



FACULTAD DE FARMACIA  
*Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica*

PAPEL DE LA HIPERAMONIEMIA SOBRE  
LA ACTIVIDAD GLUTAMINASA EN  
DIFERENTES TEJIDOS Y ESTRÉS  
OXIDATIVO EN RATAS SOMETIDAS A  
DERIVACIÓN PORTO-CAVA.

*María Jover Cobos.*  
*Sevilla, 2006.*



FACULTAD DE FARMACIA  
*Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica*

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 093 número 56 del libro  
correspondiente.

Sevilla, 9-11-06.

El Jefe del Negocio de Tesis

*Pluma Kojelle*

PAPEL DE LA HIPERAMONIEMIA SOBRE LA  
ACTIVIDAD GLUTAMINASA EN DIFERENTES  
TEJIDOS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN RATAS  
SOMETIDAS A DERIVACIÓN PORTO-CAVA.

Memoria presentada por la Licenciada  
María Jover Cobos para optar al  
Grado de Doctor de la  
Universidad de Sevilla.



*Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica  
Facultad de Farmacia*

C/ Profesor García González, 2.  
41012 Sevilla (España)

Dr. JUAN BAUTISTA PALOMAS, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla

Dr. Manuel Romero Gómez, Doctor de Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de Sevilla

**CERTIFICAN, QUE** Dña. María Jover Cobos, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado

A handwritten signature in black ink, reading "Juan D. Bautista Palomas".

Fdo: Juan D. Bautista Palomas

A handwritten signature in black ink, appearing as a stylized, scribbled name.

Fdo: Manuel Romero Gómez

En Sevilla, a 3 de Noviembre de 2006

*A Dani, a mis padres y hermanos*

## AGRADECIMIENTOS

*Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal en colaboración con el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla y el Hospital Universitario Nuestra Señora de Valme, bajo la dirección del Prof. Dr. Don Juan D. