupo control en el día 4 del test (13 ± 0.6 respecto a 10 ± 0.7 , $p < 0.05$) (Fig. 65B y C) y en el número de errores de memoria de referencia totales en los 4 días del test (56 ± 1 respecto a 49 ± 2 , $p < 0.01$) (Fig. 65D). Las ratas hiperamonémicas inyectadas con MSC-EVs presentaban una reducción en el número de

errores respecto a las ratas hiperamonémicas inyectadas con PBS (10 ± 0.7 errores de memoria de referencia en el día 4 respecto a 13 ± 0.6 , $p < 0.05$; y 51 ± 1 errores de memoria de referencia totales respecto a 56 ± 1 , $p < 0.05$). La inyección de MSC-EVs en ratas control no tuvo un efecto significativo sobre estos parámetros (11 ± 0.7 errores de memoria de referencia en el día 4 respecto a 10 ± 0.7 y 50 ± 1 errores de memoria de referencia totales respecto a 49 ± 2 en las ratas control inyectadas con PBS).

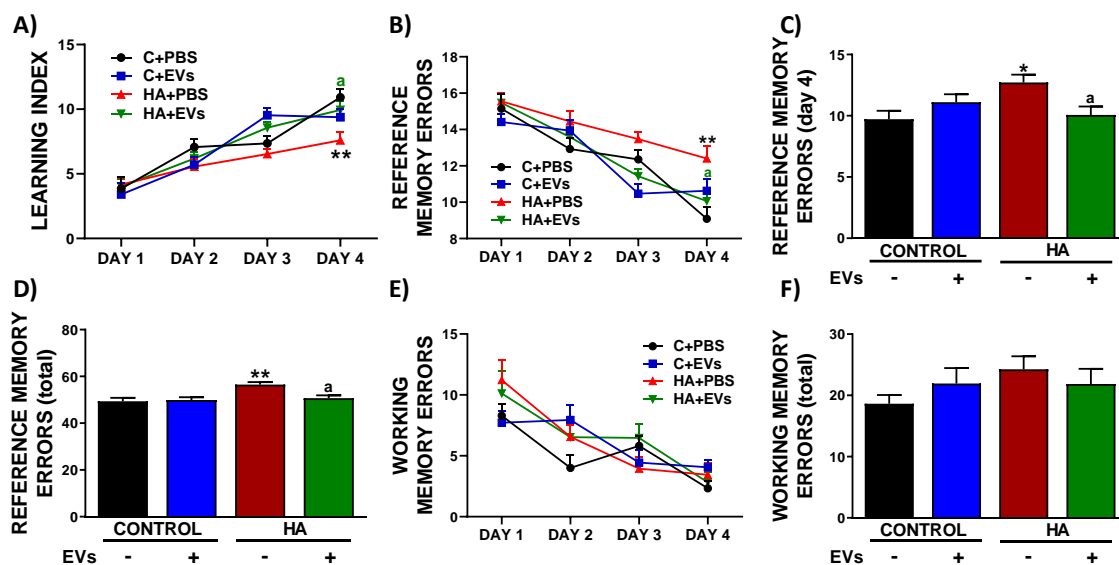


Figura 65. La inyección de EVs de MSCs revierte los déficits de aprendizaje y de memoria de referencia en el laberinto radial en ratas hiperamonémicas. Evolución (A) del índice de aprendizaje y (B) del número de errores de memoria de referencia durante los 4 días de test, (C) número de errores de memoria de referencia en el día 4 del test, (D) número total de errores de memoria de referencia, (E) evolución del número de errores de memoria de trabajo e (F) número total de errores de memoria de trabajo. Los valores son la media \pm SEM de 14-18 ratas por grupo. Para comparar los grupos se realizó un análisis ANOVA de dos vías en los apartados (A), (B) y (E); y un ANOVA de una vía en los apartados (C), (D) y (F), en ambos casos seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) y los valores significativamente diferentes entre los grupos HA+PBS y HA+EVs se indican con a ($a = p < 0.05$).

C+PBS = ratas control inyectadas con PBS; C+EVs = ratas control inyectadas con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales; HA+PBS = ratas hiperamonémicas inyectadas con PBS; HA+EVs = ratas hiperamonémicas inyectadas con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales; HA = ratas hiperamonémicas; EVs = vesículas extracelulares de células madre mesenquimales.

Respecto a los errores de memoria de trabajo (número de veces que la rata entra en un brazo en el que ya había entrado en el mismo ensayo), no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales (Fig. 65E y 65F), aunque se puede observar una tendencia hacia un mayor número de errores de memoria de trabajo totales en las ratas hiperamonémicas (24 ± 2 respecto a 19 ± 1 en las ratas control) y

hacia una cierta reducción en el número de errores en las ratas hiperamonémicas inyectadas con MSC-EVs respecto a las inyectadas con PBS (22 ± 2 respecto a 24 ± 2) (Fig. 65F).

EXPERIMENTOS *EX VIVO*

Para investigar en más detalle los mecanismos por los que las vesículas extracelulares de MSCs son capaces de revertir la neuroinflamación en hipocampo y restaurar algunos aspectos de la función cognitiva, utilizamos un sistema *ex vivo* en el que incubamos cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas con MSC-EVs.

Se ha propuesto que las células madre mesenquimales pueden modular la activación de la microglía mediante la secreción de TGF β y que las vesículas extracelulares de las MSCs contienen TGF β , lo que mediaría algunos de los efectos terapéuticos de estas vesículas (Wada *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2013; Noh *et al.*, 2016; Shelke *et al.*, 2019; Yao *et al.*, 2019). En base a estos estudios, planteamos la hipótesis de que los efectos beneficiosos de las EVs de MSCs sobre la neuroinflamación en ratas hiperamonémicas podrían estar mediados por el TGF β presente en sus membranas. Para evaluar esta posibilidad, investigamos si los efectos de las MSC-EVs se prevenían en el sistema *ex vivo* si se bloqueaba la acción del TGF β incubando previamente las vesículas con anti-TGF β o incubando los cortes de ratas hiperamonémicas con un antagonista del receptor de TGF β junto con las EVs. También se prepararon MSCs en las que se eliminó el TGF β por silenciamiento y se evaluó si las EVs de estas MSCs sin TGF β perdían sus efectos beneficiosos. Por último, se determinó si la adición de TGF β recombinante a los cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas reproducía los efectos beneficiosos de las MSC-EVs.

Para las figuras de este apartado de experimentos *ex vivo*, las abreviaturas de los grupos experimentales corresponden a:

C = cortes de hipocampo de ratas control; HA = cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas; HA+anti-TGFb = cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas incubados con anticuerpo contra el factor de crecimiento transformante beta (TGF β); HA+rec TGFb = cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas incubados con TGF β recombinante; HA+EVs = cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas incubados con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales; HA+EVs+anti-TGFb = cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas incubados con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales previamente tratadas con anticuerpo contra TGF β ; HA+EVs lacking TGFb = cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas incubados con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales en las que se ha silenciado la expresión de TGF β ; HA+EVs+anti-TGFbR = cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas incubados con vesículas extracelulares de células madre mesenquimales y con un antagonista del receptor de tipo 2 de TGF β

4.5 La administración *ex vivo* de EVs de MSCs revierte la activación de microglía y astrocitos en el hipocampo de ratas hiperamonémicas y normaliza el contenido de IL-1 β y TNF α .

De forma similar a lo observado *in vivo*, el área de las células de microglía se encuentra reducida en los cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas frente a los cortes de ratas control ($174 \pm 6 \mu\text{m}^2$ en comparación con $236 \pm 12 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$), indicando que la microglía está activada. La incubación de los cortes de ratas HA con vesículas extracelulares de MSCs revirtió la activación de la microglía ($235 \pm 10 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$), mostrando un área similar a la de las ratas control (Fig. 66A y 66C).

Los cortes de ratas hiperamonémicas también presentaban activación de astrocitos, con un aumento del porcentaje de área teñida con GFAP respecto a los controles ($128 \pm 3 \%$, $p < 0.01$). La incubación de los cortes de ratas HA con MSC-EVs redujo la activación de los astrocitos ($98 \pm 7 \%$, $p < 0.01$), como se observa en la Figura 66B y 66D.

Estos resultados muestran que el sistema *ex vivo* reproduce los efectos sobre la activación de la microglía y los astrocitos observados *in vivo* y que es adecuado para estudiar los mecanismos de acción de las MSC-EVs.

La reversión de la activación de microglía y astrocitos se previene si se bloquea la acción del TGF β , tanto bloqueando el TGF β de la membrana de las vesículas con un anticuerpo anti-TGF β (área de la microglía: $180 \pm 17 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$; activación de astrocitos: $124 \pm 3 \%$, $p < 0.01$), incubando los cortes con EVs que carecen de TGF β (área de la microglía: $170 \pm 9 \mu\text{m}^2$, $p < 0.001$; activación de astrocitos: $136 \pm 6 \%$, $p < 0.0001$) o incubando los cortes con las EVs y un antagonista del receptor de TGF β (área de la microglía: $151 \pm 4 \mu\text{m}^2$, $p < 0.0001$; activación de astrocitos: $135 \pm 4 \%$, $p < 0.001$). En cambio, los efectos beneficiosos se reproducen si se incuban los cortes de hipocampo de ratas HA con TGF β recombinante (área de la microglía: $213 \pm 10 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$; activación de astrocitos: $103 \pm 3 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 66).

Los cortes de ratas HA incubados con anti-TGF β presentan niveles de activación de microglía y astrocitos similares a los de los cortes de ratas HA basales (área de la microglía: $180 \pm 2 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$ respecto al grupo control; área teñida por GFAP: $121 \pm 4 \%$, $p < 0.05$ respecto al grupo control), indicando que la adición de anti-TGF β a los cortes no tiene un efecto sobre estos parámetros y no es responsable de la mejoría observada en los cortes incubados con vesículas de MSCs previamente tratadas con anti-TGF β .

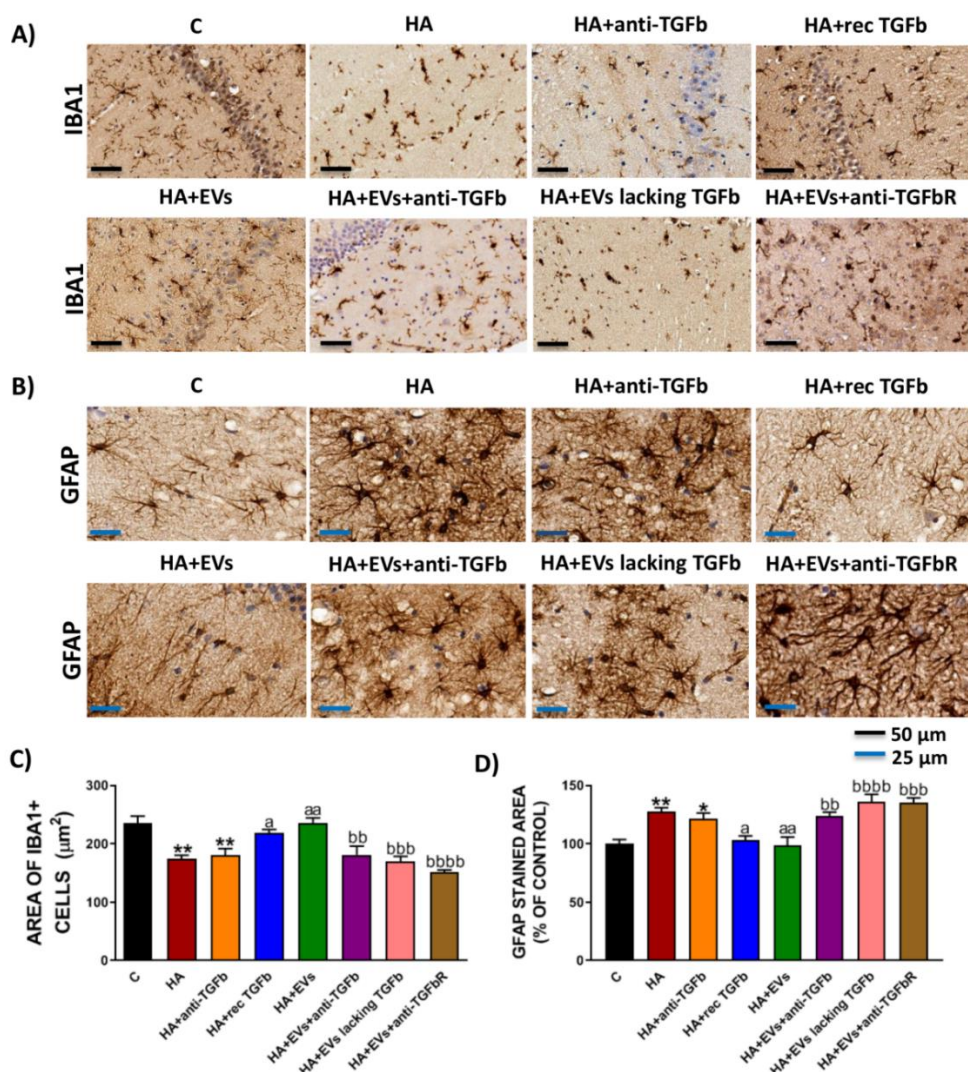


Figura 66. La incubación con EVs de MSCs revierte la activación de microglía y astrocitos en cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas. Se muestran imágenes representativas de la inmunohistoquímica contra (A) Iba1 y (B) GFAP en hipocampo. (C) Área de la microglía (células marcadas con Iba1, n = 5-8). (D) Porcentaje de área teñida con GFAP respecto al grupo control (n = 6-9). Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores son la media ± SEM. Los valores significativamente diferentes respecto al grupo control se indican con asterisco (*p < 0.05, **p < 0.01), los valores significativamente diferentes del grupo HA se indican con a (a = p < 0.05, aa = p < 0.01) y los valores significativamente diferentes del grupo HA+EVs se indican con b (bb = p < 0.01, bbb = p < 0.001, bbbb = p < 0.0001). Barras de escala = 50 y 25 µm, según se indica en la figura.

En cuanto al contenido de IL-1β y TNFα, este se encontraba aumentado en las neuronas granulares de la región CA1 de los cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas en comparación con los cortes control (158 ± 11 %, p < 0.01 y 125 ± 2 %, p < 0.01, respectivamente) como podemos observar en la Figura 67. La incubación de los cortes de ratas HA con MSC-EVs redujo tanto el contenido de IL-1β (107 ± 8 %, p < 0.05) como el de TNFα (95 ± 5 %, p < 0.05) hasta niveles similares a los del grupo control.

El efecto de las MSC-EVs sobre la IL-1 β y el TNF α se previene si se bloquea el TGF β de membrana con un anti-TGF β (161 ± 13 %, $p < 0.01$; y 123 ± 5 %, $p < 0.001$, respectivamente), mientras que los cortes de ratas hiperamonémicas incubados con anti-TGF β presentan un contenido similar de IL-1 β y TNF α al de los cortes HA basales (152 ± 11 %, $p < 0.05$ frente al control y 122 ± 2 %, $p < 0.05$ frente al control, respectivamente) (Fig. 67).

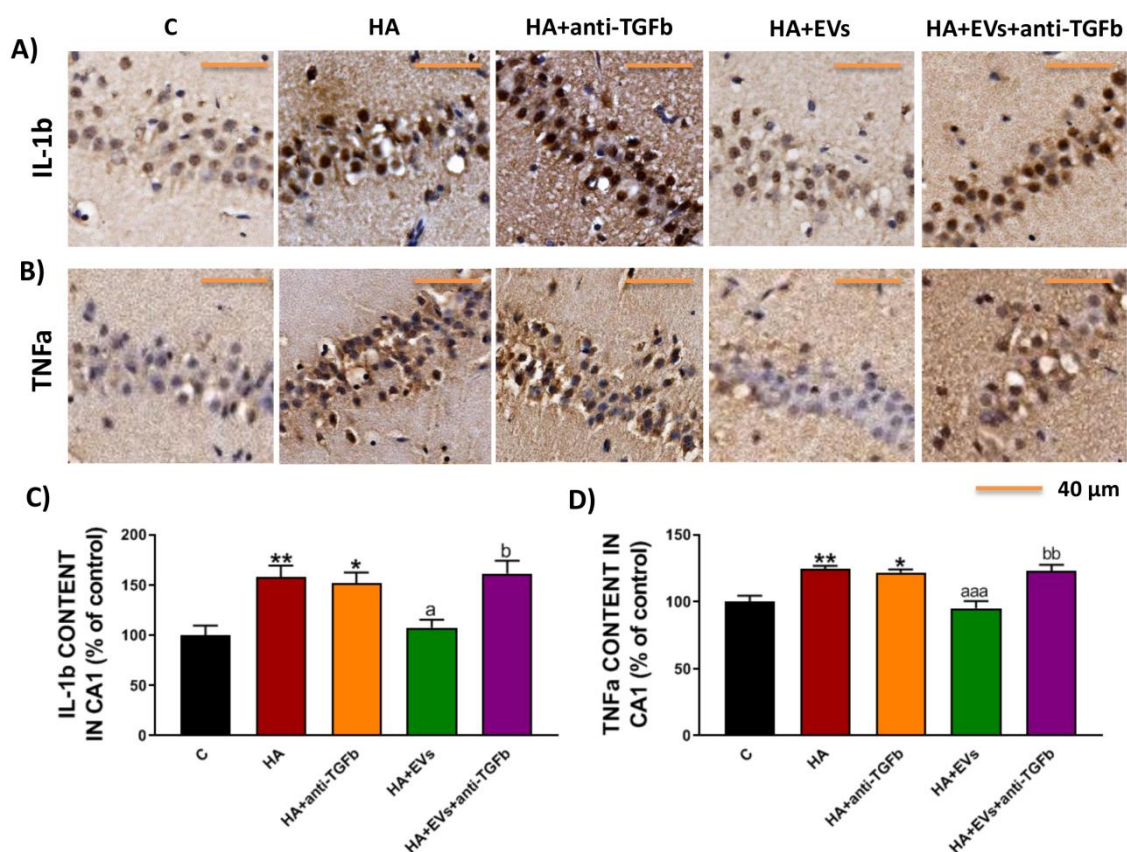


Figura 67. La incubación con EVs de MSCs reduce el contenido de los marcadores pro-inflamatorios IL-1 β y TNF α en cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas. Se muestran imágenes representativas de la inmunohistoquímica contra (A) IL-1 β y (B) TNF α en la región CA1 del hipocampo. Contenido de (C) IL-1 β ($n = 4-5$) y de (D) TNF α ($n = 4-5$) en CA1 expresado como porcentaje respecto al grupo control. Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores son la media \pm SEM. Los valores significativamente diferentes respecto al grupo control se indican con asterisco ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$), los valores significativamente diferentes del grupo HA se indican con a ($a = p < 0.05$, $aaa = p < 0.001$) y los valores significativamente diferentes del grupo HA+EVs se indican con b ($b = p < 0.05$, $bb = p < 0.01$). Barras de escala = 40 μ m, según se indica en la figura.

4.6 La administración *ex vivo* de EVs de MSCs induce un cambio en la polarización de la microglía en el hipocampo de ratas hiperamonémicas de un estado pro-inflamatorio a un estado anti-inflamatorio.

Los cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas presentan un mayor contenido de IL-6 ($132 \pm 5 \%$, $p < 0.0001$) (Fig. 68A), IL-1 β ($145 \pm 6 \%$, $p < 0.0001$) (Fig. 68B) y TNF α ($129 \pm 5 \%$, $p < 0.001$) (Fig. 68C). La incubación de los cortes con MSC-EVs normalizó los niveles de estas citocinas pro-inflamatorias: IL-6 ($97 \pm 3 \%$, $p < 0.0001$), IL-1 β ($100 \pm 5 \%$, $p < 0.001$) y TNF α ($100 \pm 4 \%$, $p < 0.01$).

Las citocinas y marcadores anti-inflamatorios se encuentran disminuidos en los cortes de hipocampo de ratas HA: IL-4 ($75 \pm 4 \%$, $p < 0.001$) (Fig. 68D), IL-10 ($67 \pm 4 \%$, $p < 0.0001$) (Fig. 68E) y arginasa 1 ($66 \pm 6 \%$, $p < 0.0001$) (Fig. 68F). La incubación de los cortes con MSC-EVs aumentó los niveles de estos factores hasta un nivel comparable al de los controles: IL-4 ($100 \pm 2 \%$, $p < 0.0001$), IL-10 ($101 \pm 2 \%$, $p < 0.0001$) y arginasa 1 ($100 \pm 6 \%$, $p < 0.01$). La adición de TGF β recombinante también fue capaz de inducir la polarización de la microglía hacia un estado anti-inflamatorio, reduciendo los niveles de IL-6 ($115 \pm 2 \%$, $p < 0.05$), IL-1 β ($103 \pm 5 \%$, $p < 0.001$) y TNF α ($100 \pm 10 \%$, $p < 0.05$) y aumentando los niveles de IL-4 ($99 \pm 2 \%$, $p < 0.05$), IL-10 ($81 \pm 5 \%$, $p < 0.01$) y arginasa 1 ($96 \pm 2 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 68A-E).

Los efectos de las MSC-EVs sobre la polarización de la microglía se prevenían al bloquear el TGF β . La co-incubación de las MSC-EVs con anti-TGF β previno la reducción de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 ($116 \pm 5 \%$, $p < 0.01$) (Fig. 68A), IL-1 β ($130 \pm 7 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 68B) y TNF α ($134 \pm 9 \%$, $p < 0.01$) (Fig. 68C), así como el aumento de las citocinas anti-inflamatorias IL-4 ($85 \pm 5 \%$, $p < 0.001$) (Fig. 68D) e IL-10 ($84 \pm 3 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 68E) y Arginasa1 ($70 \pm 7 \%$, $p < 0.001$) (Fig. 68F). La depleción de TGF β en las MSCs de origen también previno los efectos de las MSC-EVs sobre estos factores pro-inflamatorios (IL-6: $112 \pm 3 \%$, $p < 0.05$; IL-1 β : $127 \pm 5 \%$, $p < 0.05$; TNF α : $127 \pm 7 \%$, $p < 0.05$) y anti-inflamatorios (IL-4: $74 \pm 6 \%$, $p < 0.001$; IL-10: $87 \pm 1 \%$, $p < 0.05$; arginasa 1: $70 \pm 3 \%$, $p < 0.01$). Se observan efectos similares al co-incubar los cortes con EVs y un antagonista del receptor de TGF β : se previenen los cambios inducidos por las EVs en IL-6 ($114 \pm 2 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 68A), IL-1 β ($145 \pm 14 \%$, $p < 0.001$) (Fig. 68B), TNF α ($129 \pm 4 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 68C), IL-4 ($75 \pm 7 \%$, $p < 0.001$) (Fig. 68D), IL-10 ($84 \pm 2 \%$, $p < 0.01$) (Fig. 68E) y arginasa1 ($79 \pm 2 \%$, $p < 0.05$) (Fig. 68F).

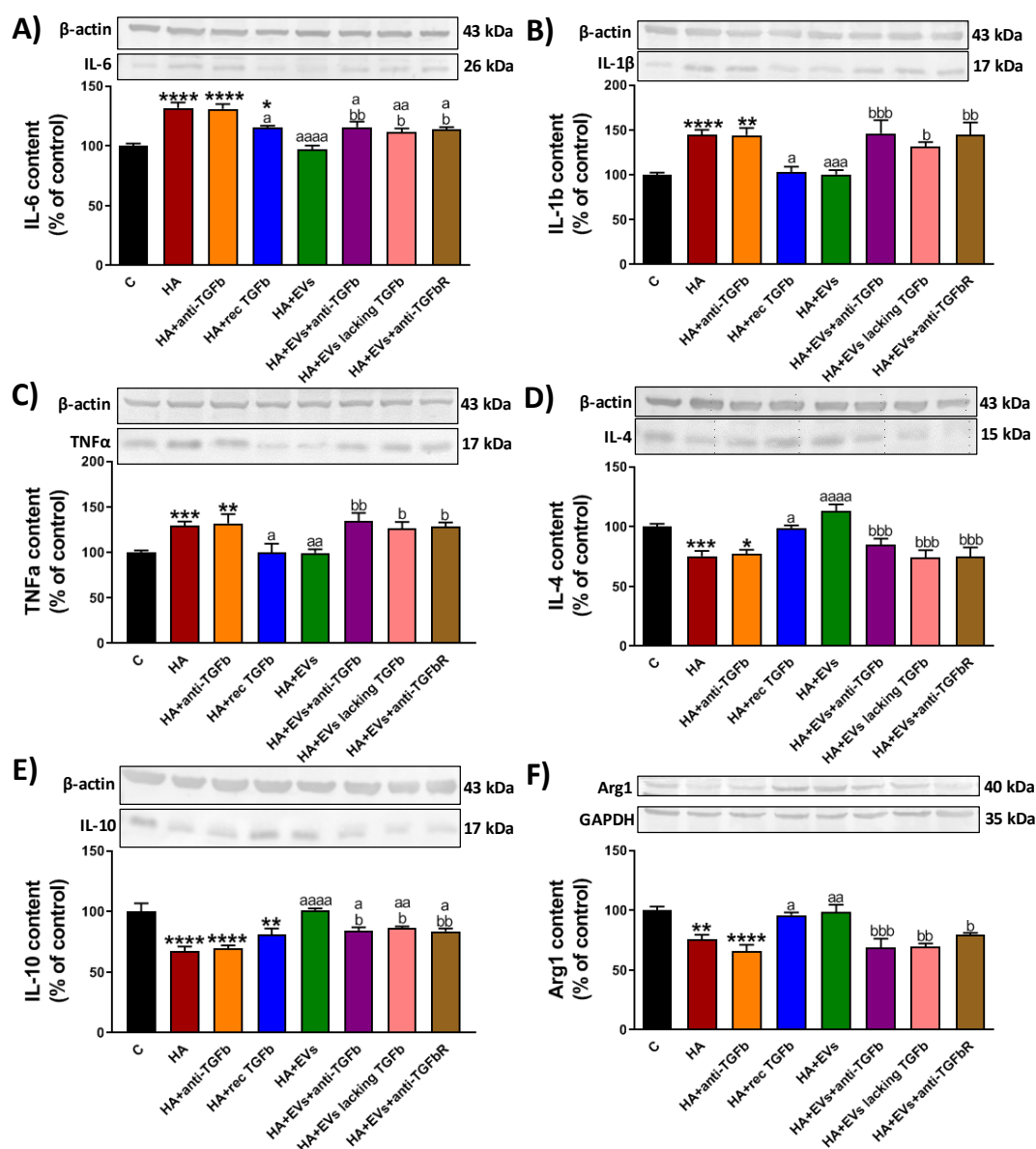


Figura 68. La incubación con EVs de MSCs reduce el contenido de marcadores pro-inflamatorios y restaura el contenido de marcadores anti-inflamatorios en cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas. Contenido de (A) IL-6 (n = 9-13), (B) IL-1β (n = 8-24), (C) TNFα (n = 8-22), (D) IL-4 (n = 8-21), (E) IL-10 (n = 8-13) y (F) arginasa1 (n = 9-17) medido por Western blot en homogenados de cortes de hipocampo. Se incluyen imágenes representativas de los blots de cada proteína y de su control de carga (β-actina o GAPDH). Los valores son la media ± SEM y se expresan como porcentaje del contenido de proteína respecto al grupo control. Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes respecto al grupo control se indican con asterisco (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001), los valores significativamente diferentes del grupo HA se indican con a (a = p < 0.05, aa = p < 0.01, aaa = p < 0.001, aaaa = p < 0.0001) y los valores significativamente diferentes del grupo HA+EVs se indican con b (b = p < 0.05, bb = p < 0.01, bbb = p < 0.001, bbbb = p < 0.0001).

4.7 La administración *ex vivo* de EVs de MSCs normaliza la expresión en membrana de subunidades de receptores AMPA y NMDA en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

Hernandez-Rabaza *et al.* (2016a), Taoro Gonzalez *et al.* (2018 y 2019a) y Balzano *et al.* (2020b) han demostrado que, en ratas hiperamonémicas, la neuroinflamación induce alteraciones en la expresión en membrana de la subunidad NR2B de los receptores NMDA y de las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA en el hipocampo, lo cual es responsable de la alteración en el aprendizaje espacial en estas ratas hiperamonémicas, y que los tratamientos que normalizan la expresión en membrana de estos receptores restauran la función cognitiva.

Por ello, evaluamos si la adición de EVs de MSCs a cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas normalizaba la expresión en membrana de dichas subunidades. En la Figura 69 se observa que la hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de la subunidad NR2B ($151 \pm 8 \%$, $p < 0.0001$) y de la subunidad GluA2 ($150 \pm 10 \%$, $p < 0.001$) y reduce la expresión en membrana de la subunidad GluA1 ($67 \pm 5 \%$, $p < 0.0001$) en cortes de hipocampo. El tratamiento de los cortes con MSC-EVs normalizó la expresión en membrana de las subunidades NR2B ($96 \pm 5 \%$, $p < 0.0001$), GluA1 ($100 \pm 4 \%$, $p < 0.0001$) y GluA2 ($96 \pm 7 \%$, $p < 0.001$) (Fig. 69). La normalización de la expresión en membrana no se produjo si las vesículas se incubaban previamente con anti-TGF β ($136 \pm 15 \%$, $p < 0.01$; $138 \pm 8 \%$, $p < 0.05$; y $71 \pm 6 \%$, $p < 0.01$, respectivamente), si se añadían EVs que carecían de TGF β ($140 \pm 8 \%$, $p < 0.05$; $136 \pm 4 \%$, $p < 0.05$; y $70 \pm 9 \%$, $p < 0.05$, respectivamente) o si se co-incubaban los cortes con las EVs y un antagonista del receptor de TGF β (NR2B: $134 \pm 5 \%$, $p < 0.05$; GluA2: $146 \pm 4 \%$, $p < 0.05$; y GluA1: $60 \pm 9 \%$, $p < 0.01$) (Fig. 69). En cambio, la adición de TGF β recombinante reprodujo los efectos inducidos por las MSC-EVs (NR2B: $104 \pm 7 \%$, $p < 0.01$; GluA1: $108 \pm 6 \%$, $p < 0.0001$; y GluA2: $97 \pm 5 \%$, $p < 0.01$) (Fig. 69).

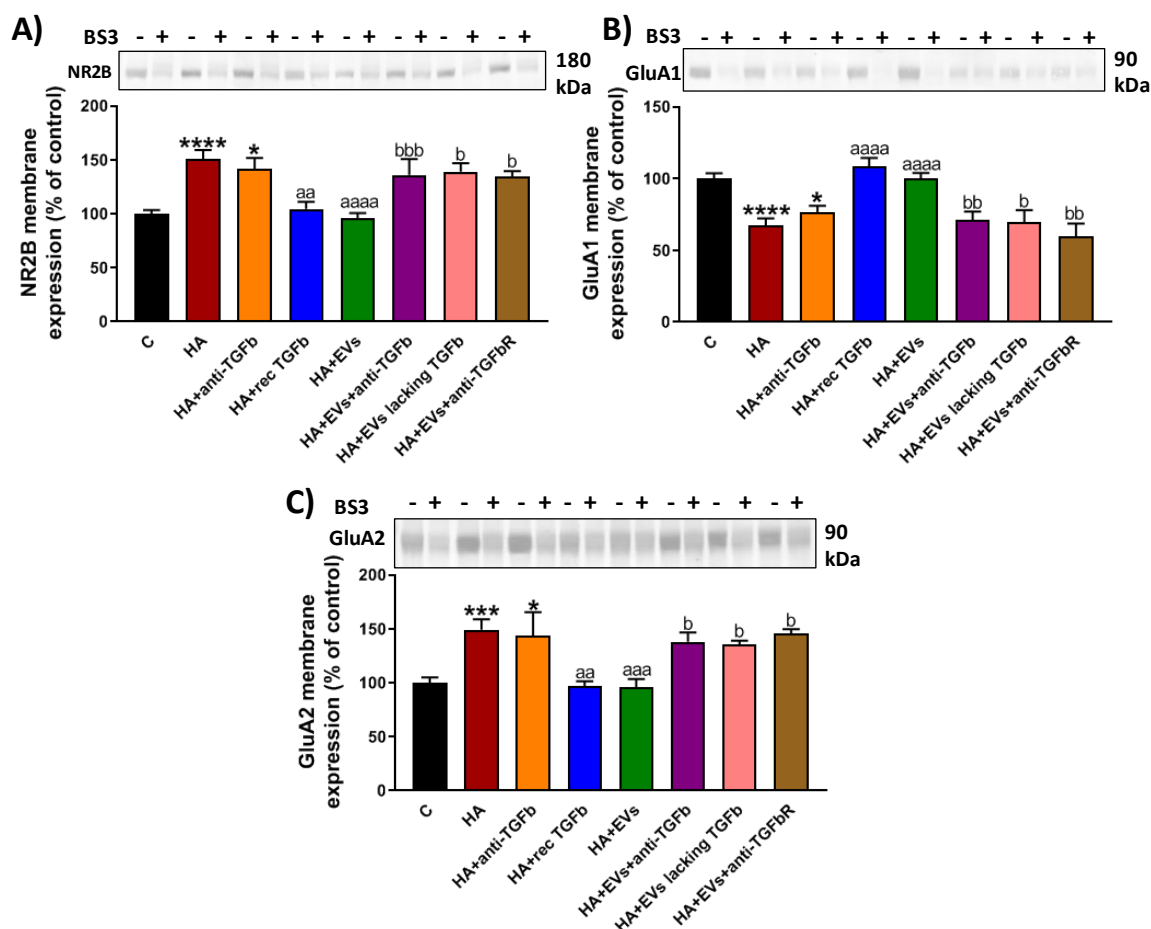


Figura 69. La incubación con EVs de MSCs normaliza la expresión en membrana de la subunidad NR2B de los receptores NMDA y las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA en cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas. Expresión en membrana de (A) NR2B (n = 9-23), (B) GluA1 (n = 8-24) y (C) GluA2 (n = 8-18) en homogenados de cortes de hipocampo incubados en presencia (+) o ausencia (-) del *cross-linker* BS3, medida por Western blot. La expresión en membrana se calculó restando la intensidad de la banda de la muestra incubada con BS3 (fracción citosólica de la proteína) a la intensidad de la banda de la muestra incubada en ausencia de BS3 (contenido total de la proteína). Se incluyen imágenes representativas de los blots de cada proteína. Los valores son la media \pm SEM y se expresan como porcentaje de la expresión en membrana de la proteína respecto al grupo control. Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes respecto al grupo control se indican con asterisco (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$), los valores significativamente diferentes del grupo HA se indican con a (aa = $p < 0.01$, aaa = $p < 0.001$, aaaa = $p < 0.0001$) y los valores significativamente diferentes del grupo HA+EVs se indican con b (b = $p < 0.05$, bb = $p < 0.01$, bbb = $p < 0.001$).

4.8 La administración *ex vivo* de EVs de MSCs reduce la activación de NF- κ B en cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas a través de la vía TGF β -TGF β R2-Smad7-I κ B α .

Dadsetan *et al.* (2016b) mostraron que el aumento de IL-1 β y TNF α en el hipocampo en ratas derivación porto-sistémica (otro modelo de encefalopatía hepática) era consecuencia de la translocación al núcleo y de la activación del factor de transcripción NF- κ B. Por ello, estudiamos si este factor estaba activado en cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas y si las MSC-EVs revertían esta activación.

Se observa que el contenido en núcleo de la subunidad p50 de NF- κ B está aumentado en neuronas granulares de la capa CA1 del hipocampo en ratas hiperamonémicas (126 ± 6 %, $p < 0.01$) (Fig. 70A y C) y que el número de células de microglía que expresan NF- κ B también está aumentado (31 ± 2 células/mm² frente a 15 ± 2 células/mm² en los cortes control, $p < 0.0001$) (Fig. 70B y D). Esta activación de NF- κ B se redujo en los cortes de ratas hiperamonémicas tratadas con MSC-EVs (ratio núcleo/citoplasma de p50: 93 ± 4 %, $p < 0.001$; y microglía expresando p50: 14 ± 1 células/mm², $p < 0.0001$). La normalización de la activación de NF- κ B no se produjo si las EVs de MSCs se incubaban previamente con anti-TGF β (ratio núcleo/citoplasma de p50: 122 ± 4 %, $p < 0.01$; y microglía expresando p50: 25 ± 1 células/mm², $p < 0.01$), si las EVs carecían de TGF β (ratio núcleo/citoplasma de p50: 123 ± 3 %, $p < 0.01$; y microglía expresando p50: 27 ± 1 células/mm², $p < 0.001$) o si se añadía un antagonista del receptor de TGF β (ratio núcleo/citoplasma de p50: 125 ± 2 %, $p < 0.01$; y microglía expresando p50: 26 ± 3 células/mm², $p < 0.001$) (Fig. 70). La incubación de los cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas con anti-TGF β no previno el aumento de la translocación al núcleo de p50 (133 ± 8 %, $p < 0.001$ en comparación con los cortes control) ni en el número de células de microglía que expresaban p50 (29 ± 2 células/mm², $p < 0.0001$ frente a los cortes control). Además, la incubación de los cortes de ratas hiperamonémicas con TGF β recombinante reprodujo los efectos de las EVs (ratio núcleo/citoplasma de p50: 104 ± 5 %, $p < 0.05$; y microglía expresando p50: 19 ± 1 células/mm², $p < 0.001$), indicando que el TGF β de las EVs median este efecto (Fig. 70).

A continuación, investigamos el mecanismo mediante el que el TGF β reducía la señalización de NF- κ B. En primer lugar, analizamos si la vía Smad2/3 estaba alterada, ya que Noh *et al.* (2016) mostraron que el TGF β de las MSCs inhibía NF- κ B en microglía estimulada con LPS modulando la fosforilación de Smad2/3. Sin embargo, no encontramos cambios en la fosforilación de Smad2/3 en los cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas respecto a los controles. Además, el tratamiento con las EVs de MSCs tampoco afectó a la fosforilación de Smad2/3 (datos no mostrados), indicando que la vía TGF β -Smad2/3 no está implicada en los efectos beneficiosos de las MSCs en nuestro modelo.

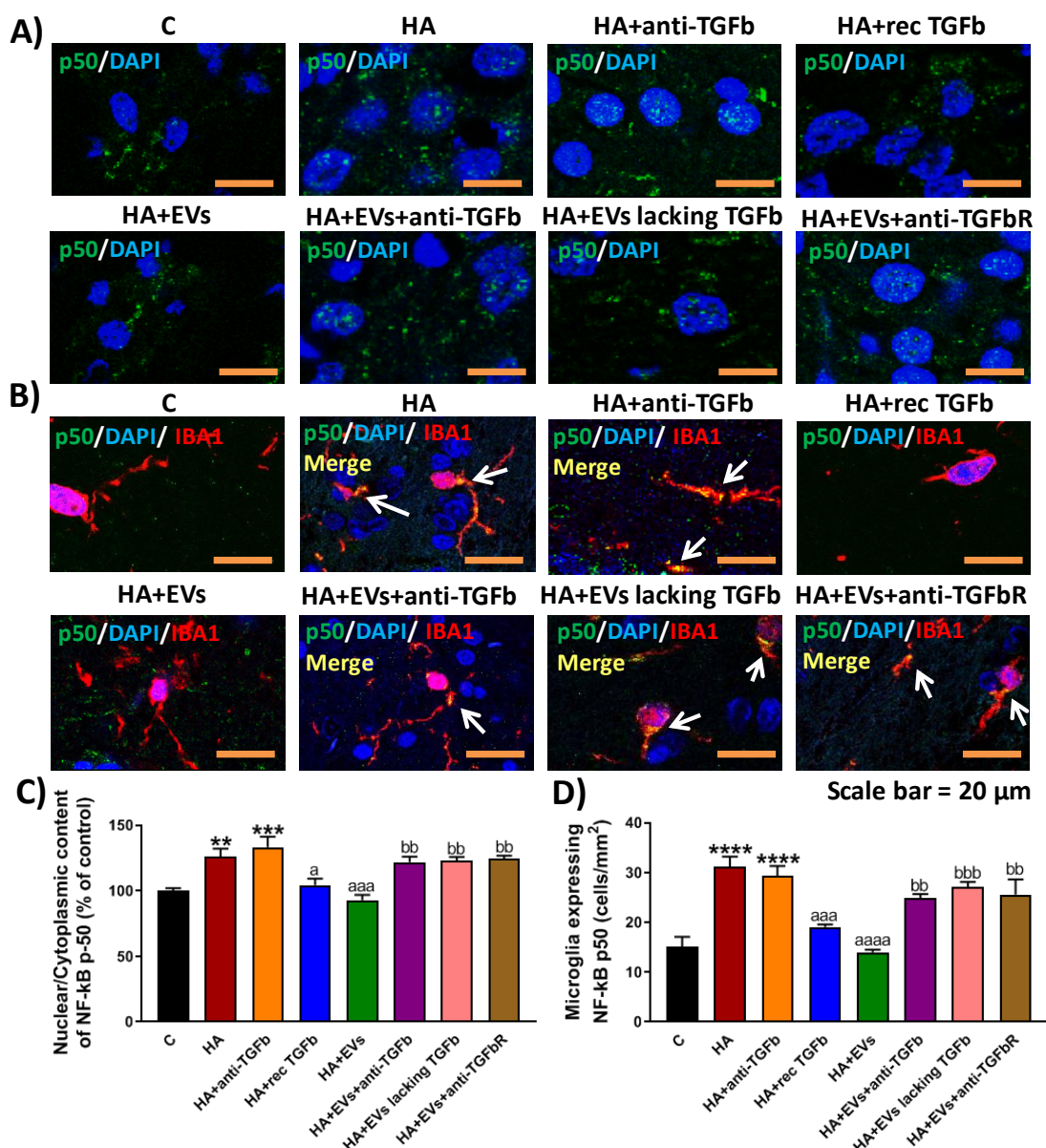


Figura 70. La incubación con EVs de MSCs reduce la activación de NF-κB en cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas. Imágenes representativas de inmunofluorescencia (A) contra la subunidad p50 de NF-κB (verde) y (B) contra la subunidad p50 de NF-κB (verde) e IBA1 (en rojo, marcador de microglía). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 20 μm. (C) Ratio Núcleo/Citoplasma de la subunidad p50 de NF-κB en las neuronas de la región CA1 del hipocampo, medida por inmunofluorescencia y expresada como porcentaje respecto al control (n = 5-6). (D) Número de células de microglía que expresan la subunidad p50 de NF-κB, medido por inmunofluorescencia doble y expresado como células/mm² (n = 4-6). Los valores son la media ± SEM. Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes respecto al grupo control se indican con asterisco (**p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001), los valores significativamente diferentes del grupo HA se indican con a (a = p < 0.05, aaa = p < 0.001, aaaa = p < 0.0001) y los valores significativamente diferentes del grupo HA+EVs se indican con b (bb = p < 0.01, bbb = p < 0.001).

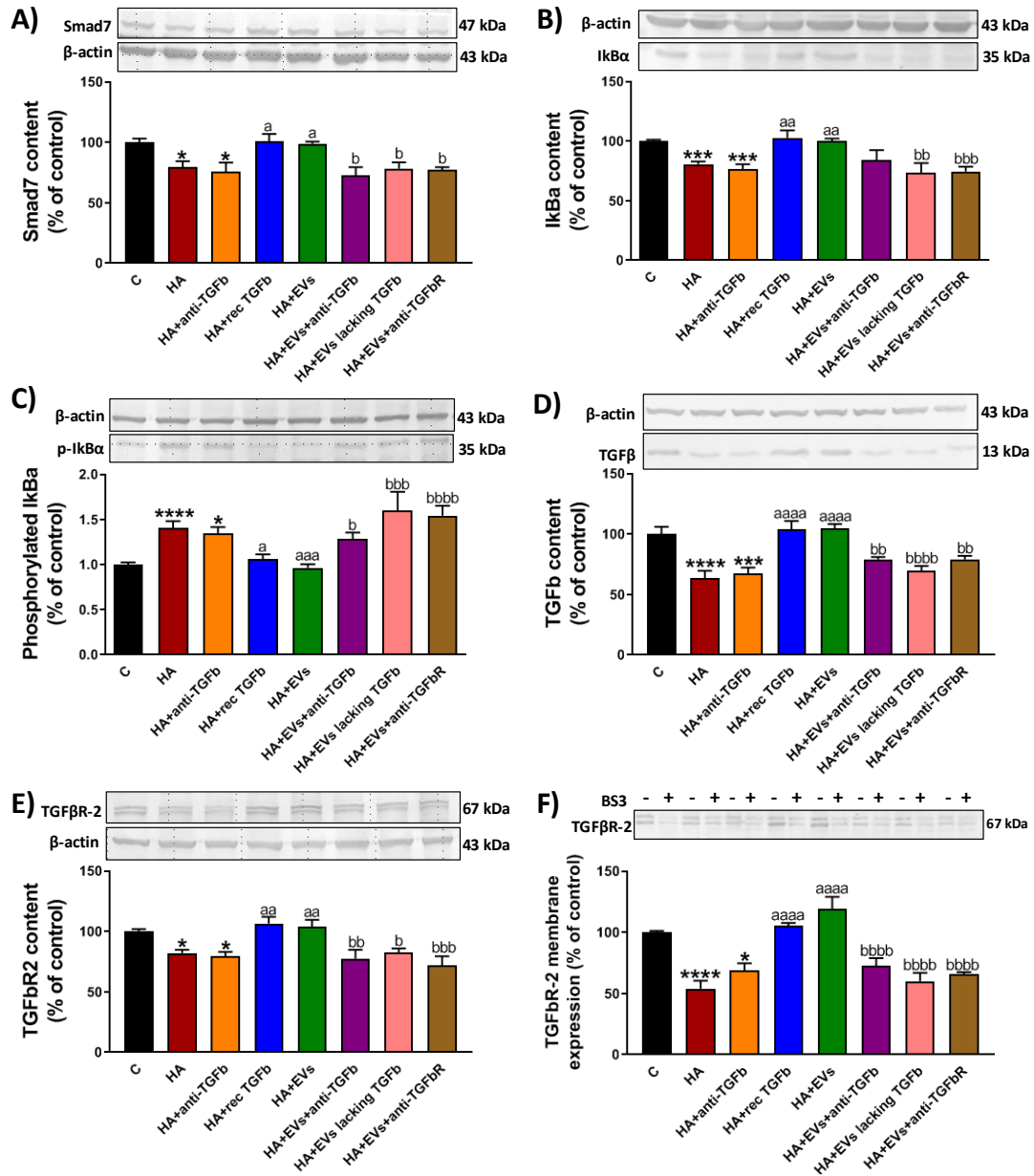


Figura 71. La incubación con EVs de MSCs reduce la activación de NF- κ B en cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas a través de la vía TGF β - TGF β R2-Smad7-I κ B α . Contenido de (A) Smad7 (n = 8-15), (B) I κ B α (n = 8-18), (C) I κ B α fosforilado (n = 8-19), (D) TGF β (n = 8-10) y (E) TGF β R2 (n = 8-22) en homogenados de cortes de hipocampo, medido por Western blot. Se muestran imágenes representativas de los blots de cada proteína y de su control de carga (β -actina). (F) Expresión en membrana de TGF β R2 (n = 8-10) en homogenados de cortes de hipocampo incubados en presencia (+) o ausencia (-) del *cross-linker* BS3, medida por Western. Los valores se expresan como porcentaje respecto al grupo control y son la media \pm SEM. Para comparar los grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un test post-hoc de Tukey. Los valores significativamente diferentes respecto al grupo control se indican con asterisco (* p < 0.05, *** p < 0.001, **** p < 0.0001), los significativamente diferentes del grupo HA se indican con a (a = p < 0.05, aa = p < 0.01, aaa = p < 0.001, aaaa = p < 0.0001) y los significativamente diferentes del grupo HA+EVs se indican con b (b = p < 0.05, bbb = p < 0.001, bbbb = p < 0.0001).

También se ha observado que el TGF β puede inhibir la señalización mediada por NF- κ B induciendo Smad7, el cual aumenta el contenido de I κ B α , un inhibidor clave de la vía de señalización por NF- κ B (Yan et al., 2009). Por lo tanto, se evaluó si la vía Smad7-I κ B α podría estar mediando los efectos del TGF β de las EVs sobre la señalización por NF- κ B en los cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas. Los resultados muestran que la hiperamonemia reduce el contenido de Smad7 (79 ± 5 %, $p < 0.05$) (Fig. 71A), y de I κ B α en el hipocampo (81 ± 2 %, $p < 0.001$) (Fig. 71B). Además, la hiperamonemia aumenta la fosforilación de I κ B α (140 ± 8 %, $p < 0.0001$) (Fig. 71C), asociada con una mayor traslocación al núcleo del factor NF- κ B.

El tratamiento de los cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas con EVs de MSCs normalizó los niveles de Smad7 (99 ± 2 %, $p < 0.05$) (Fig. 71A) y de I κ B α (100 ± 7 %, $p < 0.01$) (Fig. 71B), así como la fosforilación de I κ B α (100 ± 4 %, $p < 0.001$) (Fig. 71C). Estos parámetros no se normalizaron si las EVs se incubaban con anti-TGF β (Smad7: 73 ± 7 %, $p < 0.01$; I κ B α : 84 ± 9 %, $p = 0.1$; y fosfo-I κ B α : 130 ± 7 %, $p < 0.05$), si se añadían EVs sin TGF β (Smad7: 78 ± 5 %, $p < 0.05$; I κ B α : 73 ± 8 %, $p < 0.01$; y fosfo-I κ B α : 160 ± 20 %, $p < 0.001$) o si se añadía un antagonista del receptor de TGF β (Smad7: 77 ± 3 %, $p < 0.05$; I κ B α : 75 ± 4 %, $p < 0.001$; y fosfo-I κ B α : 150 ± 10 %, $p < 0.0001$), mientras que la adición de anti-TGF β no tuvo un efecto significativo sobre ellos (Smad7: 73 ± 7 %, $p < 0.01$; I κ B α : 84 ± 9 %, $p = 0.1$; y fosfo-I κ B α : 130 ± 7 %, $p < 0.05$). Los niveles de Smad7 y de I κ B α , y la fosforilación de I κ B α también se normalizaron si los cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas se incubaban con TGF β recombinante (Smad7: 76 ± 7 %, $p < 0.05$; I κ B α : 76 ± 4 %, $p < 0.001$; y fosfo-I κ B α : 130 ± 7 %, $p < 0.0001$) (Fig. 71A-C).

Estos datos apoyan la hipótesis de que el TGF β localizado en la superficie de las EVs de las MSCs revierte la señalización por NF- κ B en el hipocampo de ratas hiperamonémicas normalizando los niveles de Smad7 e I κ B α .

A continuación, investigamos si la reducción en los niveles de Smad7 y de I κ B α en el hipocampo de ratas hiperamonémicas podría deberse a un menor contenido de TGF β , o a un menor contenido o expresión en membrana de sus receptores. Se observó que el contenido de TGF β era menor en los cortes de hipocampo de las ratas hiperamonémicas (64 ± 6 %, $p < 0.0001$) (Fig. 71D) y que se restauró a niveles similares a los de las ratas control al ser tratados con EVs de MSCs (105 ± 4 %, $p < 0.0001$) o con TGF β recombinante (104 ± 7 %, $p < 0.0001$) (Fig. 71D), pero no si las EVs se incubaban con anti-TGF β antes de añadirse a los cortes de hipocampo (79 ± 2 %, $p < 0.01$) (Fig. 71D), si las EVs añadidas carecían de TGF β (69 ± 4 %, $p < 0.0001$) o si se añadía un antagonista del receptor de TGF β (79 ± 3 %, $p < 0.01$) (Fig. 71D).

La hiperamonemia también redujo el contenido total (82 ± 3 %, $p < 0.05$) (Fig. 71E) y la expresión en membrana (54 ± 6 %, $p < 0.0001$) (Fig. 71F) del receptor 2 de TGF β , parámetros que también se normalizaron tras la incubación con EVs de MSCs (104 ± 6 %, $p < 0.01$; y 119 ± 10 %, $p < 0.0001$, respectivamente) o con TGF β recombinante (107 ± 6 %, $p < 0.01$; y 105 ± 2 %, $p < 0.0001$, respectivamente), pero no si las EVs se

habían incubado con anti-TGF β (78 ± 7 %, $p < 0.01$; y 73 ± 6 %, $p < 0.0001$, respectivamente), si las EVs carecían de TGF β (83 ± 3 %, $p < 0.05$; y 60 ± 7 %, $p < 0.0001$, respectivamente) o si los cortes se co-incubaban con las EVs y un antagonista del receptor de TGF β (83 ± 3 %, $p < 0.001$; y 66 ± 2 %, $p < 0.0001$, respectivamente) (Fig. 71D-F).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que las EVs de MSCs son capaces de reducir la neuroinflamación en hipocampo y de restaurar la función cognitiva en ratas con hiperamonemia crónica, modelo animal de encefalopatía hepática mínima. Al igual que los resultados mostrados en el Capítulo 3, estos datos respaldan la hipótesis de que las EVs de MSCs podrían mejorar la función cognitiva en pacientes con cirrosis y encefalopatía hepática mínima (EHM) o encefalopatía hepática clínica.

Los mecanismos implicados en estos efectos beneficiosos de las MSC-EVs se resumen en la Figura 72. Las alteraciones en las funciones cognitivas moduladas por el hipocampo en las ratas hiperamonémicas son consecuencia de los cambios en la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA, que a su vez se deben al aumento de la expresión en membrana de la subunidad NR2B de los receptores NMDA (Hernandez-Rabaza *et al.*, 2015 y 2016a; Taoro-Gonzalez *et al.*, 2018 y 2019a; Balzano *et al.*, 2020; Cabrera-Pastor *et al.*, 2019a). En este estudio demostramos que las EVs de MSCs restauran el aprendizaje y la memoria de las ratas hiperamonémicas en diferentes tareas moduladas por el hipocampo (test de memoria de localización y de reconocimiento de objetos, memoria a corto plazo medida en el laberinto en Y y aprendizaje y memoria de referencia evaluadas mediante el laberinto radial). La mejora en aprendizaje y memoria se asociaba con la normalización de la expresión en membrana de la subunidad NR2B de los receptores NMDA y de las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA.

Estas alteraciones en la expresión en membrana de GluA1, GluA2 y NR2B en hipocampo de ratas hiperamonémicas son consecuencia de un aumento de la activación del receptor de IL-1, debido al aumento de los niveles de IL-1 β (Taoro-Gonzalez *et al.*, 2018). Nuestros datos indican que las EVs de MSCs normalizan la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA mediante la normalización de los niveles de IL-1 β .

El aumento de IL-1 β en hipocampo de ratas hiperamonémicas tiene un origen dual. La IL-1 β se sintetiza tanto en la microglía activada como en las neuronas. Las EVs de MSCs reducen la producción de IL-1 β en neuronas del hipocampo y también la activación de microglía, con lo que se estaría reduciendo la IL-1 β proveniente de la microglía.

Observamos que las MSC-EVs reducen la activación de la microglía e inducen un cambio en el fenotipo de la microglía desde un fenotipo pro-inflamatorio (caracterizado por niveles elevados de IL-1 β e IL-6 y niveles bajos de IL-4 y arginasa 1) hacia un fenotipo anti-inflamatorio, en el que se normalizan los niveles de estos marcadores. Este cambio en la polarización de la microglía se asocia con una reducción de la activación de NF- κ B, que a su vez reduce la transcripción de proteínas pro-inflamatorias. Este efecto es similar al cambio de fenotipo descrito por Noh *et al.*, (2016), quienes observaron que las MSCs modulan las propiedades funcionales de la microglía mediante la secreción de TGF β , promoviendo el cambio desde un fenotipo de activación clásica hacia un fenotipo anti-inflamatorio.

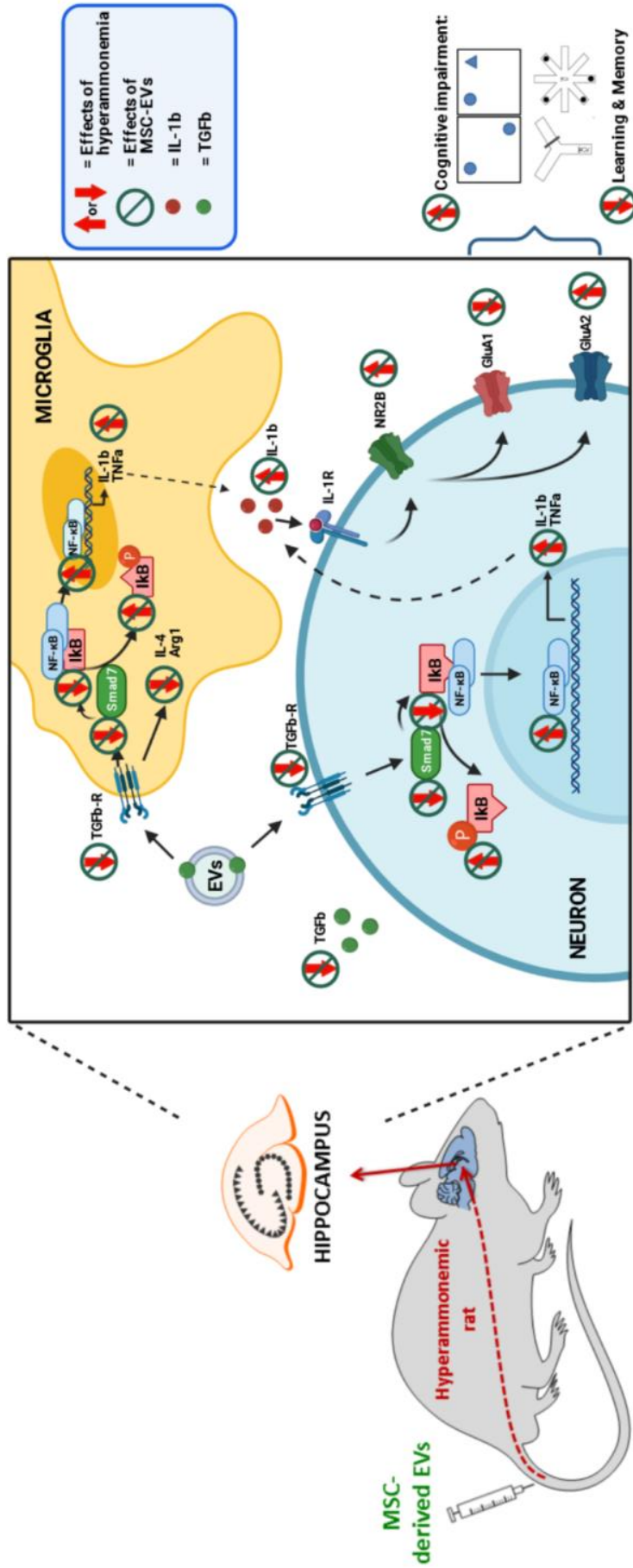


Figura 72. Resumen de los efectos principales de las MSC-EVs en hipocampo de ratas hiperamonémicas: mecanismos subyacentes. La hiperamonemia induce neuroinflamación en hipocampo, con activación de microglía, un aumento de los factores pro-inflamatorios (IL-1 β , TNF α) y una reducción de los factores anti-inflamatorios (IL-4, Arg1). El aumento de IL-1 β y la activación de su receptor alteran la expresión en membrana de las subunidades NR2B, GluA1 y GluA2 de los receptores NMDA y AMPA, causando un deterioro de la función cognitiva y déficits de memoria y aprendizaje. Las vesículas extracelulares derivadas de MSCs inyectadas a ratas hiperamonémicas alcanzan el hipocampo e inducen un deterioro de la polarización de la microglía hacia un estado anti-inflamatorio, revierten la neuroinflamación en hipocampo y restauran diferentes formas de aprendizaje y memoria. Los resultados obtenidos indican que estos efectos beneficiosos están mediados por la vía TGF β - TGF β R2-Smad7-IkBa-NF- κ B. El contenido de TGF β , de su receptor TGF β R2 y de Smad7 están reducidos en hiperamonemia, lo que conduce a una reducción en el contenido de IkBa y a una mayor activación de NF- κ B, que induce la expresión de marcadores pro-inflamatorios como IL-1 β y TNF α , llevando al deterioro cognitivo. Las EVs de MSCs contienen TGF β , el cual normaliza la vía TGF β - TGF β R2-Smad7-IkBa-NF- κ B en ratas hiperamonémicas. Esto normaliza los niveles de IL-1 β y, en consecuencia, la expresión en membrana de las subunidades NR2B, GluA1 y GluA2, restaurando la función cognitiva. *Esta imagen ha sido creada con BioRender.com*

Esto sugiere que el TGF β de las EVs podría mediar el cambio en la polarización de la microglía en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. Además, los efectos beneficiosos de las EVs de MSCs sobre la microglía se previenen si se bloquea el TGF β en la superficie de las EVs con anti-TGF β o si se añaden EVs sin TGF β a cortes de hipocampo; y se reproducen al incubar los cortes con TGF β recombinante. Por lo tanto, la activación de los receptores de TGF β en la microglía por el TGF β de las vesículas sería el desencadenante de la reducción del estado pro-inflamatorio de la microglía en ratas hiperamonémicas. Esto viene respaldado por el hecho de que bloquear los receptores de TGF β con un antagonista selectivo previene los efectos sobre la polarización de la microglía. En resumen, el cambio de fenotipo inducido por las EVs de MSCs en la microglía sería responsable de una reducción de la síntesis de IL-1 β por parte de la microglía.

Respecto a las neuronas, el aumento de IL-1 β en hiperamonemia y EHM se debe a un aumento de la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B, el cual promueve la transcripción de IL-1 β , TNF α y otros factores pro-inflamatorios (Dadsetan *et al.*, 2016b). Las MSC-EVs reducen la activación de la señalización por NF- κ B en neuronas de cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas reduciendo la translocación al núcleo de NF- κ B, y con ello normalizando los niveles de IL-1 β , TNF α y otros factores pro-inflamatorios dependientes de esta señalización.

Se analizó cómo reducían las EVs la translocación al núcleo de NF- κ B y los eventos subsiguientes mencionados anteriormente y resumidos en la Figura 72.

Las EVs derivadas de MSCs y de otros tipos celulares contienen TGF β en la superficie (Wada *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2013; Shelke *et al.*, 2019). Este TGF β parece mediar algunos de los efectos beneficiosos de las vesículas. Los exosomas que expresan TGF β en la membrana muestran actividad inmunosupresora y son capaces de inhibir la encefalitis experimental autoinmune (EAE), un modelo de esclerosis múltiple (Yu *et al.*, 2013). También se ha visto que los exosomas derivados de MSCs revierten la transición epitelio-mesénquima mediante la vía TGF β /Smad y promueven la reparación del endometrio dañado (Yao *et al.*, 2019).

Basándonos en estos estudios, planteamos la hipótesis de que las EVs de MSCs reducían la translocación al núcleo de NF- κ B en las neuronas del hipocampo de las ratas hiperamonémicas mediante el TGF β presente en la membrana de las vesículas. Los experimentos realizados muestran que la reversión de la translocación al núcleo de NF- κ B no ocurría cuando se incubaban las EVs con anti-TGF β , añadiendo EVs de MSCs que carecían de TGF β o bloqueando los receptores de TGF β , mientras que se reproducía si se añadía TGF β recombinante. Estos datos señalan que, efectivamente, el TGF β de las EVs media la reducción de la activación de NF- κ B.

A continuación, intentamos averiguar cómo el TGF β reduce la señalización por NF- κ B. Noh *et al.* (2016) observaron que el TGF β secretado por las MSCs inhibía la vía de NF- κ B en microglía activada con LPS regulando la fosforilación de Smad2/3 mediante el receptor 1 de TGF β . Evaluamos si la vía Smad2/3 podría estar mediando los efectos del

TGF β de las EVs sobre la señalización por NF- κ B en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. No obstante, en nuestro modelo no se observaron cambios en la fosforilación de Smad2 ni de Smad3.

El TGF β también puede inhibir la señalización de NF- κ B induciendo Smad7, que promueve la transcripción de I κ B α , un inhibidor clave de la señalización de NF- κ B. Nuestros resultados muestran que la hiperamonemia reduce el contenido de Smad7 y de I κ B α en el hipocampo y que ambos se restauran tras el tratamiento con MSC-EVs o con TGF β recombinante. Esto sugiere que la normalización de la vía Smad7-I κ B α estaría mediando los efectos del TGF β de las EVs sobre la señalización de NF- κ B en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

También observamos que la hiperamonemia reduce los niveles de TGF β en el hipocampo, así como el contenido total y la expresión en membrana del receptor 2 de TGF β . Esto conduciría a una reducción de la funcionalidad de las vías moduladas por TGF β y sus receptores y podría explicar la reducción en el contenido de Smad7 e I κ B α en las ratas hiperamonémicas.

En resumen (Figura 72), los datos obtenidos muestran que las ratas hiperamonémicas presentan una reducción en los niveles de TGF β y una menor expresión en membrana de receptores de TGF β en el hipocampo. Esto conduce a la activación de la microglía y a su polarización hacia un estado pro-inflamatorio, así como a una reducción de la vía Smad7-I κ B α , lo cual promueve la translocación al núcleo de NF- κ B en neuronas. Tanto la activación de la microglía como la translocación de NF- κ B inducen y aumentan la síntesis de IL-1 β en microglía y neuronas. Este aumento en los niveles de IL-1 β conduce a la activación del receptor de IL-1, el cual, a su vez, altera la expresión en membrana de subunidades de receptores AMPA y NMDA, induciendo el deterioro cognitivo.

Las vesículas extracelulares derivadas de MSCs inyectadas a las ratas hiperamonémicas alcanzan el hipocampo y restauran la función cognitiva. Esta mejora de la función cognitiva es mediada por el TGF β presente en la superficie de las EVs, que se une a los receptores de TGF β en microglía y neuronas. El TGF β conduce a un cambio en el fenotipo de la microglía desde un estado pro-inflamatorio hacia un estado anti-inflamatorio, reduciendo la producción de IL-1 β . Además, el TGF β reduce la translocación nuclear de NF- κ B en neuronas normalizando la vía Smad7-I κ B α . Esto también normaliza la producción de IL-1 β en las neuronas, contribuyendo a la normalización de los niveles de IL-1 β en el hipocampo. Al reducirse los niveles de IL-1 β , se reduce la activación del receptor de IL-1 y los cambios en la expresión en membrana de NR2B, GluA1 y GluA2, restaurándose así la función cognitiva.

Como conclusión, los datos obtenidos demuestran que las vesículas extracelulares derivadas de MSCs son capaces de revertir la neuroinflamación y de restaurar la función cognitiva en ratas con hiperamonemia crónica. Estos efectos se producen tanto en cerebelo (Capítulo 3) como en hipocampo (Capítulo 4), las principales áreas cerebrales afectadas en encefalopatía hepática. Actualmente, no existen tratamientos específicos disponibles para revertir las alteraciones neurológicas en pacientes con EHM, la cual

afecta a más de 5 millones de personas en los Estados Unidos (Leevy y Phillips, 2007) y a un número similar de pacientes en Europa. Solo se ha aprobado el uso de un fármaco, el antibiótico rifaximina, para prevenir la aparición de episodios de EH clínica (Bass *et al.*, 2010; Mullen *et al.*, 2014; Bajaj *et al.*, 2015). Sin embargo, la rifaximina solo mejora la función cognitiva en aproximadamente un 50 % de los pacientes con encefalopatía hepática mínima (Mangas-Losada *et al.*, 2019). Por lo tanto, se requieren fármacos seguros y más eficaces para tratar las alteraciones cognitivas en pacientes con EHM. Los datos presentados en esta tesis indican que las MSC-EVs suponen una opción terapéutica de interés en el campo de la EH y que podrían mejorar la función cognitiva y motora en pacientes con EHM o EH clínica.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Section A. Extracellular vesicles from plasma of hyperammonemic rats induce neuroinflammation and motor and cognitive deficits when injected to control rats

1. Hyperammonemia increases the amount of extracellular vesicles in plasma of rats and alters the protein cargo of these vesicles, increasing the content of TNF α and of its receptor TNFR1.
2. Extracellular vesicles (EVs) from plasma of hyperammonemic rats reach the cerebellum and the hippocampus following intravenous injection to control rats.
3. EVs from plasma of hyperammonemic rats induce neuroinflammation, with microglia and astrocytes activation in cerebellum and hippocampus of control rats, both *in vivo* and *ex vivo*. They also increase pro-inflammatory factors (TNF α , IL-1 β and IL-6) and reduce anti-inflammatory factors (IL-4, IL-10 and arginase 1) in these brain areas.
4. EVs from plasma of hyperammonemic rats induce motor and cognitive impairment when injected to control rats, eliciting motor incoordination and deficits in short term, object location and object recognition memory.
5. The mechanism leading to motor incoordination would be as follows: the TNF α contained in the vesicles would interact with its receptor TNFR1 in cerebellum, increasing NF- κ B activation, which enhances transcription of glutaminase. This increases glutamate, leading to increased extracellular GABA, which induces motor incoordination.
6. The mechanism leading to cognitive deficits would be as follows: the TNF α contained in the vesicles would interact with its receptor TNFR1 in hippocampus, increasing NF- κ B activation in CA1 neurons and microglia, which enhances IL-1 β production. IL-1 β alters membrane expression of AMPA and NMDA receptors, increasing that of NR2B and GluA2 subunits and reducing that of GluA1 subunit, which would be responsible for the cognitive alterations.
7. Extracellular vesicles from plasma play a key role in the communication between the periphery and the brain in hyperammonemic rats. Plasma EVs contribute to the induction of neuroinflammation and of motor and cognitive deficits in hyperammonemic rats. This knowledge may allow to design new treatments to improve neurological function in hyperammonemia and minimal hepatic encephalopathy.

Section B. Treatment with extracellular vesicles from mesenchymal stem cells reverses neuroinflammation and cognitive and motor impairment in hyperammonemic rats

8. Extracellular vesicles (EVs) from mesenchymal stem cells (MSCs) reach the cerebellum and the hippocampus following intravenous injection to hyperammonemic rats.

9. EVs from MSCs reverse neuroinflammation in cerebellum and hippocampus of hyperammonemic rats, reducing microglia and astrocytes activation, both *in vivo* and *ex vivo*. They also normalize the content of pro-inflammatory factors (TNF α , IL-1 β and IL-6) and anti-inflammatory factors (IL-4, IL-10 and arginase 1) in these brain areas.

10. EVs from mesenchymal stem cells restore motor and cognitive function when injected to hyperammonemic rats, normalizing motor coordination, memory and learning.

11. EVs from mesenchymal stem cells would restore motor coordination in hyperammonemic rats by reducing the content of TNF α and activation of TNFR1 in cerebellum of hyperammonemic rats, thus reducing the activation of NF- κ B and the production of glutaminase. This would reduce the content of glutamate and extracellular GABA in cerebellum to normal levels, thus restoring motor coordination in hyperammonemic rats.

12. The improvement of memory and learning would be mediated by TGF β in the surface of EVs. Hyperammonemic rats show reduced levels of TGF β , TGF β R2, Smad7 and I κ B α ; and an increased phosphorylation of I κ B α in hippocampus. The alteration of this pathway leads to enhanced activation of NF- κ B in neurons and microglia, increasing the production of IL-1 β . The higher levels of IL-1 β alter the membrane expression of NR2B, GluA1 and GluA2 subunits of NMDA and AMPA receptors, leading to memory and learning deficits. EVs from mesenchymal stem cells normalize this pathway, restoring cognitive function in hyperammonemic rats.

13. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells could improve cognitive and motor function in patients with minimal hepatic encephalopathy or clinical hepatic encephalopathy and are a promising therapeutic option to be investigated in patients.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abels, E. R., & Breakefield, X. O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and molecular neurobiology*, 36(3), 301–312. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>
2. Abusamra, A. J., Zhong, Z., Zheng, X., Li, M., Ichim, T. E., Chin, J. L., & Min, W. P. (2005). Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood cells, molecules & diseases*, 35(2), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.07.001>
3. Aguilar, M. A., Miñarro, J., & Felipo, V. (2000). Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats. *Experimental neurology*, 161(2), 704–713. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7299>
4. Agusti, A., Cauli, O., Rodrigo, R., Llansola, M., Hernández-Rabaza, V., & Felipo, V. (2011). p38 MAP kinase is a therapeutic target for hepatic encephalopathy in rats with portacaval shunts. *Gut*, 60(11), 1572–1579. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.236083>
5. Agusti, A., Hernández-Rabaza, V., Balzano, T., Taoro-Gonzalez, L., Ibañez-Grau, A., Cabrera-Pastor, A., Fustero, S., Llansola, M., Montoliu, C., & Felipo, V. (2017). Sildenafil reduces neuroinflammation in cerebellum, restores GABAergic tone, and improves motor in-coordination in rats with hepatic encephalopathy. *CNS neuroscience & therapeutics*, 23(5), 386–394. <https://doi.org/10.1111/cns.12688>
6. Alonso, R., Mazzeo, C., Mérida, I., & Izquierdo, M. (2007). A new role of diacylglycerol kinase alpha on the secretion of lethal exosomes bearing Fas ligand during activation-induced cell death of T lymphocytes. *Biochimie*, 89(2), 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.018>
7. Als-Nielsen, B., Gluud, L. L., & Gluud, C. (2004). Non-absorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: systematic review of randomised trials. *BMJ (Clinical research ed.)*, 328(7447), 1046. <https://doi.org/10.1136/bmj.38048.506134.EE>
8. Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakkhal, S., & Wood, M. J. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature biotechnology*, 29(4), 341–345. <https://doi.org/10.1038/nbt.1807>
9. Amlal, H., & Soleimani, M. (1997). K⁺/NH₄⁺ antiporter: a unique ammonium carrying transporter in the kidney inner medulla. *Biochimica et biophysica acta*, 1323(2), 319–333. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(96\)00200-3](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(96)00200-3)
10. Anderson H. C. (1969). Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *The Journal of cell biology*, 41(1), 59–72. <https://doi.org/10.1083/jcb.41.1.59>
11. Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., Stringaro, A., Molinari, A., Arancia, G., Gentile, M., Parmiani, G., & Fais, S. (2002). Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *The Journal of experimental medicine*, 195(10), 1303–1316. <https://doi.org/10.1084/jem.20011624>
12. Ankrum, J. A., Ong, J. F., & Karp, J. M. (2014). Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature biotechnology*, 32(3), 252–260. <https://doi.org/10.1038/nbt.2816>
13. Antonyak, M. A., Li, B., Boroughs, L. K., Johnson, J. L., Druso, J. E., Bryant, K. L., Holowka, D. A., & Cerione, R. A. (2011). Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient

- cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 4852–4857. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017667108>
14. Aronson, D. C., Chamuleau, R. A., Frederiks, W. M., Gooszen, H. G., Heijmans, H. S., & James, J. (1993). Reversibility of cholestatic changes following experimental common bile duct obstruction: fact or fantasy?. *Journal of hepatology*, 18(1), 85–95. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(05\)80014-5](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(05)80014-5)
 15. Augello, A., Tasso, R., Negrini, S. M., Cancedda, R., & Pennesi, G. (2007). Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 56(4), 1175–1186. <https://doi.org/10.1002/art.22511>
 16. Azorín, I., Miñana, M. D., Felipo, V., & Grisolia, S. (1989). A simple animal model of hyperammonemia. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 10(3), 311–314. <https://doi.org/10.1002/hep.1840100310>
 17. Badillo, A. T., Beggs, K. J., Javazon, E. H., Tebbets, J. C., & Flake, A. W. (2007). Murine bone marrow stromal progenitor cells elicit an in vivo cellular and humoral alloimmune response. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 13(4), 412–422. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2006.12.447>
 18. Baek, G., Choi, H., Kim, Y., Lee, H. C., & Choi, C. (2019). Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Therapeutics and as a Drug Delivery Platform. *Stem cells translational medicine*, 8(9), 880–886. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0226>
 19. Bagno, L., Hatzistergos, K. E., Balkan, W., & Hare, J. M. (2018). Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Cardiovascular Disease: Progress and Challenges. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(7), 1610–1623. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.05.009>
 20. Bahrini, I., Song, J. H., Diez, D., & Hanayama, R. (2015). Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. *Scientific reports*, 5, 7989. <https://doi.org/10.1038/srep07989>
 21. Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., & David, G. (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature cell biology*, 14(7), 677–685. <https://doi.org/10.1038/ncb2502>
 22. 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., Sterling, R. K., Shiffman, M., Topaz, A., Boyett, S., Bell, D., & Sanyal, A. J. (2009). Minimal hepatic encephalopathy is associated with motor vehicle crashes: the reality beyond the driving test. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(4), 1175–1183. <https://doi.org/10.1002/hep.23128>
 23. Bajaj, J. S., Heuman, D. M., Sanyal, A. J., Hylemon, P. B., Sterling, R. K., Stravitz, R. T., Fuchs, M., Ridlon, J. M., Daita, K., Monteith, P., Noble, N. A., White, M. B., Fisher, A., Sikaroodi, M., Rangwala, H., & Gillevet, P. M. (2013). Modulation of the metabiome by rifaximin in patients with cirrhosis and minimal hepatic encephalopathy. *PLoS one*, 8(4), e60042. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060042>
 24. Bajaj, J. S., Barrett, A. C., Bortey, E., Paterson, C., & Forbes, W. P. (2015). Prolonged remission from hepatic encephalopathy with rifaximin: results of a placebo crossover analysis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 41(1), 39–45. <https://doi.org/10.1111/apt.12993>
 25. Baj-Krzyworzeka, M., Szatanek, R., Weglarczyk, K., Baran, J., Urbanowicz, B., Brański, P., Ratajczak, M. Z., & Zembala, M. (2006). Tumour-derived microvesicles carry several

- surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 55(7), 808–818. <https://doi.org/10.1007/s00262-005-0075-9>
26. Baj-Krzyworzeka, M., Weglarczyk, K., Mytar, B., Szatanek, R., Baran, J., & Zembala, M. (2011). Tumour-derived microvesicles contain interleukin-8 and modulate production of chemokines by human monocytes. *Anticancer research*, 31(4), 1329–1335.
 27. Bakhti, M., Winter, C., & Simons, M. (2011). Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *The Journal of biological chemistry*, 286(1), 787–796. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.190009>
 28. Balaj, L., Lessard, R., Dai, L., Cho, Y. J., Pomeroy, S. L., Breakefield, X. O., & Skog, J. (2011). Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature communications*, 2, 180. <https://doi.org/10.1038/ncomms1180>
 29. Balzano, T., Forteza, J., Molina, P., Giner, J., Monzó, A., Sancho-Jiménez, J., Urios, A., Montoliu, C., & Felipo, V. (2018a). The Cerebellum of Patients with Steatohepatitis Shows Lymphocyte Infiltration, Microglial Activation and Loss of Purkinje and Granular Neurons. *Scientific reports*, 8(1), 3004. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21399-6>
 30. Balzano, T., Forteza, J., Borreda, I., Molina, P., Giner, J., Leone, P., Urios, A., Montoliu, C., & Felipo, V. (2018b). Histological Features of Cerebellar Neuropathology in Patients With Alcoholic and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 77(9), 837–845. <https://doi.org/10.1093/jnen/nly061>
 31. Balzano, T., Arenas, Y. M., Dadsetan, S., Forteza, J., Gil-Perotin, S., Cubas-Nuñez, L., Casanova, B., Gracià, F., Varela-Andrés, N., Montoliu, C., Llansola, M., & Felipo, V. (2020a). Sustained hyperammonemia induces TNF- α IN Purkinje neurons by activating the TNFR1-NF- κ B pathway. *Journal of neuroinflammation*, 17(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01746-z>
 32. Balzano, T., Dadsetan, S., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Malaguarnera, M., Gil-Perotin, S., Cubas-Nuñez, L., Casanova, B., Castro-Quintas, A., Ponce-Mora, A., Arenas, Y. M., Leone, P., Erceg, S., Llansola, M., & Felipo, V. (2020b). Chronic hyperammonemia induces peripheral inflammation that leads to cognitive impairment in rats: Reversed by anti-TNF- α treatment. *Journal of hepatology*, 73(3), 582–592. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.01.008>
 33. Bänfer, S., Schneider, D., Dewes, J., Strauss, M. T., Freibert, S. A., Heimerl, T., Maier, U. G., Elsässer, H. P., Jungmann, R., & Jacob, R. (2018). Molecular mechanism to recruit galectin-3 into multivesicular bodies for polarized exosomal secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19), E4396–E4405. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718921115>
 34. Barger, S. W., & Basile, A. S. (2001). Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cystine exchange and attenuates synaptic function. *Journal of neurochemistry*, 76(3), 846–854. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00075.x>
 35. Barger, S. W., Goodwin, M. E., Porter, M. M., & Beggs, M. L. (2007). Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. *Journal of neurochemistry*, 101(5), 1205–1213. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04487.x>
 36. Bass, N. M., Mullen, K. D., Sanyal, A., Poordad, F., Neff, G., Leevy, C. B., Sigal, S., Sheikh, M. Y., Beavers, K., Frederick, T., Teperman, L., Hillebrand, D., Huang, S., Merchant, K., Shaw, A., Bortey, E., & Forbes, W. P. (2010). Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *The New England journal of medicine*, 362(12), 1071–1081. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907893>

37. Basso, M., Pozzi, S., Tortarolo, M., Fiordaliso, F., Bisighini, C., Pasetto, L., Spaltro, G., Lidonnici, D., Gensano, F., Battaglia, E., Bendotti, C., & Bonetto, V. (2013). Mutant copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) induces protein secretion pathway alterations and exosome release in astrocytes: implications for disease spreading and motor neuron pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of biological chemistry*, 288(22), 15699–15711. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.425066>
38. Batagov, A. O., & Kurochkin, I. V. (2013). Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biology direct*, 8, 12. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-8-12>
39. Bengtsson, F., Nobin, A., Falck, B., Gage, F. H., & Jeppsson, B. (1986). Portacaval shunt in the rat: selective alterations in behavior and brain serotonin. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 24(6), 1611–1616. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90494-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90494-6)
40. Bhatnagar, S., & Schorey, J. S. (2007). Exosomes released from infected macrophages contain Mycobacterium avium glycopeptidolipids and are proinflammatory. *The Journal of biological chemistry*, 282(35), 25779–25789. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702277200>
41. Bianco, F., Pravettoni, E., Colombo, A., Schenk, U., Möller, T., Matteoli, M., & Verderio, C. (2005). Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(11), 7268–7277. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.7268>
42. Bianco, F., Perrotta, C., Novellino, L., Francolini, M., Riganti, L., Menna, E., Saglietti, L., Schuchman, E. H., Furlan, R., Clementi, E., Matteoli, M., & Verderio, C. (2009). Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *The EMBO journal*, 28(8), 1043–1054. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.45>
43. Bilbo, S. D., Smith, S. H., & Schwarz, J. M. (2012). A lifespan approach to neuroinflammatory and cognitive disorders: a critical role for glia. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 7(1), 24–41. <https://doi.org/10.1007/s11481-011-9299-y>
44. Boix, J., Cauli, O., & Felipo, V. (2010). Developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 affects differentially learning or motor coordination in adult rats. Mechanisms involved. *Neuroscience*, 167(4), 994–1003. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.068>
45. Bonjoch, L., Casas, V., Carrascal, M., & Closa, D. (2016). Involvement of exosomes in lung inflammation associated with experimental acute pancreatitis. *The Journal of pathology*, 240(2), 235–245. <https://doi.org/10.1002/path.4771>
46. Börger, V., Bremer, M., Ferrer-Tur, R., Gockeln, L., Stambouli, O., Becic, A., & Giebel, B. (2017). Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles and Their Potential as Novel Immunomodulatory Therapeutic Agents. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1450. <https://doi.org/10.3390/ijms18071450>
47. Boyer, L., Richieri, R., Dassa, D., Boucekine, M., Fernandez, J., Vaillant, F., Padovani, R., Auquier, P., & Lancon, C. (2013). Association of metabolic syndrome and inflammation with neurocognition in patients with schizophrenia. *Psychiatry research*, 210(2), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2013.06.020>
48. Bruno, S., Grange, C., Deregibus, M. C., Calogero, R. A., Saviozzi, S., Collino, F., Morando, L., Busca, A., Falda, M., Bussolati, B., Tetta, C., & Camussi, G. (2009). Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 20(5), 1053–1067. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008070798>

49. Bucki, R., Bachelot-Loza, C., Zachowski, A., Giraud, F., & Sulpice, J. C. (1998). Calcium induces phospholipid redistribution and microvesicle release in human erythrocyte membranes by independent pathways. *Biochemistry*, *37*(44), 15383–15391. <https://doi.org/10.1021/bi9805238>
50. Bukanova, J. V., Solntseva, E. I., Kondratenko, R. V., & Skrebitsky, V. G. (2014). Glycine receptor in hippocampal neurons as a target for action of extracellular cyclic nucleotides. *Neuroscience letters*, *561*, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.037>
51. Burguillos, M. A., Svensson, M., Schulte, T., Boza-Serrano, A., Garcia-Quintanilla, A., Kavanagh, E., Santiago, M., Viceconte, N., Oliva-Martin, M. J., Osman, A. M., Salomonsson, E., Amar, L., Persson, A., Blomgren, K., Achour, A., Englund, E., Leffler, H., Venero, J. L., Joseph, B., & Deierborg, T. (2015). Microglia-Secreted Galectin-3 Acts as a Toll-like Receptor 4 Ligand and Contributes to Microglial Activation. *Cell reports*, *10*(9), 1626–1638. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.012>
52. Burkhard, P. R., Delavelle, J., Du Pasquier, R., & Spahr, L. (2003). Chronic parkinsonism associated with cirrhosis: a distinct subset of acquired hepatocerebral degeneration. *Archives of neurology*, *60*(4), 521–528. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.4.521>
53. Bustamante, J., Rimola, A., Ventura, P. J., Navasa, M., Cirera, I., Reggiardo, V., & Rodés, J. (1999). Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Journal of hepatology*, *30*(5), 890–895. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(99\)80144-5](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(99)80144-5)
54. 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*.
55. Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., & Felipo, V. (2016a). Hyperammonemia alters glycinergic neurotransmission and modulation of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway by extracellular glycine in cerebellum in vivo. *Journal of neurochemistry*, *137*(4), 539–548. <https://doi.org/10.1111/jnc.13579>
56. Cabrera-Pastor, A., Malaguarnera, M., Taoro-Gonzalez, L., Llansola, M., & Felipo, V. (2016b). Extracellular cGMP Modulates Learning Biphatically by Modulating Glycine Receptors, CaMKII and Glutamate-Nitric Oxide-cGMP Pathway. *Scientific reports*, *6*, 33124. <https://doi.org/10.1038/srep33124>
57. Cabrera-Pastor, A., Hernandez-Rabaza, V., Taoro-Gonzalez, L., Balzano, T., Llansola, M., & Felipo, V. (2016c). 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, behavior, and immunity*, *57*, 360–370. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.05.011>
58. Cabrera-Pastor, A., Taoro-González, L., Cuñat, A. N., Canet-López, D., Balzano, T., & Felipo, V. (2017). Extracellular Cyclic GMP Modulates Membrane Expression of The GluA1 and GluA2 Subunits of AMPA Receptor in Cerebellum: Molecular Mechanisms Involved. *Scientific reports*, *7*(1), 17656. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18024-3>
59. Cabrera-Pastor, A., Balzano, T., Hernández-Rabaza, V., Malaguarnera, M., Llansola, M., & Felipo, V. (2018). Increasing extracellular cGMP in cerebellum in vivo reduces neuroinflammation, GABAergic tone and motor in-coordination in hyperammonemic rats. *Brain, behavior, and immunity*, *69*, 386–398. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.12.013>

60. Cabrera-Pastor, A., Llansola, M., Montoliu, C., Malaguarnera, M., Balzano, T., Taoro-Gonzalez, L., García-García, R., Mangas-Losada, A., Izquierdo-Altarejos, P., Arenas, Y. M., Leone, P., & Felipo, V. (2019a). Peripheral inflammation induces neuroinflammation that alters neurotransmission and cognitive and motor function in hepatic encephalopathy: Underlying mechanisms and therapeutic implications. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 226(2), e13270. <https://doi.org/10.1111/apha.13270>
61. Cabrera-Pastor, A., Arenas, Y. M., Taoro-Gonzalez, L., Montoliu, C., & Felipo, V. (2019b). Chronic hyperammonemia alters extracellular glutamate, glutamine and GABA and membrane expression of their transporters in rat cerebellum. Modulation by extracellular cGMP. *Neuropharmacology*, 161, 107496. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.01.011>
62. Cagnin, A., Taylor-Robinson, S. D., Forton, D. M., & Banati, R. B. (2006). In vivo imaging of cerebral "peripheral benzodiazepine binding sites" in patients with hepatic encephalopathy. *Gut*, 55(4), 547–553. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.075051>
63. Caimi, P. F., Reese, J., Lee, Z., & Lazarus, H. M. (2010). Emerging therapeutic approaches for multipotent mesenchymal stromal cells. *Current opinion in hematology*, 17(6), 505–513. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32833e5b18>
64. Cardona, A. E., Pioro, E. P., Sasse, M. E., Kostenko, V., Cardona, S. M., Dijkstra, I. M., Huang, D., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., Lee, J. C., Cook, D. N., Jung, S., Lira, S. A., Littman, D. R., & Ransohoff, R. M. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature neuroscience*, 9(7), 917–924. <https://doi.org/10.1038/nn1715>
65. Castro, B., Martinez-Redondo, D., Gartzia, I., Alonso-Varona, A., Garrido, P., & Palomares, T. (2019). Cryopreserved H₂ O₂ -preconditioned human adipose-derived stem cells exhibit fast post-thaw recovery and enhanced bioactivity against oxidative stress. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 13(2), 328–341. <https://doi.org/10.1002/term.2797>
66. Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Boix, J., & Felipo, V. (2007). Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 46(2), 514–519. <https://doi.org/10.1002/hep.21734>
67. Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Llansola, M., Mansouri, M. T., & Felipo, V. (2009). Neuroinflammation contributes to hypokinesia in rats with hepatic encephalopathy: ibuprofen restores its motor activity. *Journal of neuroscience research*, 87(6), 1369–1374. <https://doi.org/10.1002/jnr.21947>
68. Chan, B. D., Wong, W. Y., Lee, M. M., Cho, W. C., Yee, B. K., Kwan, Y. W., & Tai, W. C. (2019). Exosomes in Inflammation and Inflammatory Disease. *Proteomics*, 19(8), e1800149. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800149>
69. Chandok, N., & Watt, K. D. (2010). Pain management in the cirrhotic patient: the clinical challenge. *Mayo Clinic proceedings*, 85(5), 451–458. <https://doi.org/10.4065/mcp.2009.0534>
70. Chargaff, E., & West, R. (1946). The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *The Journal of biological chemistry*, 166(1), 189–197.
71. Chen, C. C., Liu, L., Ma, F., Wong, C. W., Guo, X. E., Chacko, J. V., Farhoodi, H. P., Zhang, S. X., Zimak, J., Ségaliny, A., Riazifar, M., Pham, V., Digman, M. A., Pone, E. J., & Zhao, W. (2016). Elucidation of Exosome Migration across the Blood-Brain Barrier Model In Vitro. *Cellular and molecular bioengineering*, 9(4), 509–529. <https://doi.org/10.1007/s12195-016-0458-3>

72. Chen, S., Luo, D., Streit, W. J., & Harrison, J. K. (2002). TGF-beta1 upregulates CX3CR1 expression and inhibits fractalkine-stimulated signaling in rat microglia. *Journal of neuroimmunology*, 133(1-2), 46–55. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(02\)00354-5](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(02)00354-5)
73. Cheng, X., Jiang, M., Long, L., & Meng, J. (2021). Potential roles of mesenchymal stem cells and their exosomes in the treatment of COVID-19. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 26(10), 948–961. <https://doi.org/10.52586/4999>
74. Cherniack E. P. (2012). A berry thought-provoking idea: the potential role of plant polyphenols in the treatment of age-related cognitive disorders. *The British journal of nutrition*, 108(5), 794–800. <https://doi.org/10.1017/S0007114512000669>
75. Chiu, C. S., Brickley, S., Jensen, K., Southwell, A., Mckinney, S., Cull-Candy, S., Mody, I., & Lester, H. A. (2005). GABA transporter deficiency causes tremor, ataxia, nervousness, and increased GABA-induced tonic conductance in cerebellum. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(12), 3234–3245. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3364-04.2005>
76. Chivet, M., Javalet, C., Hemming, F., Pernet-Gallay, K., Laulagnier, K., Fraboulet, S., & Sadoul, R. (2013). Exosomes as a novel way of interneuronal communication. *Biochemical Society transactions*, 41(1), 241–244. <https://doi.org/10.1042/BST20120266>
77. Christensen A. L. (1984). Neuropsychological investigation with Luria's methods. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 10 Suppl 1, 33–34.
78. Cianciaruso, C., Phelps, E. A., Pasquier, M., Hamelin, R., Demurtas, D., Alibashe Ahmed, M., Piemonti, L., Hirose, S., Swartz, M. A., De Palma, M., Hubbell, J. A., & Baekkeskov, S. (2017). Primary Human and Rat β -Cells Release the Intracellular Autoantigens GAD65, IA-2, and Proinsulin in Exosomes Together With Cytokine-Induced Enhancers of Immunity. *Diabetes*, 66(2), 460–473. <https://doi.org/10.2337/db16-0671>
79. Clayton, A., Al-Taei, S., Webber, J., Mason, M. D., & Tabi, Z. (2011). Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 187(2), 676–683. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003884>
80. Clayton, A., Mitchell, J. P., Court, J., Mason, M. D., & Tabi, Z. (2007). Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer research*, 67(15), 7458–7466. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3456>
81. Clemmesen, J. O., Larsen, F. S., Kondrup, J., Hansen, B. A., & Ott, P. (1999). Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 29(3), 648–653. <https://doi.org/10.1002/hep.510290309>
82. Conn, H. O., Leevy, C. M., Vlahcevic, Z. R., Rodgers, J. B., Maddrey, W. C., Seeff, L., & Levy, L. L. (1977). Comparison of lactulose and neomycin in the treatment of chronic portal-systemic encephalopathy. A double blind controlled trial. *Gastroenterology*, 72(4 Pt 1), 573–583.
83. Corbalán, R., Chatauret, N., Behrends, S., Butterworth, R. F., & Felipo, V. (2002). Region selective alterations of soluble guanylate cyclase content and modulation in brain of cirrhotic patients. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 36(5), 1155–1162. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.36365>
84. Córdoba J. (2011). New assessment of hepatic encephalopathy. *Journal of hepatology*, 54(5), 1030–1040. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.015>
85. Dabrowska, S., Andrzejewska, A., Strzemecki, D., Muraca, M., Janowski, M., & Lukomska, B. (2019). Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular

- vesicles attenuate neuroinflammation evoked by focal brain injury in rats. *Journal of neuroinflammation*, 16(1), 216. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1602-5>
86. Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Agusti, A., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernandez-Rabaza, V., Gomez-Gimenez, B., EIMlili, N., Llansola, M., & Felipo, V. (2016a). Infliximab reduces peripheral inflammation, neuroinflammation, and extracellular GABA in the cerebellum and improves learning and motor coordination in rats with hepatic encephalopathy. *Journal of neuroinflammation*, 13(1), 245. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0710-8>
 87. Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernandez-Rabaza, V., Gil-Perotín, S., Cubas-Núñez, L., García-Verdugo, J. M., Agusti, A., Llansola, M., & Felipo, V. (2016b). Reducing Peripheral Inflammation with Infliximab Reduces Neuroinflammation and Improves Cognition in Rats with Hepatic Encephalopathy. *Frontiers in molecular neuroscience*, 9, 106. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00106>
 88. Danzer, K. M., Kranich, L. R., Ruf, W. P., Cagsal-Getkin, O., Winslow, A. R., Zhu, L., Vanderburg, C. R., & McLean, P. J. (2012). Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Molecular neurodegeneration*, 7, 42. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-42>
 89. Das, A., Dhiman, R. K., Saraswat, V. A., Verma, M., & Naik, S. R. (2001). Prevalence and natural history of subclinical hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 16(5), 531–535. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2001.02487.x>
 90. De Flora, A., Guida, L., Franco, L., Zocchi, E., Pestarino, M., Usai, C., Marchetti, C., Fedele, E., Fontana, G., & Raiteri, M. (1996). Ectocellular in vitro and in vivo metabolism of cADP-ribose in cerebellum. *The Biochemical journal*, 320 (Pt 2)(Pt 2), 665–671.
 91. de Rivero Vaccari, J. P., Brand, F., 3rd, Adamczak, S., Lee, S. W., Perez-Barcena, J., Wang, M. Y., Bullock, M. R., Dietrich, W. D., & Keane, R. W. (2016). Exosome-mediated inflammasome signaling after central nervous system injury. *Journal of neurochemistry*, 136 Suppl 1(0 1), 39–48. <https://doi.org/10.1111/jnc.13036>
 92. den Hartog, G., van Altena, C., Savelkoul, H. F., & van Neerven, R. J. (2013). The mucosal factors retinoic acid and TGF- β 1 induce phenotypically and functionally distinct dendritic cell types. *International archives of allergy and immunology*, 162(3), 225–236. <https://doi.org/10.1159/000353243>
 93. Deng, K., Lin, D. L., Hanzlicek, B., Balog, B., Penn, M. S., Kiedrowski, M. J., Hu, Z., Ye, Z., Zhu, H., & Damaser, M. S. (2015). Mesenchymal stem cells and their secretome partially restore nerve and urethral function in a dual muscle and nerve injury stress urinary incontinence model. *American journal of physiology. Renal physiology*, 308(2), F92–F100. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00510.2014>
 94. Dennis, C. V., Sheahan, P. J., Graeber, M. B., Sheedy, D. L., Kril, J. J., & Sutherland, G. T. (2014). Microglial proliferation in the brain of chronic alcoholics with hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, 29(4), 1027–1039. <https://doi.org/10.1007/s11011-013-9469-0>
 95. Dhiman, R. K., & Chawla, Y. K. (2009). Minimal hepatic encephalopathy. *Indian journal of gastroenterology: official journal of the Indian Society of Gastroenterology*, 28(1), 5–16. <https://doi.org/10.1007/s12664-009-0003-6>
 96. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining

- multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.
<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
97. Duscher, D., Barrera, J., Wong, V. W., Maan, Z. N., Whittam, A. J., Januszyk, M., & Gurtner, G. C. (2016). Stem Cells in Wound Healing: The Future of Regenerative Medicine? A Mini-Review. *Gerontology*, 62(2), 216–225.
<https://doi.org/10.1159/000381877>
 98. Dziechciowski, M., Zapala, B., Skotniczny, K., Gawlik, K., Pawlica-Gosiewska, D., Piwowar, M., Balajewicz-Nowak, M., Basta, P., Solnica, B., & Pitynski, K. (2018). Diagnostic and prognostic relevance of microparticles in peripheral and uterine blood of patients with endometrial cancer. *Ginekologia polska*, 89(12), 682–687.
<https://doi.org/10.5603/GP.a2018.0115>
 99. Edelstein, L., & Smythies, J. (2014). The role of epigenetic-related codes in neurocomputation: dynamic hardware in the brain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1652), 20130519.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0519>
 100. Eleuteri, S., & Fierabracci, A. (2019). Insights into the Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Applications. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4597. <https://doi.org/10.3390/ijms20184597>
 101. Elizondo, A., Araya, J., Rodrigo, R., Poniachik, J., Csendes, A., Maluenda, F., Díaz, J. C., Signorini, C., Sgherri, C., Comporti, M., & Videla, L. A. (2007). Polyunsaturated fatty acid pattern in liver and erythrocyte phospholipids from obese patients. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 15(1), 24–31. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.518>
 102. Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S. D., Ntzouni, M., Margaritis, L. H., Stefanis, L., & Vekrellis, K. (2010). Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(20), 6838–6851. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010>
 103. Ennaceur A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behavioural brain research*, 215(2), 244–254.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>
 104. Erceg, S., Monfort, P., Hernández-Viadel, M., Rodrigo, R., Montoliu, C., & Felipo, V. (2005a). Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 41(2), 299–306. <https://doi.org/10.1002/hep.20565>
 105. Erceg, S., Monfort, P., Hernandez-Viadel, M., Llansola, M., Montoliu, C., & Felipo, V. (2005b). Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain research*, 1036(1-2), 115–121.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.12.045>
 106. Facciabene, A., Motz, G. T., & Coukos, G. (2012). T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer research*, 72(9), 2162–2171.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3687>
 107. Fader, C. M., Sánchez, D. G., Mestre, M. B., & Colombo, M. I. (2009). TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(12), 1901–1916. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.09.011>
 108. Fauré, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V., Kirchhoff, F., Raposo, G., Garin, J., & Sadoul,

- R. (2006). Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Molecular and cellular neurosciences*, 31(4), 642–648. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.12.003>
109. Feliciano, D. M., Zhang, S., Nasrallah, C. M., Ligo, S. N., & Bordey, A. (2014). Embryonic cerebrospinal fluid nanovesicles carry evolutionarily conserved molecules and promote neural stem cell amplification. *PloS one*, 9(2), e88810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088810>
110. Felipo, V., Miñana, M. D., & Grisolia, S. (1988a). Long-term ingestion of ammonium increases acetylglutamate and urea levels without affecting the amount of carbamoyl-phosphate synthase. *European journal of biochemistry*, 176(3), 567–571. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14315.x>
111. Felipo, V., Miñana, M. D., & Grisolia, S. (1988b). Paradoxical protection of both protein-free and high protein diets against acute ammonium intoxication. *Biochemical and biophysical research communications*, 156(1), 506–510. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(88\)80870-2](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(88)80870-2)
112. Felipo, V., & Butterworth, R. F. (2002). Neurobiology of ammonia. *Progress in neurobiology*, 67(4), 259–279. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(02\)00019-9](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(02)00019-9)
113. Felipo, V., Urios, A., Montesinos, E., Molina, I., Garcia-Torres, M. L., Civera, M., Olmo, J. A., Ortega, J., Martinez-Valls, J., Serra, M. A., Cassinello, N., Wassel, A., Jordá, E., & Montoliu, C. (2012). Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, 27(1), 51–58. <https://doi.org/10.1007/s11011-011-9269-3>
114. Felipo V. (2013). Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nature reviews. Neuroscience*, 14(12), 851–858. <https://doi.org/10.1038/nrn3587>
115. Ferenci, P., Lockwood, A., Mullen, K., Tarter, R., Weissenborn, K., & Blei, A. T. (2002). Hepatic encephalopathy—definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 35(3), 716–721. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.31250>
116. Ferguson, A. R., Christensen, R. N., Gensel, J. C., Miller, B. A., Sun, F., Beattie, E. C., Bresnahan, J. C., & 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. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(44), 11391–11400. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3708-08.2008>
117. Fernández-Messina, L., Gutiérrez-Vázquez, C., Rivas-García, E., Sánchez-Madrid, F., & de la Fuente, H. (2015). Immunomodulatory role of microRNAs transferred by extracellular vesicles. *Biology of the cell*, 107(3), 61–77. <https://doi.org/10.1111/boc.201400081>
118. Ferrari, C. C., & Tarelli, R. (2011). Parkinson's disease and systemic inflammation. *Parkinson's disease*, 2011, 436813. <https://doi.org/10.4061/2011/436813>
119. Ferrari, G., Terushkin, V., Wolff, M. J., Zhang, X., Valacca, C., Poggio, P., Pintucci, G., & Mignatti, P. (2012). TGF- β 1 induces endothelial cell apoptosis by shifting VEGF activation of p38(MAPK) from the prosurvival p38 β to proapoptotic p38 α . *Molecular cancer research: MCR*, 10(5), 605–614. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0507>
120. Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H., & Raposo, G. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9683–9688. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308413101>

121. Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., Hanisch, U. K., & Simons, M. (2011). Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *Journal of cell science*, *124*(Pt 3), 447–458. <https://doi.org/10.1242/jcs.074088>
122. French, K. C., Antonyak, M. A., & Cerione, R. A. (2017). Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake. *Seminars in cell & developmental biology*, *67*, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.01.002>
123. Fröhlich, D., Kuo, W. P., Frühbeis, C., Sun, J. J., Zehendner, C. M., Luhmann, H. J., Pinto, S., Toedling, J., Trotter, J., & Krämer-Albers, E. M. (2014). Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *369*(1652), 20130510. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0510>
124. Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W. P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A. S., Kirchoff, F., Möbius, W., Goebels, S., Nave, K. A., Schneider, A., Simons, M., Klugmann, M., Trotter, J., & Krämer-Albers, E. M. (2013). Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS biology*, *11*(7), e1001604. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001604>
125. Fujita, Y., Araya, J., Ito, S., Kobayashi, K., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Kadota, T., Hara, H., Kuwano, K., & Ochiya, T. (2015). Suppression of autophagy by extracellular vesicles promotes myofibroblast differentiation in COPD pathogenesis. *Journal of extracellular vesicles*, *4*, 28388. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.28388>
126. Galipeau, J., & Sensébé, L. (2018). Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell stem cell*, *22*(6), 824–833. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.004>
127. Gao, W., Liu, H., Yuan, J., Wu, C., Huang, D., Ma, Y., Zhu, J., Ma, L., Guo, J., Shi, H., Zou, Y., & Ge, J. (2016). Exosomes derived from mature dendritic cells increase endothelial inflammation and atherosclerosis via membrane TNF- α mediated NF- κ B pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*, *20*(12), 2318–2327. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12923>
128. Gerok, W., & Häussinger, D. (1984). Ammoniumentgiftung und pH-Regulation durch die Leber [Ammonium detoxication and pH regulation by the liver]. *Die Medizinische Welt*, *35*(1-2), 28–34.
129. Ghazarian, H., Idoni, B., & Oppenheimer, S. B. (2011). A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta histochemica*, *113*(3), 236–247. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2010.02.004>
130. Gibbins, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M., & Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature cell biology*, *11*(9), 1143–1149. <https://doi.org/10.1038/ncb1929>
131. Glud, L. L., Vilstrup, H., & Morgan, M. Y. (2016). Non-absorbable disaccharides versus placebo/no intervention and lactulose versus lactitol for the prevention and treatment of hepatic encephalopathy in people with cirrhosis. *The Cochrane database of systematic reviews*, *2016*(5), CD003044. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003044.pub4>
132. Gnecci, M., Danieli, P., Malpasso, G., & Ciuffreda, M. C. (2016). Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1416*, 123–146. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3584-0_7
133. Go, V., Bowley, B., Pessina, M. A., Zhang, Z. G., Chopp, M., Finklestein, S. P., Rosene, D. L., Medalla, M., Buller, B., & Moore, T. L. (2020). Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells reduce microglial-mediated neuroinflammation after cortical

- injury in aged Rhesus monkeys. *GeroScience*, 42(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00115-w>
134. Goldie, B. J., Dun, M. D., Lin, M., Smith, N. D., Verrills, N. M., Dayas, C. V., & Cairns, M. J. (2014). Activity-associated miRNA are packaged in Map1b-enriched exosomes released from depolarized neurons. *Nucleic acids research*, 42(14), 9195–9208. <https://doi.org/10.1093/nar/gku594>
135. González, M. A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Büscher, D., & Delgado, M. (2009). Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology*, 136(3), 978–989. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.11.041>
136. Gonzalez-King, H., García, N. A., Ontoria-Oviedo, I., Ciria, M., Montero, J. A., & Sepúlveda, P. (2017). Hypoxia Inducible Factor-1 α Potentiates Jagged 1-Mediated Angiogenesis by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 35(7), 1747–1759. <https://doi.org/10.1002/stem.2618>
137. Gonzalez-Usano, A., Cauli, O., Agusti, A., & Felipo, V. (2014). Pregnenolone sulfate restores the glutamate-nitric-oxide-cGMP pathway and extracellular GABA in cerebellum and learning and motor coordination in hyperammonemic rats. *ACS chemical neuroscience*, 5(2), 100–105. <https://doi.org/10.1021/cn400168y>
138. Grad, L. I., Fernando, S. M., & Cashman, N. R. (2015). From molecule to molecule and cell to cell: prion-like mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease*, 77, 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.02.009>
139. Grange, C., Tapparo, M., Bruno, S., Chatterjee, D., Quesenberry, P. J., Tetta, C., & Camussi, G. (2014). Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. *International journal of molecular medicine*, 33(5), 1055–1063. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1663>
140. Grau, E., Felipo, V., Miñana, M. D., & Grisolia, S. (1992). Treatment of hyperammonemia with carbamylglutamate in rats. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 15(3), 446–448. <https://doi.org/10.1002/hep.1840150315>
141. Grazioli, L., Alberti, D., Olivetti, L., Rigamonti, W., Codazzi, F., Matricardi, L., Fugazzola, C., & Chiesa, A. (2000). Congenital absence of portal vein with nodular regenerative hyperplasia of the liver. *European radiology*, 10(5), 820–825. <https://doi.org/10.1007/s003300051012>
142. Greve, J. W., Gouma, D. J., Soeters, P. B., & Burman, W. A. (1990). Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: a study with germ-free rats. *Gastroenterology*, 98(2), 478–485. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(90\)90841-n](https://doi.org/10.1016/0016-5085(90)90841-n)
143. Gröneweg, M., Quero, J. C., De Bruijn, I., Hartmann, I. J., Essink-bot, M. L., Hop, W. C., & Schalm, S. W. (1998). Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 28(1), 45–49. <https://doi.org/10.1002/hep.510280108>
144. Gross, J. C., Chaudhary, V., Bartscherer, K., & Boutros, M. (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nature cell biology*, 14(10), 1036–1045. <https://doi.org/10.1038/ncb2574>
145. Guay, C., Kruit, J. K., Rome, S., Menoud, V., Mulder, N. L., Jurdzinski, A., Mancarella, F., Sebastiani, G., Donda, A., Gonzalez, B. J., Jandus, C., Bouzakri, K., Pinget, M., Boitard, C., Romero, P., Dotta, F., & Regazzi, R. (2019). Lymphocyte-Derived Exosomal MicroRNAs Promote Pancreatic β Cell Death and May Contribute to Type 1 Diabetes Development. *Cell metabolism*, 29(2), 348–361.e6.

- <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.09.011>
146. Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V., & Agnati, L. F. (2010). Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 117(1), 1–4. <https://doi.org/10.1007/s00702-009-0288-8>
 147. Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V., & Agnati, L. F. (2010a). Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 117(1), 1–4. <https://doi.org/10.1007/s00702-009-0288-8>
 148. Guescini, M., Guidolin, D., Vallorani, L., Casadei, L., Gioacchini, A. M., Tibollo, P., Battistelli, M., Falcieri, E., Battistin, L., Agnati, L. F., & Stocchi, V. (2010). C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. *Experimental cell research*, 316(12), 1977–1984. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.04.006>
 149. Gulinelli, S., Salaro, E., Vuerich, M., Bozzato, D., Pizzirani, C., Bolognesi, G., Idzko, M., Di Virgilio, F., & Ferrari, D. (2012). IL-18 associates to microvesicles shed from human macrophages by a LPS/TLR-4 independent mechanism in response to P2X receptor stimulation. *European journal of immunology*, 42(12), 3334–3345. <https://doi.org/10.1002/eji.201142268>
 150. Gupta, A., & Pulliam, L. (2014). Exosomes as mediators of neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation*, 11, 68. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-68>
 151. Han, C., Xiong, N., Guo, X., Huang, J., Ma, K., Liu, L., Xia, Y., Shen, Y., Li, J., Jiang, H., Wang, L., Guo, S., Xu, X., Zhang, G., Liu, J., Cao, X., Zhang, Z., Lin, Z., & Wang, T. (2019). Exosomes from patients with Parkinson's disease are pathological in mice. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 97(9), 1329–1344. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01810-z>
 152. Han, D., Wu, C., Xiong, Q., Zhou, L., & Tian, Y. (2015). Anti-inflammatory Mechanism of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Rat Model of Spinal Cord Injury. *Cell biochemistry and biophysics*, 71(3), 1341–1347. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0354-1>
 153. Hanchar, H. J., Dodson, P. D., Olsen, R. W., Otis, T. S., & Wallner, M. (2005). Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABA(A) receptor activity. *Nature neuroscience*, 8(3), 339–345. <https://doi.org/10.1038/nn1398>
 154. Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of cell biology*, 97(2), 329–339. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>
 155. Harrell, C. R., Jovicic, N., Djonov, V., Arsenijevic, N., & Volarevic, V. (2019). Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes and Other Extracellular Vesicles as New Remedies in the Therapy of Inflammatory Diseases. *Cells*, 8(12), 1605. <https://doi.org/10.3390/cells8121605>
 156. Hasegawa, H., Thomas, H. J., Schooley, K., & Born, T. L. (2011). Native IL-32 is released from intestinal epithelial cells via a non-classical secretory pathway as a membrane-associated protein. *Cytokine*, 53(1), 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.09.002>
 157. Heino, T. J., & Hentunen, T. A. (2008). Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells. *Current stem cell research & therapy*, 3(2), 131–145. <https://doi.org/10.2174/157488808784223032>
 158. Héja, L., Barabás, P., Nyitrai, G., Kékesi, K. A., Lasztóczy, B., Toke, O., Tárkányi, G., Madsen, K., Schousboe, A., Dobolyi, A., Palkovits, M., & Kardos, J. (2009). Glutamate uptake triggers transporter-mediated GABA release from astrocytes. *PloS one*, 4(9), e7153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007153>

159. Héja, L., Nyitrai, G., Kékesi, O., Dobolyi, A., Szabó, P., Fiáth, R., Ulbert, I., Pál-Szente, B., Palkovits, M., & Kardos, J. (2012). Astrocytes convert network excitation to tonic inhibition of neurons. *BMC biology*, *10*, 26. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-26>
160. Heldring, N., Mäger, I., Wood, M. J., Le Blanc, K., & Andaloussi, S. E. (2015). Therapeutic Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles. *Human gene therapy*, *26*(8), 506–517. <https://doi.org/10.1089/hum.2015.072>
161. Hemler M. E. (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *6*(10), 801–811. <https://doi.org/10.1038/nrm1736>
162. Hermenegildo, C., Montoliu, C., Llansola, M., Muñoz, M. D., Gaztelu, J. M., Miñana, M. D., & Felipo, V. (1998). Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo. *The European journal of neuroscience*, *10*(10), 3201–3209. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00329.x>
163. Hernandez-Rabaza, V., Agusti, A., Cabrera-Pastor, A., Fustero, S., Delgado, O., Taoro-Gonzalez, L., Montoliu, C., Llansola, M., & Felipo, V. (2015). Sildenafil reduces neuroinflammation and restores spatial learning in rats with hepatic encephalopathy: underlying mechanisms. *Journal of neuroinflammation*, *12*, 195. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0420-7>
164. Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-González, L., Malaguarnera, M., Agustí, A., Llansola, M., & 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. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0505-y>
165. Hernandez-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Gonzalez-Usano, A., Agusti, A., Balzano, T., Llansola, M., & 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. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0549-z>
166. Hernandez-Viadel, M., Montoliu, C., Monfort, P., Canales, J. J., Erceg, S., Rowan, M., Ceccatelli, S., & 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. *Neurochemistry international*, *42*(7), 525–533. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(02\)00190-0](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(02)00190-0)
167. Hirsova, P., Ibrahim, S. H., Krishnan, A., Verma, V. K., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., Charlton, M. R., Shah, V. H., Malhi, H., & Gores, G. J. (2016). Lipid-Induced Signaling Causes Release of Inflammatory Extracellular Vesicles From Hepatocytes. *Gastroenterology*, *150*(4), 956–967. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.12.037>
168. Hocking, A. M., & Gibran, N. S. (2010). Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Experimental cell research*, *316*(14), 2213–2219. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.05.009>
169. Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplod, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., Zhang, T., ... Lyden, D. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, *527*(7578), 329–335. <https://doi.org/10.1038/nature15756>

170. Hosseini Shamili, F., Alibolandi, M., Rafatpanah, H., Abnous, K., Mahmoudi, M., Kalantari, M., Taghdisi, S. M., & Ramezani, M. (2019). Immunomodulatory properties of MSC-derived exosomes armed with high affinity aptamer toward myelin as a platform for reducing multiple sclerosis clinical score. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 299, 149–164. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.032>
171. Hosseinkhani, B., Kuypers, S., van den Akker, N., Molin, D., & Michiels, L. (2018). Extracellular Vesicles Work as a Functional Inflammatory Mediator Between Vascular Endothelial Cells and Immune Cells. *Frontiers in immunology*, 9, 1789. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01789>
172. Hovens, I. B., Schoemaker, R. G., van der Zee, E. A., Absalom, A. R., Heineman, E., & van Leeuwen, B. L. (2014). Postoperative cognitive dysfunction: Involvement of neuroinflammation and neuronal functioning. *Brain, behavior, and immunity*, 38, 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.02.002>
173. Huang, X., Yuan, T., Tschannen, M., Sun, Z., Jacob, H., Du, M., Liang, M., Dittmar, R. L., Liu, Y., Liang, M., Kohli, M., Thibodeau, S. N., Boardman, L., & Wang, L. (2013). Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC genomics*, 14, 319. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-319>
174. Huber, V., Fais, S., Iero, M., Lugini, L., Canese, P., Squarcina, P., Zaccheddu, A., Colone, M., Arancia, G., Gentile, M., Seregini, E., Valenti, R., Ballabio, G., Belli, F., Leo, E., Parmiani, G., & Rivoltini, L. (2005). Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology*, 128(7), 1796–1804. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.03.045>
175. Ibrahim, S. H., Hirsova, P., Tomita, K., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., Harrison, S. A., Goodfellow, V. S., Malhi, H., & Gores, G. J. (2016). Mixed lineage kinase 3 mediates release of C-X-C motif ligand 10-bearing chemotactic extracellular vesicles from lipotoxic hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 63(3), 731–744. <https://doi.org/10.1002/hep.28252>
176. Islam, A., Choudhury, M. E., Kigami, Y., Utsunomiya, R., Matsumoto, S., Watanabe, H., Kumon, Y., Kunieda, T., Yano, H., & Tanaka, J. (2018). Sustained anti-inflammatory effects of TGF- β 1 on microglia/macrophages. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1864(3), 721–734. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.12.022>
177. Ismail, N., Wang, Y., Dakhllallah, D., Moldovan, L., Agarwal, K., Batte, K., Shah, P., Wisler, J., Eubank, T. D., Tridandapani, S., Paulaitis, M. E., Piper, M. G., & Marsh, C. B. (2013). Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood*, 121(6), 984–995. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374793>
178. Isola, A. L., & Chen, S. (2017). Exosomes: The Messengers of Health and Disease. *Current neuropharmacology*, 15(1), 157–165. <https://doi.org/10.2174/1570159x14666160825160421>
179. Jiang, M., Wang, H., Jin, M., Yang, X., Ji, H., Jiang, Y., Zhang, H., Wu, F., Wu, G., Lai, X., Cai, L., Hu, R., Xu, L., & Li, L. (2018). Exosomes from MiR-30d-5p-ADSCs Reverse Acute Ischemic Stroke-Induced, Autophagy-Mediated Brain Injury by Promoting M2 Microglial/Macrophage Polarization. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 47(2), 864–878. <https://doi.org/10.1159/000490078>
180. Jiang, M., Wang, H., Jin, M., Yang, X., Ji, H., Jiang, Y., Zhang, H., Wu, F., Wu, G., Lai, X., Cai, L., Hu, R., Xu, L., & Li, L. (2018). Exosomes from MiR-30d-5p-ADSCs Reverse

- Acute Ischemic Stroke-Induced, Autophagy-Mediated Brain Injury by Promoting M2 Microglial/Macrophage Polarization. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 47(2), 864–878. <https://doi.org/10.1159/000490078>
181. Johansson, M., Agusti, A., Llansola, M., Montoliu, C., Strömberg, J., Malinina, E., Ragagnin, G., Doverskog, M., Bäckström, T., & Felipo, V. (2015). GR3027 antagonizes GABAA receptor-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(5), G400–G409. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00073.2015>
 182. Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of biological chemistry*, 262(19), 9412–9420.
 183. Jones, E. A., & Weissenborn, K. (1997). Neurology and the liver. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 63(3), 279–293. <https://doi.org/10.1136/jnnp.63.3.279>
 184. Jover, R., Compañ, L., Gutiérrez, A., Zapater, P., Pérez-Serra, J., Girona, E., Aparicio, J. R., & Pérez-Mateo, M. (2003). Minimal hepatic encephalopathy and extrapyramidal signs in patients with cirrhosis. *The American journal of gastroenterology*, 98(7), 1599–1604. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2003.07528.x>
 185. Jover, R., Rodrigo, R., Felipo, V., Insausti, R., Sáez-Valero, J., García-Ayllón, M. S., Suárez, I., Candela, A., Compañ, A., Esteban, A., Cauli, O., Ausó, E., Rodríguez, E., Gutiérrez, A., Girona, E., Erceg, S., Berbel, P., & Pérez-Mateo, M. (2006). Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(6), 1257–1266. <https://doi.org/10.1002/hep.21180>
 186. Kajimoto, T., Okada, T., Miya, S., Zhang, L., & Nakamura, S. (2013). Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nature communications*, 4, 2712. <https://doi.org/10.1038/ncomms3712>
 187. Kalinina, N. I., Sysoeva, V. Y., Rubina, K. A., Parfenova, Y. V., & Tkachuk, V. A. (2011). Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair. *Acta naturae*, 3(4), 30–37.
 188. Kalra, H., Drummen, G. P., & Mathivanan, S. (2016). Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *International journal of molecular sciences*, 17(2), 170. <https://doi.org/10.3390/ijms17020170>
 189. Kandere-Grzybowska, K., Letourneau, R., Kempuraj, D., Donelan, J., Poplawski, S., Boucher, W., Athanassiou, A., & Theoharides, T. C. (2003). IL-1 induces vesicular secretion of IL-6 without degranulation from human mast cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(9), 4830–4836. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.9.4830>
 190. Kang, X., Zuo, Z., Hong, W., Tang, H., & Geng, W. (2019). Progress of Research on Exosomes in the Protection Against Ischemic Brain Injury. *Frontiers in neuroscience*, 13, 1149. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01149>
 191. Kawaguchi, T., Suzuki, F., Imamura, M., Murashima, N., Yanase, M., Mine, T., Fujisawa, M., Sato, I., Yoshiji, H., Okita, K., & Suzuki, K. (2019). Rifaximin-altered gut microbiota components associated with liver/neuropsychological functions in patients with hepatic encephalopathy: An exploratory data analysis of phase II/III clinical trials. *Hepatology research: the official journal of the Japan Society of Hepatology*, 49(4), 404–418. <https://doi.org/10.1111/hepr.13300>

192. Kim, H. S., Shin, T. H., Lee, B. C., Yu, K. R., Seo, Y., Lee, S., Seo, M. S., Hong, I. S., Choi, S. W., Seo, K. W., Núñez, G., Park, J. H., & Kang, K. S. (2013). Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells reduce colitis in mice by activating NOD2 signaling to COX2. *Gastroenterology*, *145*(6), 1392–403.e4038. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.08.033>
193. Kimura, K., Hohjoh, H., Fukuoka, M., Sato, W., Oki, S., Tomi, C., Yamaguchi, H., Kondo, T., Takahashi, R., & Yamamura, T. (2018). Circulating exosomes suppress the induction of regulatory T cells via let-7i in multiple sclerosis. *Nature communications*, *9*(1), 17. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02406-2>
194. Kirkham, A. M., Monaghan, M., Bailey, A., Shorr, R., Lalu, M. M., Fergusson, D. A., & Allan, D. S. (2021). Mesenchymal stromal cells as a therapeutic intervention for COVID-19: a living systematic review and meta-analysis protocol. *Systematic reviews*, *10*(1), 249. <https://doi.org/10.1186/s13643-021-01803-5>
195. Klibi, J., Niki, T., Riedel, A., Pioche-Durieu, C., Souquere, S., Rubinstein, E., Le Moulec, S., Guigay, J., Hirashima, M., Guemira, F., Adhikary, D., Mautner, J., & Busson, P. (2009). Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood*, *113*(9), 1957–1966. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-142596>
196. Kogure, T., Yan, I. K., Lin, W. L., & Patel, T. (2013). Extracellular Vesicle-Mediated Transfer of a Novel Long Noncoding RNA TUC339: A Mechanism of Intercellular Signaling in Human Hepatocellular Cancer. *Genes & cancer*, *4*(7-8), 261–272. <https://doi.org/10.1177/1947601913499020>
197. Kong, Q. F., Sun, B., Bai, S. S., Zhai, D. X., Wang, G. Y., Liu, Y. M., Zhang, S. J., Li, R., Zhao, W., Sun, Y. Y., Li, N., Wang, Q., Peng, H. S., Jin, L. H., & Li, H. L. (2009). Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF-beta. *Journal of neuroimmunology*, *207*(1-2), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.12.005>
198. Koppers-Lalic, D., Hackenberg, M., Bijnsdorp, I. V., van Eijndhoven, M., Sadek, P., Sie, D., Zini, N., Middeldorp, J. M., Ylstra, B., de Menezes, R. X., Würdinger, T., Meijer, G. A., & Pegtel, D. M. (2014). Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell reports*, *8*(6), 1649–1658. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.027>
199. Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., & Ochiya, T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *The Journal of biological chemistry*, *285*(23), 17442–17452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.107821>
200. Kosenko, E., Kaminsky, Y., Grau, E., Miñana, M. D., Marcaida, G., Grisolia, S., & 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. *Journal of neurochemistry*, *63*(6), 2172–2178. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63062172.x>
201. Kountouras, J., Billing, B. H., & Scheuer, P. J. (1984). Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *British journal of experimental pathology*, *65*(3), 305–311.
202. Krämer-Albers, E. M., Bretz, N., Tenzer, S., Winterstein, C., Möbius, W., Berger, H., Nave, K. A., Schild, H., & Trotter, J. (2007). Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons?. *Proteomics. Clinical applications*, *1*(11), 1446–1461.

- <https://doi.org/10.1002/prca.200700522>
203. Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., Hemming, F. J., Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Haase, G., Goldberg, Y., & Sadoul, R. (2011). Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Molecular and cellular neurosciences*, 46(2), 409–418. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.11.004>
204. Laulagnier, K., Grand, D., Dujardin, A., Hamdi, S., Vincent-Schneider, H., Lankar, D., Salles, J. P., Bonnerot, C., Perret, B., & Record, M. (2004). PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes. *FEBS letters*, 572(1-3), 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.082>
205. Lawrence, K. R., & Klee, J. A. (2008). Rifaximin for the treatment of hepatic encephalopathy. *Pharmacotherapy*, 28(8), 1019–1032. <https://doi.org/10.1592/phco.28.8.1019>
206. Lazarus, H. M., Haynesworth, S. E., Gerson, S. L., Rosenthal, N. S., & Caplan, A. I. (1995). Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone marrow transplantation*, 16(4), 557–564.
207. Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Götherström, C., Hassan, M., Uzunel, M., & Ringdén, O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet (London, England)*, 363(9419), 1439–1441. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16104-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16104-7)
208. Lee, J. Y., Park, J. K., Lee, E. Y., Lee, E. B., & Song, Y. W. (2016). Circulating exosomes from patients with systemic lupus erythematosus induce an proinflammatory immune response. *Arthritis research & therapy*, 18(1), 264. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1159-y>
209. Lee, R. H., Seo, M. J., Reger, R. L., Spees, J. L., Pulin, A. A., Olson, S. D., & Prockop, D. J. (2006). Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), 17438–17443. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608249103>
210. Lee, T. H., Chennakrishnaiah, S., Audemard, E., Montermini, L., Meehan, B., & Rak, J. (2014). Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 451(2), 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.109>
211. Leevy, C. B., & Phillips, J. A. (2007). Hospitalizations during the use of rifaximin versus lactulose for the treatment of hepatic encephalopathy. *Digestive diseases and sciences*, 52(3), 737–741. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9442-4>
212. Li, J. J., Wang, B., Kodali, M. C., Chen, C., Kim, E., Patters, B. J., Lan, L., Kumar, S., Wang, X., Yue, J., & Liao, F. F. (2018). In vivo evidence for the contribution of peripheral circulating inflammatory exosomes to neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation*, 15(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-1038-8>
213. Li, T., Yan, Y., Wang, B., Qian, H., Zhang, X., Shen, L., Wang, M., Zhou, Y., Zhu, W., Li, W., & Xu, W. (2013). Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem cells and development*, 22(6), 845–854. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0395>
214. Li, Y., Wang, F., Guo, R., Zhang, Y., Chen, D., Li, X., Tian, W., Xie, X., & Jiang, Z. (2019). Exosomal sphingosine 1-phosphate secreted by mesenchymal stem cells regulated Treg/Th17 balance in aplastic anemia. *IUBMB life*, 71(9), 1284–1292. <https://doi.org/10.1002/iub.2035>

215. Li, Y., Yang, Y. Y., Ren, J. L., Xu, F., Chen, F. M., & Li, A. (2017). Exosomes secreted by stem cells from human exfoliated deciduous teeth contribute to functional recovery after traumatic brain injury by shifting microglia M1/M2 polarization in rats. *Stem cell research & therapy*, 8(1), 198. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0648-5>
216. Li, Z., Liu, F., He, X., Yang, X., Shan, F., & Feng, J. (2019). Exosomes derived from mesenchymal stem cells attenuate inflammation and demyelination of the central nervous system in EAE rats by regulating the polarization of microglia. *International immunopharmacology*, 67, 268–280. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.12.001>
217. Liew, L. C., Katsuda, T., Gailhouste, L., Nakagama, H., & Ochiya, T. (2017). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: a glimmer of hope in treating Alzheimer's disease. *International immunology*, 29(1), 11–19. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx002>
218. Lin, Y. H., Liang, H. Y., Xu, K., Ni, H. Y., Dong, J., Xiao, H., Chang, L., Wu, H. Y., Li, F., Zhu, D. Y., & Luo, C. X. (2018). Dissociation of nNOS from PSD-95 promotes functional recovery after cerebral ischaemia in mice through reducing excessive tonic GABA release from reactive astrocytes. *The Journal of pathology*, 244(2), 176–188. <https://doi.org/10.1002/path.4999>
219. Liu, Q., Xiang, Y., Yuan, S., Xie, W., Li, C., Hu, Z., Wu, N., Wu, L., Yu, Z., Bai, L., & Li, Y. (2018). Plasma exosome levels in non-small-cell lung cancer: Correlation with clinicopathological features and prognostic implications. *Cancer biomarkers: section A of Disease markers*, 22(2), 267–274. <https://doi.org/10.3233/CBM-170955>
220. Lopes Pinheiro, M. A., Kooij, G., Mizee, M. R., Kamermans, A., Enzmann, G., Lyck, R., Schwaninger, M., Engelhardt, B., & de Vries, H. E. (2016). Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke. *Biochimica et biophysica acta*, 1862(3), 461–471. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.018>
221. Lopez-Verrilli, M. A., & Court, F. A. (2012). Transfer of vesicles from schwann cells to axons: a novel mechanism of communication in the peripheral nervous system. *Frontiers in physiology*, 3, 205. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00205>
222. Lopez-Verrilli, M. A., Picou, F., & Court, F. A. (2013). Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system. *Glia*, 61(11), 1795–1806. <https://doi.org/10.1002/glia.22558>
223. Lou, G., Chen, Z., Zheng, M., & Liu, Y. (2017). Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. *Experimental & molecular medicine*, 49(6), e346. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.63>
224. Lu, X., Wang, X., Nian, H., Yang, D., & Wei, R. (2017). Mesenchymal stem cells for treating autoimmune dacryoadenitis. *Stem cell research & therapy*, 8(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0593-3>
225. MacKenzie, A., Wilson, H. L., Kiss-Toth, E., Dower, S. K., North, R. A., & Surprenant, A. (2001). Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity*, 15(5), 825–835. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00229-1](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00229-1)
226. Malaguarnera, M., Llansola, M., Balzano, T., Gómez-Giménez, B., Antúnez-Muñoz, C., Martínez-Alarcón, N., Mahdinia, R., & Felipo, V. (2019). Bicuculline Reduces Neuroinflammation in Hippocampus and Improves Spatial Learning and Anxiety in Hyperammonemic Rats. Role of Glutamate Receptors. *Frontiers in pharmacology*, 10, 132. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00132>
227. Manakeng, K., Prasertphol, P., Phongpao, K., Chuncharunee, S., Tanyong, D., Worawichawong, S., Svasti, S., & Chaichompoo, P. (2019). Elevated levels of platelet- and

- red cell-derived extracellular vesicles in transfusion-dependent β -thalassemia/HbE patients with pulmonary arterial hypertension. *Annals of hematology*, 98(2), 281–288. <https://doi.org/10.1007/s00277-018-3518-z>
228. Mangas-Losada, A., García-García, R., Urios, A., Escudero-García, D., Tosca, J., Giner-Durán, R., Serra, M. A., Montoliu, C., & Felipo, V. (2017). Minimal hepatic encephalopathy is associated with expansion and activation of CD⁴⁺CD28⁻, Th22 and Tfh and B lymphocytes. *Scientific reports*, 7(1), 6683. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05938-1>
229. Mangas-Losada, A., García-García, R., Leone, P., Ballester, M. P., Cabrera-Pastor, A., Urios, A., Gallego, J. J., Martínez-Pretel, J. J., Giménez-Garzó, C., Revert, F., Escudero-García, D., Tosca, J., Ríos, M. P., Montón, C., Durbán, L., Aparicio, L., Montoliu, C., & Felipo, V. (2019). Selective improvement by rifaximin of changes in the immunophenotype in patients who improve minimal hepatic encephalopathy. *Journal of translational medicine*, 17(1), 293. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2046-5>
230. Mao, F., Wu, Y., Tang, X., Kang, J., Zhang, B., Yan, Y., Qian, H., Zhang, X., & Xu, W. (2017). Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Relieve Inflammatory Bowel Disease in Mice. *BioMed research international*, 2017, 5356760. <https://doi.org/10.1155/2017/5356760>
231. Marcaggi, P., & Coles, J. A. (2001). Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Progress in neurobiology*, 64(2), 157–183. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(00\)00043-5](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(00)00043-5)
232. Marchi, M., & Raiteri, M. (1996). Nicotinic autoreceptors mediating enhancement of acetylcholine release become operative in conditions of "impaired" cholinergic presynaptic function. *Journal of neurochemistry*, 67(5), 1974–1981. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67051974.x>
233. Martinez-Hernandez, A., Bell, K. P., & Norenberg, M. D. (1977). Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science (New York, N.Y.)*, 195(4284), 1356–1358. <https://doi.org/10.1126/science.14400>
234. Martín-Rufino, J. D., Espinosa-Lara, N., Osugui, L., & Sanchez-Guijo, F. (2019). Targeting the Immune System With Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles: What Is the Cargo's Mechanism of Action?. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 308. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00308>
235. Marzesco, A. M., Janich, P., Wilsch-Bräuninger, M., Dubreuil, V., Langenfeld, K., Corbeil, D., & Huttner, W. B. (2005). Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *Journal of cell science*, 118(Pt 13), 2849–2858. <https://doi.org/10.1242/jcs.02439>
236. Mechtcheriakov, S., Graziadei, I. W., Rettenbacher, M., Schuster, I., Hinterhuber, H., Vogel, W., & Marksteiner, J. (2005). Diagnostic value of fine motor deficits in patients with low-grade hepatic encephalopathy. *World journal of gastroenterology*, 11(18), 2777–2780. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i18.2777>
237. Melo, S. A., Luecke, L. B., Kahlert, C., Fernandez, A. F., Gammon, S. T., Kaye, J., LeBleu, V. S., Mittendorf, E. A., Weitz, J., Rahbari, N., Reissfelder, C., Pilarsky, C., Fraga, M. F., Piwnicka-Worms, D., & Kalluri, R. (2015). Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*, 523(7559), 177–182. <https://doi.org/10.1038/nature14581>
238. Méndez, M., Méndez-López, M., López, L., Aller, M. A., Arias, J., Cimadevilla, J. M., & Arias, J. L. (2008a). Spatial memory alterations in three models of hepatic encephalopathy. *Behavioural brain research*, 188(1), 32–40.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.10.019>
239. Mendt, M., Rezvani, K., & Shpall, E. (2019). Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. *Bone marrow transplantation*, *54*(Suppl 2), 789–792. <https://doi.org/10.1038/s41409-019-0616-z>
240. Michalak, A., & Butterworth, R. F. (1997). Selective increases of extracellular brain concentrations of aromatic and branched-chain amino acids in relation to deterioration of neurological status in acute (ischemic) liver failure. *Metabolic brain disease*, *12*(4), 259–269. <https://doi.org/10.1007/BF02674670>
241. Miksa, M., Wu, R., Dong, W., Komura, H., Amin, D., Ji, Y., Wang, Z., Wang, H., Ravikumar, T. S., Tracey, K. J., & Wang, P. (2009). Immature dendritic cell-derived exosomes rescue septic animals via milk fat globule epidermal growth factor-factor VIII [corrected]. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *183*(9), 5983–5990. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802994>
242. Miñana, M. D., Felipo, V., & Grisolia, S. (1988a). Protective effect of long term ammonium ingestion against acute ammonium intoxication. *Biochemical and biophysical research communications*, *153*(3), 979–983. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(88\)81324-x](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(88)81324-x)
243. Miñana, M. D., Felipo, V., Wallace, R., & Grisolia, S. (1988b). High ammonia levels in brain induce tubulin in cerebrum but not in cerebellum. *Journal of neurochemistry*, *51*(6), 1839–1842. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb01165.x>
244. Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M. Á., Bernad, A., & Sánchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature communications*, *2*, 282. <https://doi.org/10.1038/ncomms1285>
245. Momen-Heravi, F., Saha, B., Kodys, K., Catalano, D., Satishchandran, A., & Szabo, G. (2015). Increased number of circulating exosomes and their microRNA cargos are potential novel biomarkers in alcoholic hepatitis. *Journal of translational medicine*, *13*, 261. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0623-9>
246. Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M. A., del Olmo, J. A., Urios, A., Rodrigo, J. M., & Felipo, V. (2009). IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *Journal of clinical gastroenterology*, *43*(3), 272–279. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31815e7f58>
247. Montoliu, C., Llansola, M., Felipo, V. (2015) Neuroinflammation and neurological alterations in chronic liver diseases. *Neuroimmunol Neuroinflammation*, *2*:138-44. <http://dx.doi.org/10.4103/2347-8659.160845>
248. Morad, G., Carman, C. V., Hagedorn, E. J., Perlin, J. R., Zon, L. I., Mustafaoglu, N., Park, T. E., Ingber, D. E., Daisy, C. C., & Moses, M. A. (2019). Tumor-Derived Extracellular Vesicles Breach the Intact Blood-Brain Barrier via Transcytosis. *ACS nano*, *13*(12), 13853–13865. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04397>
249. Morelli, A. E., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Sullivan, M. L., Stolz, D. B., Papworth, G. D., Zahorchak, A. F., Logar, A. J., Wang, Z., Watkins, S. C., Falo, L. D., Jr, & Thomson, A. W. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, *104*(10), 3257–3266. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0824>
250. Moser H. (1987). Electrophysiological evidence for ammonium as a substitute for potassium in activating the sodium pump in a crayfish sensory neuron. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, *65*(2), 141–145. <https://doi.org/10.1139/y87-028>
251. Msall, M., Batshaw, M. L., Suss, R., Brusilow, S. W., & Mellits, E. D. (1984). Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. Outcome of urea-cycle

- enzymopathies. *The New England journal of medicine*, 310(23), 1500–1505. <https://doi.org/10.1056/NEJM198406073102304>
252. Mullen, K. D., Sanyal, A. J., Bass, N. M., Poordad, F. F., Sheikh, M. Y., Frederick, R. T., Bortey, E., & Forbes, W. P. (2014). Rifaximin is safe and well tolerated for long-term maintenance of remission from overt hepatic encephalopathy. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 12(8), 1390–7.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.12.021>
253. Muotri, A. R., Chu, V. T., Marchetto, M. C., Deng, W., Moran, J. V., & Gage, F. H. (2005). Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature*, 435(7044), 903–910. <https://doi.org/10.1038/nature03663>
254. Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., & D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Current biology: CB*, 19(22), 1875–1885. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.059>
255. Murta, V., & Ferrari, C. (2016). Peripheral Inflammation and Demyelinating Diseases. *Advances in experimental medicine and biology*, 949, 263–285. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40764-7_13
256. Nabhan, J. F., Hu, R., Oh, R. S., Cohen, S. N., & Lu, Q. (2012). Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(11), 4146–4151. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200448109>
257. Näslund, T. I., Paquin-Proulx, D., Paredes, P. T., Vallhov, H., Sandberg, J. K., & Gabrielsson, S. (2014). Exosomes from breast milk inhibit HIV-1 infection of dendritic cells and subsequent viral transfer to CD4+ T cells. *AIDS (London, England)*, 28(2), 171–180. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000159>
258. National Library of Medicine (U.S.). (2017, December -). *Allogenic Mesenchymal Stem Cell Derived Exosome in Patients With Acute Ischemic Stroke*. ClinicalTrials.gov Identifier NCT03384433. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03384433>
259. Nazarenko, I., Rana, S., Baumann, A., McAlear, J., Hellwig, A., Trendelenburg, M., Lochnit, G., Preissner, K. T., & Zöller, M. (2010). Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer research*, 70(4), 1668–1678. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2470>
260. Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P. G., Leelahavanichkul, K., Koller, B. H., Brown, J. M., Hu, X., Jelinek, I., Star, R. A., & Mezey, E. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature medicine*, 15(1), 42–49. <https://doi.org/10.1038/nm.1905>
261. Noh, M. Y., Lim, S. M., Oh, K. W., Cho, K. A., Park, J., Kim, K. S., Lee, S. J., Kwon, M. S., & Kim, S. H. (2016). Mesenchymal Stem Cells Modulate the Functional Properties of Microglia via TGF- β Secretion. *Stem cells translational medicine*, 5(11), 1538–1549. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0217>
262. Norenberg, M. D., & Martinez-Hernandez, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain research*, 161(2), 303–310. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90071-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90071-4)
263. Obregon, C., Rothen-Rutishauser, B., Gerber, P., Gehr, P., & Nicod, L. P. (2009). Active uptake of dendritic cell-derived exovesicles by epithelial cells induces the release of

- inflammatory mediators through a TNF-alpha-mediated pathway. *The American journal of pathology*, 175(2), 696–705. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080716>
264. Odeh, M., Sabo, E., Srugo, I., & Oliven, A. (2004). Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 24(2), 110–116. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2004.0894.x>
265. Ohara, M., Ohnishi, S., Hosono, H., Yamamoto, K., Yuyama, K., Nakamura, H., Fu, Q., Maehara, O., Suda, G., & Sakamoto, N. (2018). Extracellular Vesicles from Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Hepatic Inflammation and Fibrosis in Rats. *Stem cells international*, 2018, 3212643. <https://doi.org/10.1155/2018/3212643>
266. Okoye, I. S., Coomes, S. M., Pelly, V. S., Czieso, S., Papayannopoulos, V., Tolmachova, T., Seabra, M. C., & Wilson, M. S. (2014). MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells. *Immunity*, 41(1), 89–103. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.019>
267. Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C. F., Schauer, K., Hume, A. N., Freitas, R. P., Goud, B., Benaroch, P., Hacohen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M. C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L. F., & Thery, C. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature cell biology*, 12(1), 19–13. <https://doi.org/10.1038/ncb2000>
268. Otero-Ortega, L., Gómez de Frutos, M. C., Laso-García, F., Rodríguez-Frutos, B., Medina-Gutiérrez, E., López, J. A., Vázquez, J., Díez-Tejedor, E., & Gutiérrez-Fernández, M. (2018). Exosomes promote restoration after an experimental animal model of intracerebral hemorrhage. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 38(5), 767–779. <https://doi.org/10.1177/0271678X17708917> (Retraction published J Cereb Blood Flow Metab. 2021 Jul;41(7):1794)
269. Palmisano, G., Jensen, S. S., Le Bihan, M. C., Lainé, J., McGuire, J. N., Pociot, F., & Larsen, M. R. (2012). Characterization of membrane-shed microvesicles from cytokine-stimulated β -cells using proteomics strategies. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 11(8), 230–243. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.012732>
270. Pan, B. T., & Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 33(3), 967–978. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5)
271. Pardo, F., Villalobos-Labra, R., Sobrevia, B., Toledo, F., & Sobrevia, L. (2018). Extracellular vesicles in obesity and diabetes mellitus. *Molecular aspects of medicine*, 60, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.010>
272. Paul, F., Müller, J., Christe, W., Steinmüller, T., Poewe, W., & Wissel, J. (2004). Postural hand tremor before and following liver transplantation and immunosuppression with cyclosporine or tacrolimus in patients without clinical signs of hepatic encephalopathy. *Clinical transplantation*, 18(4), 429–433. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2004.00184.x>
273. Periyasamy, P., Liao, K., Kook, Y. H., Niu, F., Callen, S. E., Guo, M. L., & Buch, S. (2018). Cocaine-Mediated Downregulation of miR-124 Activates Microglia by Targeting KLF4 and TLR4 Signaling. *Molecular neurobiology*, 55(4), 3196–3210. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0584-5>
274. Pitt, J. M., Charrier, M., Viaud, S., André, F., Besse, B., Chaput, N., & Zitvogel, L. (2014). Dendritic cell-derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 193(3), 1006–1011.

- <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400703>
275. Pizzirani, C., Ferrari, D., Chiozzi, P., Adinolfi, E., Sandonà, D., Savaglio, E., & Di Virgilio, F. (2007). Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1beta-loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood*, *109*(9), 3856–3864. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-031377>
276. Poh, Z., & Chang, P. E. (2012). A current review of the diagnostic and treatment strategies of hepatic encephalopathy. *International journal of hepatology*, *2012*, 480309. <https://doi.org/10.1155/2012/480309>
277. Pols, M. S., & Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental cell research*, *315*(9), 1584–1592. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.020>
278. Poncelet, A. J., Vercruysse, J., Saliez, A., & Gianello, P. (2007). Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. *Transplantation*, *83*(6), 783–790. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000258649.23081.a3>
279. Potolicchio, I., Carven, G. J., Xu, X., Stipp, C., Riese, R. J., Stern, L. J., & Santambrogio, L. (2005). Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *175*(4), 2237–2243. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.4.2237>
280. Prada, I., Amin, L., Furlan, R., Legname, G., Verderio, C., & Cojoc, D. (2016). A new approach to follow a single extracellular vesicle-cell interaction using optical tweezers. *BioTechniques*, *60*(1), 35–41. <https://doi.org/10.2144/000114371>
281. Prada, I., Gabrielli, M., Turola, E., Iorio, A., D'Arrigo, G., Parolisi, R., De Luca, M., Pacifici, M., Bastoni, M., Lombardi, M., Legname, G., Cojoc, D., Buffo, A., Furlan, R., Peruzzi, F., & Verderio, C. (2018). Glia-to-neuron transfer of miRNAs via extracellular vesicles: a new mechanism underlying inflammation-induced synaptic alterations. *Acta neuropathologica*, *135*(4), 529–550. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1803-x>
282. Prasad, S., Dhiman, R. K., Duseja, A., Chawla, Y. K., Sharma, A., & Agarwal, R. (2007). Lactulose improves cognitive functions and health-related quality of life in patients with cirrhosis who have minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *45*(3), 549–559. <https://doi.org/10.1002/hep.21533>
283. Puca, F. M., Antonaci, F., Panella, C., Guglielmi, F. W., Barone, M., Francavilla, A., & Cerutti, R. (1989). Psychomotor dysfunctions in alcoholic and post-necrotic cirrhotic patients without overt encephalopathy. *Acta neurologica Scandinavica*, *79*(4), 280–287. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1989.tb03785.x>
284. Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G., & Dubyak, G. R. (2007). Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *179*(3), 1913–1925. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1913>
285. Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T. R., Keller, P., Geiger, K. D., Verkade, P., & Simons, K. (2006). Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(30), 11172–11177. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603838103>
286. Ramirez, M., Fernandez, R., & Malnic, G. (1999). Permeation of NH₃/NH₄⁺ and cell pH in colonic crypts of the rat. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, *438*(4), 508–515. <https://doi.org/10.1007/s004249900077>

287. Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of experimental medicine*, 183(3), 1161–1172. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
288. Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., & Ratajczak, M. Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*, 20(9), 1487–1495. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404296>
289. Record, M., Carayon, K., Poirot, M., & Silvente-Poirot, S. (2014). Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochimica et biophysica acta*, 1841(1), 108–120. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.10.004>
290. Regmi, S., Pathak, S., Kim, J. O., Yong, C. S., & Jeong, J. H. (2019). Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges, opportunities, and future perspectives. *European journal of cell biology*, 98(5-8), 151041. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2019.04.002>
291. Rehnström, S., Simert, G., Hansson, J. A., Johnson, G., & Vang, J. (1977). Chronic hepatic encephalopathy. A psychometrical study. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 12(3), 305–311. <https://doi.org/10.3109/00365527709180932>
292. Reza-Zaldivar, E. E., Hernández-Sapiéns, M. A., Gutiérrez-Mercado, Y. K., Sandoval-Ávila, S., Gomez-Pinedo, U., Márquez-Aguirre, A. L., Vázquez-Méndez, E., Padilla-Camberos, E., & Canales-Aguirre, A. A. (2019). Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote neurogenesis and cognitive function recovery in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neural regeneration research*, 14(9), 1626–1634. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.255978>
293. Riazifar, M., Mohammadi, M. R., Pone, E. J., Yeri, A., Lässer, C., Segaliny, A. I., McIntyre, L. L., Shelke, G. V., Hutchins, E., Hamamoto, A., Calle, E. N., Crescitelli, R., Liao, W., Pham, V., Yin, Y., Jayaraman, J., Lakey, J., Walsh, C. M., Van Keuren-Jensen, K., Lotvall, J., ... Zhao, W. (2019). Stem Cell-Derived Exosomes as Nanotherapeutics for Autoimmune and Neurodegenerative Disorders. *ACS nano*, 13(6), 6670–6688. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b01004>
294. Ridder, K., Keller, S., Dams, M., Rupp, A. K., Schlaudraff, J., Del Turco, D., Starmann, J., Macas, J., Karpova, D., Devraj, K., Depboylu, C., Landfried, B., Arnold, B., Plate, K. H., Höglinger, G., Sülthmann, H., Altevogt, P., & Momma, S. (2014). Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation. *PLoS biology*, 12(6), e1001874. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001874>
295. Rodrigo, R., Jover, R., Candela, A., Compañ, A., Sáez-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(2), 435–443.
296. Rodrigo, R., & Felipo, V. (2007). Control of brain glutamine synthesis by NMDA receptors. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 12, 883–890. <https://doi.org/10.2741/2110>
297. Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez-Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Garcia-Verdugo, J. M., & Felipo, V. (2010). Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, 139(2), 675–684. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.03.040>

298. Romero-Gómez, M., Boza, F., García-Valdecasas, M. S., García, E., & Aguilar-Reina, J. (2001). Subclinical hepatic encephalopathy predicts the development of overt hepatic encephalopathy. *The American journal of gastroenterology*, *96*(9), 2718–2723. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.04130.x>
299. Roughneen, P. T., Gouma, D. J., Kulkarni, A. D., Fanslow, W. F., & Rowlands, B. J. (1986). Impaired specific cell-mediated immunity in experimental biliary obstruction and its reversibility by internal biliary drainage. *The Journal of surgical research*, *41*(2), 113–125. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(86\)90016-8](https://doi.org/10.1016/0022-4804(86)90016-8)
300. Rummel, C., Sachot, C., Poole, S., & Luheshi, G. N. (2006). Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, *291*(5), R1316–R1326. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00301.2006>
301. Runyon B. A. (2011). A Primer on Detecting Cirrhosis and Caring for These Patients without Causing Harm. *International journal of hepatology*, *2011*, 801983. <https://doi.org/10.4061/2011/801983>
302. Saini, C., Ramesh, V., & Nath, I. (2014). Increase in TGF- β secreting CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. *PLoS neglected tropical diseases*, *8*(1), e2639. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002639>
303. Saman, S., Lee, N. C., Inoyo, I., Jin, J., Li, Z., Doyle, T., McKee, A. C., & Hall, G. F. (2014). Proteins recruited to exosomes by tau overexpression implicate novel cellular mechanisms linking tau secretion with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, *40 Suppl 1*(Suppl 1), S47–S70. <https://doi.org/10.3233/JAD-132135>
304. Sanderson, D. J., Good, M. A., Skelton, K., Sprengel, R., Seeburg, P. H., Rawlins, J. N., & Bannerman, D. M. (2009). Enhanced long-term and impaired short-term spatial memory in GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice: evidence for a dual-process memory model. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *16*(6), 379–386. <https://doi.org/10.1101/lm.1339109>
305. Sarnyai, Z., Sibille, E. L., Pavlides, C., Fenster, R. J., McEwen, B. S., & Toth, M. (2000). Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin(1A) receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(26), 14731–14736. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14731>
306. Saunderson, S. C., Dunn, A. C., Crocker, P. R., & McLellan, A. D. (2014). CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node. *Blood*, *123*(2), 208–216. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-489732>
307. Scarpignato, C., & Pelosini, I. (2006). Experimental and clinical pharmacology of rifaximin, a gastrointestinal selective antibiotic. *Digestion*, *73 Suppl 1*, 13–27. <https://doi.org/10.1159/000089776>
308. Schiano T. D. (2010). Treatment options for hepatic encephalopathy. *Pharmacotherapy*, *30*(5 Pt 2), 16S–21S. <https://doi.org/10.1592/phco.30.pt2.16S>
309. Schomerus, H., Hamster, W., Blunck, H., Reinhard, U., Mayer, K., & Dölle, W. (1981). Latent portasystemic encephalopathy. I. Nature of cerebral functional defects and their effect on fitness to drive. *Digestive diseases and sciences*, *26*(7), 622–630. <https://doi.org/10.1007/BF01367675>
310. Schultz, V., & 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. *The Journal of biological chemistry*, *253*(6), 1938–1943.

311. Seo, Y., Kim, H. S., & Hong, I. S. (2019). Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Immunomodulatory Therapeutics. *Stem cells international*, 2019, 5126156. <https://doi.org/10.1155/2019/5126156>
312. Shawcross, D. L., Davies, N. A., Williams, R., & Jalan, R. (2004). Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *Journal of hepatology*, 40(2), 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2003.10.016>
313. Shawcross, D. L., Wright, G., Olde Damink, S. W., & Jalan, R. (2007). Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, 22(1), 125–138. <https://doi.org/10.1007/s11011-006-9042-1>
314. Sheldon, H., Heikamp, E., Turley, H., Dragovic, R., Thomas, P., Oon, C. E., Leek, R., Edelmann, M., Kessler, B., Sainson, R. C., Sargent, I., Li, J. L., & Harris, A. L. (2010). New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood*, 116(13), 2385–2394. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-239228>
315. Shelke, G. V., Yin, Y., Jang, S. C., Lässer, C., Wennmalm, S., Hoffmann, H. J., Li, L., Gho, Y. S., Nilsson, J. A., & Lötval, J. (2019). Endosomal signalling via exosome surface TGFβ-1. *Journal of extracellular vesicles*, 8(1), 1650458. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1650458>
316. Shen, T., Dai, Y., Li, X., Xu, S., Gou, Z., & Gao, C. (2018). Regeneration of the Osteochondral Defect by a Wollastonite and Macroporous Fibrin Biphasic Scaffold. *ACS biomaterials science & engineering*, 4(6), 1942–1953. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00333>
317. Shen, Z. Y., Wu, B., Liu, T., Yang, Y., Yin, M. L., Zheng, W. P., Zhang, B. Y., & Song, H. L. (2017). Immunomodulatory effects of bone marrow mesenchymal stem cells overexpressing heme oxygenase-1: Protective effects on acute rejection following reduced-size liver transplantation in a rat model. *Cellular immunology*, 313, 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.12.006>
318. Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H., & Mann, M. (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), 14440–14445. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14440>
319. Shilov, I. V., Seymour, S. L., Patel, A. A., Loboda, A., Tang, W. H., Keating, S. P., Hunter, C. L., Nuwaysir, L. M., & Schaeffer, D. A. (2007). The Paragon Algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 6(9), 1638–1655. <https://doi.org/10.1074/mcp.T600050-MCP200>
320. Słowik, A., Ciećko-Michalska, I., Bogdał, J., & Szczudlik, A. (2001). Rozpoznawanie subklinicznej encefalopatii wotrobowej [The diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy]. *Przegląd lekarski*, 58(12), 1059–1062.
321. Söderberg, A., Barral, A. M., Söderström, M., Sander, B., & Rosén, A. (2007). Redox-signaling transmitted in trans to neighboring cells by melanoma-derived TNF-containing exosomes. *Free radical biology & medicine*, 43(1), 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.026>
322. Spahr, L., Butterworth, R. F., Fontaine, S., Bui, L., Therrien, G., Millette, P. C., Lebrun, L. H., Zayed, J., Leblanc, A., & Pomier-Layrargues, G. (1996). Increased blood manganese in cirrhotic patients: relationship to pallidal magnetic resonance signal hyperintensity and

- neurological symptoms. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 24(5), 1116–1120. <https://doi.org/10.1002/hep.510240523>
323. Spittau, B., Wullkopf, L., Zhou, X., Rilka, J., Pfeifer, D., & Kriegelstein, K. (2013). Endogenous transforming growth factor-beta promotes quiescence of primary microglia in vitro. *Glia*, 61(2), 287–300. <https://doi.org/10.1002/glia.22435>
324. Sproviero, D., La Salvia, S., Giannini, M., Crippa, V., Gagliardi, S., Bernuzzi, S., Diamanti, L., Ceroni, M., Pansarasa, O., Poletti, A., & Cereda, C. (2018). Pathological Proteins Are Transported by Extracellular Vesicles of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Frontiers in neuroscience*, 12, 487. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00487>
325. Squillaro, T., Peluso, G., & Galderisi, U. (2016). Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell transplantation*, 25(5), 829–848. <https://doi.org/10.3727/096368915X689622>
326. Steindl, P. E., Coy, D. L., Finn, B., Zee, P. C., & Blei, A. T. (1996). A low-protein diet ameliorates disrupted diurnal locomotor activity in rats after portacaval anastomosis. *The American journal of physiology*, 271(4 Pt 1), G555–G560. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1996.271.4.G555>
327. Stellwagen, D., Beattie, E. C., Seo, J. Y., & Malenka, R. C. (2005). Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(12), 3219–3228. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4486-04.2005>
328. Stenmark H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(8), 513–525. <https://doi.org/10.1038/nrm2728>
329. Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wilkinson, K., van Gils, J. M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K. J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W. A., Lacy-Hulbert, A., El Khoury, J., Golenbock, D. T., & Moore, K. J. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature immunology*, 11(2), 155–161. <https://doi.org/10.1038/ni.1836>
330. Sugiura, Y., Ikeda, K., & Nakano, M. (2015). High Membrane Curvature Enhances Binding, Conformational Changes, and Fibrillation of Amyloid- β on Lipid Bilayer Surfaces. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 31(42), 11549–11557. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03332>
331. Szajnik, M., Czystowska, M., Szczepanski, M. J., Mandapathil, M., & Whiteside, T. L. (2010). Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PloS one*, 5(7), e11469. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011469>
332. Takeda, S., Sato, N., & Morishita, R. (2014). Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Frontiers in aging neuroscience*, 6, 171. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00171>
333. Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., Sonobe, Y., Mizuno, T., & Suzumura, A. (2006). Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *The Journal of biological chemistry*, 281(30), 21362–21368. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600504200>
334. Tan, D., Armitage, J., Teo, T. H., Ong, N. E., Shin, H., & Moodley, Y. P. (2017). Elevated levels of circulating exosome in COPD patients are associated with systemic inflammation. *Respiratory medicine*, 132, 261–264.

- <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.04.014>
335. Taoro-Gonzalez, L., Arenas, Y. M., Cabrera-Pastor, A., & Felipo, V. (2018). Hyperammonemia alters membrane expression of GluA1 and GluA2 subunits of AMPA receptors in hippocampus by enhancing activation of the IL-1 receptor: underlying mechanisms. *Journal of neuroinflammation*, *15*(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1082-z>
336. Taoro-Gonzalez, L., Arenas, Y. M., Cabrera-Pastor, A., & Felipo, V. (2019a). Extracellular cGMP Reverses Altered Membrane Expression of AMPA Receptors in Hippocampus of Hyperammonemic Rats: Underlying Mechanisms. *Molecular neurobiology*, *56*(6), 4428–4439. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1387-z>
337. Taoro-González, L., Cabrera-Pastor, A., Sancho-Alonso, M., Arenas, Y. M., Meseguer-Estornell, F., Balzano, T., ElMlili, N., & Felipo, V. (2019b). Differential role of interleukin-1 β in neuroinflammation-induced impairment of spatial and nonspatial memory in hyperammonemic rats. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *33*(9), 9913–9928. <https://doi.org/10.1096/fj.201900230RR>
338. Taylor, A. R., Robinson, M. B., Gifondorwa, D. J., Tytell, M., & Milligan, C. E. (2007). Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. *Developmental neurobiology*, *67*(13), 1815–1829. <https://doi.org/10.1002/dneu.20559>
339. Taylor, D. D., Homesley, H. D., & Doellgast, G. J. (1980). Binding of specific peroxidase-labeled antibody to placental-type phosphatase on tumor-derived membrane fragments. *Cancer research*, *40*(11), 4064–4069.
340. Tenorio-Laranga, J., Montoliu, C., Urios, A., Hernandez-Rabaza, V., Ahabrach, H., García-Horsman, J. A., & 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. *Journal of neuroinflammation*, *12*, 183. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0404-7>
341. Tewes, U. (1991). Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene - Revision 1991 (HAWIE-R). Bern, Stuttgart, Toronto: Huber.
342. Thakur, B. K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., Williams, C., Rodriguez-Barrueco, R., Silva, J. M., Zhang, W., Hearn, S., Elemento, O., Paknejad, N., Manova-Todorova, K., Welte, K., Bromberg, J., ... Lyden, D. (2014). Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell research*, *24*(6), 766–769. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.44>
343. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology*, Chapter 3. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>
344. Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews. Immunology*, *9*(8), 581–593. <https://doi.org/10.1038/nri2567>
345. Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., Beckham, C., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International

- Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles*, 7(1), 1535750.
<https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
346. Thomas, L., & Pasquini, L. A. (2018). Galectin-3-Mediated Glial Crosstalk Drives Oligodendrocyte Differentiation and (Re)myelination. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 297. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00297>
347. Thomi, G., Surbek, D., Haesler, V., Joerger-Messerli, M., & Schoeberlein, A. (2019). Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells reduce microglia-mediated neuroinflammation in perinatal brain injury. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 105. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1207-z>
348. Timmermann, L., Gross, J., Kircheis, G., Häussinger, D., & Schnitzler, A. (2002). Cortical origin of mini-asterixis in hepatic encephalopathy. *Neurology*, 58(2), 295–298. <https://doi.org/10.1212/wnl.58.2.295>
349. Timmermann, L., Gross, J., Butz, M., Kircheis, G., Haussinger, D., & Schnitzler, A. (2004). Pathological oscillatory coupling within the human motor system in different tremor syndromes as revealed by magnetoencephalography. *Neurology & clinical neurophysiology: NCN*, 2004, 26.
350. Timmermann, L., Butz, M., Gross, J., Kircheis, G., Häussinger, D., & Schnitzler, A. (2005). Neural synchronization in hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, 20(4), 337–346. <https://doi.org/10.1007/s11011-005-7916-2>
351. Torregrosa Paredes, P., Esser, J., Admyre, C., Nord, M., Rahman, Q. K., Lukic, A., Rådmark, O., Grönneberg, R., Grunewald, J., Eklund, A., Scheynius, A., & Gabrielsson, S. (2012). Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma. *Allergy*, 67(7), 911–919. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02835.x>
352. Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867), 1244–1247. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>
353. Trento, C., Bernardo, M. E., Nagler, A., Kuçi, S., Bornhäuser, M., Köhl, U., Strunk, D., Galleu, A., Sanchez-Guijo, F., Gaipa, G., Introna, M., Bukauskas, A., Le Blanc, K., Apperley, J., Roelofs, H., Van Campenhout, A., Beguin, Y., Kuball, J., Lazzari, L., Avanzini, M. A., ... Dazzi, F. (2018). Manufacturing Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Graft-versus-Host Disease: A Survey among Centers Affiliated with the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 24(11), 2365–2370. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.07.015>
354. Truman, L. A., Ford, C. A., Pasikowska, M., Pound, J. D., Wilkinson, S. J., Dumitriu, I. E., Melville, L., Melrose, L. A., Ogden, C. A., Nibbs, R., Graham, G., Combadiere, C., & Gregory, C. D. (2008). CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood*, 112(13), 5026–5036. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-162404>
355. Tsilioni, I., & Theoharides, T. C. (2018). Extracellular vesicles are increased in the serum of children with autism spectrum disorder, contain mitochondrial DNA, and stimulate human microglia to secrete IL-1 β . *Journal of neuroinflammation*, 15(1), 239. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1275-5>
356. Tsuda, M., & Inoue, K. (2016). Neuron-microglia interaction by purinergic signaling in neuropathic pain following neurodegeneration. *Neuropharmacology*, 104, 76–81.

- <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.08.042>
357. Uribe, M., Márquez, M. A., García-Ramos, G., Escobedo, V., Murillo, H., Guevara, L., & Lisker, R. (1980). Treatment of chronic portal-systemic encephalopathy with lactose in lactase-deficient patients. *Digestive diseases and sciences*, 25(12), 924–928. <https://doi.org/10.1007/BF01308043>
358. Valadão, P., Santos, K., Ferreira E Vieira, T. H., Macedo E Cordeiro, T., Teixeira, A. L., Guatimosim, C., & de Miranda, A. S. (2020). Inflammation in Huntington's disease: A few new twists on an old tale. *Journal of neuroimmunology*, 348, 577380. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577380>
359. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
360. van Niel, G., Bergam, P., Di Cicco, A., Hurbain, I., Lo Cicero, A., Dingli, F., Palmulli, R., Fort, C., Potier, M. C., Schurgers, L. J., Loew, D., Levy, D., & Raposo, G. (2015). Apolipoprotein E Regulates Amyloid Formation within Endosomes of Pigment Cells. *Cell reports*, 13(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.057>
361. Viaud, S., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., André, F., Novault, S., Escudier, B., Robert, C., Caillat-Zucman, S., Tursz, T., Zitvogel, L., & Chaput, N. (2009). Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: a role for NKG2D ligands and IL-15Ralpha. *PloS one*, 4(3), e4942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004942>
362. Vilaça-Faria, H., Salgado, A. J., & Teixeira, F. G. (2019). Mesenchymal Stem Cells-derived Exosomes: A New Possible Therapeutic Strategy for Parkinson's Disease?. *Cells*, 8(2), 118. <https://doi.org/10.3390/cells8020118>
363. Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D. J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature communications*, 4, 2980. <https://doi.org/10.1038/ncomms3980>
364. Vilstrup, H., Amodio, P., Bajaj, J., Cordoba, J., Ferenci, P., Mullen, K. D., Weissenborn, K., & Wong, P. (2014). Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 60(2), 715–735. <https://doi.org/10.1002/hep.27210>
365. Volarevic, V., Markovic, B. S., Gazdic, M., Volarevic, A., Jovicic, N., Arsenijevic, N., Armstrong, L., Djonov, V., Lako, M., & Stojkovic, M. (2018). Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *International journal of medical sciences*, 15(1), 36–45. <https://doi.org/10.7150/ijms.21666>
366. Vomund, A. N., Zinselmeyer, B. H., Hughes, J., Calderon, B., Valderrama, C., Ferris, S. T., Wan, X., Kanekura, K., Carrero, J. A., Urano, F., & Unanue, E. R. (2015). Beta cells transfer vesicles containing insulin to phagocytes for presentation to T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(40), E5496–E5502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515954112>
367. Wada, J., Onishi, H., Suzuki, H., Yamasaki, A., Nagai, S., Morisaki, T., & Katano, M. (2010). Surface-bound TGF-beta1 on effusion-derived exosomes participates in maintenance of number and suppressive function of regulatory T-cells in malignant effusions. *Anticancer research*, 30(9), 3747–3757.

368. Wang, D., Huang, S., Yuan, X., Liang, J., Xu, R., Yao, G., Feng, X., & Sun, L. (2017). The regulation of the Treg/Th17 balance by mesenchymal stem cells in human systemic lupus erythematosus. *Cellular & molecular immunology*, *14*(5), 423–431. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.89>
369. Wang, G. J., Liu, Y., Qin, A., Shah, S. V., Deng, Z. B., Xiang, X., Cheng, Z., Liu, C., Wang, J., Zhang, L., Grizzle, W. E., & Zhang, H. G. (2008). Thymus exosomes-like particles induce regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *181*(8), 5242–5248. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.8.5242>
370. Wang, T., Gilkes, D. M., Takano, N., Xiang, L., Luo, W., Bishop, C. J., Chaturvedi, P., Green, J. J., & Semenza, G. L. (2014). Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(31), E3234–E3242. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410041111>
371. Wang, Z., Wang, Y., Wang, Z., Gutkind, J. S., Wang, Z., Wang, F., Lu, J., Niu, G., Teng, G., & Chen, X. (2015). Engineered mesenchymal stem cells with enhanced tropism and paracrine secretion of cytokines and growth factors to treat traumatic brain injury. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *33*(2), 456–467. <https://doi.org/10.1002/stem.1878>
372. Watanabe A. (2000). Portal-systemic encephalopathy in non-cirrhotic patients: classification of clinical types, diagnosis and treatment. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *15*(9), 969–979. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2000.02283.x>
373. Wein, C., Koch, H., Popp, B., Oehler, G., & Schauder, P. (2004). Minimal hepatic encephalopathy impairs fitness to drive. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *39*(3), 739–745. <https://doi.org/10.1002/hep.20095>
374. Weiner I. D. (2004). The Rh gene family and renal ammonium transport. *Current opinion in nephrology and hypertension*, *13*(5), 533–540. <https://doi.org/10.1097/00041552-200409000-00009>
375. Weissenborn, K., Heidenreich, S., Giewekemeyer, K., Rückert, N., & Hecker, H. (2003). Memory function in early hepatic encephalopathy. *Journal of hepatology*, *39*(3), 320–325. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(03\)00295-2](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(03)00295-2)
376. Weissenborn, K., Bokemeyer, M., Krause, J., Ennen, J., & Ahl, B. (2005a). Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease. *AIDS (London, England)*, *19 Suppl 3*, S93–S98. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000192076.03443.6d>
377. Weissenborn, K., Giewekemeyer, K., Heidenreich, S., Bokemeyer, M., Berding, G., & Ahl, B. (2005b). Attention, memory, and cognitive function in hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, *20*(4), 359–367. <https://doi.org/10.1007/s11011-005-7919-z>
378. Wesley, U. V., Vemuganti, R., Ayvaci, E. R., & Dempsey, R. J. (2013). Galectin-3 enhances angiogenic and migratory potential of microglial cells via modulation of integrin linked kinase signaling. *Brain research*, *1496*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.12.008>
379. Wojcicki, M., Haagsma, E. B., Gouw, A. S., Slooff, M. J., & Porte, R. J. (2004). Orthotopic liver transplantation for portosystemic encephalopathy in an adult with congenital absence of the portal vein. *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, *10*(9), 1203–1207. <https://doi.org/10.1002/lt.20170>
380. Wolf P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British journal of haematology*, *13*(3), 269–288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>

381. Wollert, T., & Hurley, J. H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, *464*(7290), 864–869. <https://doi.org/10.1038/nature08849>
382. Wong, W. Y., Lee, M. M., Chan, B. D., Kam, R. K., Zhang, G., Lu, A. P., & Tai, W. C. (2016). Proteomic profiling of dextran sulfate sodium induced acute ulcerative colitis mice serum exosomes and their immunomodulatory impact on macrophages. *Proteomics*, *16*(7), 1131–1145. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500174>
383. Wood H. (2018). Dementia: Peripheral inflammation could be a prodromal indicator of dementia. *Nature reviews. Neurology*, *14*(3), 127. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2018.8>
384. Wu, Z., Guo, Z., Gearing, M., & Chen, G. (2014). Tonic inhibition in dentate gyrus impairs long-term potentiation and memory in an Alzheimer's [corrected] disease model. *Nature communications*, *5*, 4159. <https://doi.org/10.1038/ncomms5159>
385. Xiang, X., Poliakov, A., Liu, C., Liu, Y., Deng, Z. B., Wang, J., Cheng, Z., Shah, S. V., Wang, G. J., Zhang, L., Grizzle, W. E., Mobley, J., & Zhang, H. G. (2009). Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *International journal of cancer*, *124*(11), 2621–2633. <https://doi.org/10.1002/ijc.24249>
386. Xie, K., Liu, L., Chen, J., & Liu, F. (2019). Exosomal miR-1246 derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells attenuates hepatic ischemia reperfusion injury by modulating T helper 17/regulatory T balance. *IUBMB life*, *71*(12), 2020–2030. <https://doi.org/10.1002/iub.2147>
387. Xin, H., Li, Y., Cui, Y., Yang, J. J., Zhang, Z. G., & Chopp, M. (2013). Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *33*(11), 1711–1715. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.152>
388. Yachha, S. K., Ghoshal, U. C., Gupta, R., Sharma, B. C., & Ayyagari, A. (1996). Portal hypertensive gastropathy in children with extrahepatic portal venous obstruction: role of variceal obliteration by endoscopic sclerotherapy and Helicobacter pylori infection. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, *23*(1), 20–23. <https://doi.org/10.1097/00005176-199607000-00004>
389. Yamane, K., Ihn, H., Asano, Y., Jinnin, M., & Tamaki, K. (2003). Antagonistic effects of TNF-alpha on TGF-beta signaling through down-regulation of TGF-beta receptor type II in human dermal fibroblasts. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *171*(7), 3855–3862. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.7.3855>
390. Yan, X., Liu, Z., & Chen, Y. (2009). Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, *41*(4), 263–272. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmp018>
391. Yang, Y., Ye, Y., Kong, C., Su, X., Zhang, X., Bai, W., & He, X. (2019). MiR-124 Enriched Exosomes Promoted the M2 Polarization of Microglia and Enhanced Hippocampus Neurogenesis After Traumatic Brain Injury by Inhibiting TLR4 Pathway. *Neurochemical research*, *44*(4), 811–828. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-02714-z>
392. Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*, *4*, 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>

393. Yao, X., Liu, S., Ding, W., Yue, P., Jiang, Q., Zhao, M., Hu, F., & Zhang, H. (2017). TLR4 signal ablation attenuated neurological deficits by regulating microglial M1/M2 phenotype after traumatic brain injury in mice. *Journal of neuroimmunology*, *310*, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.06.006>
394. Yao, Y., Chen, R., Wang, G., Zhang, Y., & Liu, F. (2019). Exosomes derived from mesenchymal stem cells reverse EMT via TGF- β 1/Smad pathway and promote repair of damaged endometrium. *Stem cell research & therapy*, *10*(1), 225. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1332-8>
395. Yao, Y., Huang, J., Geng, Y., Qian, H., Wang, F., Liu, X., Shang, M., Nie, S., Liu, N., Du, X., Dong, J., & Ma, C. (2015). Paracrine action of mesenchymal stem cells revealed by single cell gene profiling in infarcted murine hearts. *PloS one*, *10*(6), e0129164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129164>
396. Yellen, P., Chatterjee, A., Preda, A., & Foster, D. A. (2013). Inhibition of S6 kinase suppresses the apoptotic effect of eIF4E ablation by inducing TGF- β -dependent G1 cell cycle arrest. *Cancer letters*, *333*(2), 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.01.041>
397. Yu, L., Yang, F., Jiang, L., Chen, Y., Wang, K., Xu, F., Wei, Y., Cao, X., Wang, J., & Cai, Z. (2013). Exosomes with membrane-associated TGF- β 1 from gene-modified dendritic cells inhibit murine EAE independently of MHC restriction. *European journal of immunology*, *43*(9), 2461–2472. <https://doi.org/10.1002/eji.201243295>
398. Yuan, L., Xiao, Z. T., Huang, X. Z., Wu, M. J., Shi, H., & Liu, A. F. (2016). Human embryonic mesenchymal stem cells alleviate pathologic changes of MRL/Lpr mice by regulating Th7 cell differentiation. *Renal failure*, *38*(9), 1432–1440. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2015.1136894>
399. Yuyama, K., Sun, H., Mitsutake, S., & Igarashi, Y. (2012). Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid- β by microglia. *The Journal of biological chemistry*, *287*(14), 10977–10989. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.324616>
400. Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassoni, F., Mancardi, G., & Uccelli, A. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, *106*(5), 1755–1761. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1496>
401. Zappulli, V., Friis, K. P., Fitzpatrick, Z., Maguire, C. A., & Breakefield, X. O. (2016). Extracellular vesicles and intercellular communication within the nervous system. *The Journal of clinical investigation*, *126*(4), 1198–1207. <https://doi.org/10.1172/JCI81134>
402. Zemtsova, I., Görg, B., Keitel, V., Bidmon, H. J., Schrör, K., & Häussinger, D. (2011). Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *54*(1), 204–215. <https://doi.org/10.1002/hep.24326>
403. Zhang, H. G., Liu, C., Su, K., Yu, S., Zhang, L., Zhang, S., Wang, J., Cao, X., Grizzle, W., & Kimberly, R. P. (2006). A membrane form of TNF-alpha presented by exosomes delays T cell activation-induced cell death. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *176*(12), 7385–7393. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.12.7385>
404. Zhang, Y., Chopp, M., Meng, Y., Katakowski, M., Xin, H., Mahmood, A., & Xiong, Y. (2015). Effect of exosomes derived from multipotential mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury. *Journal of neurosurgery*, *122*(4), 856–867. <https://doi.org/10.3171/2014.11.JNS14770>
405. Zhao, Y., Jiang, Z., Zhao, T., Ye, M., Hu, C., Yin, Z., Li, H., Zhang, Y., Diao, Y., Li, Y., Chen, Y., Sun, X., Fisk, M. B., Skidgel, R., Holterman, M., Prabhakar, B., & Mazzone, T. (2012). Reversal of type 1 diabetes via islet β cell regeneration following immune

- modulation by cord blood-derived multipotent stem cells. *BMC medicine*, 10, 3.
<https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-3>
406. Zhou, X., Spittau, B., & Kriegstein, K. (2012). TGF β signalling plays an important role in IL4-induced alternative activation of microglia. *Journal of neuroinflammation*, 9, 210.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-210>
407. Zucker, D. M., & Redulla, R. (2019). Lactulose Management of Minimal Hepatic Encephalopathy: A Systematic Review. *Gastroenterology nursing: the official journal of the Society of Gastroenterology Nurses and Associates*, 42(1), 84–94.
<https://doi.org/10.1097/SGA.0000000000000429>

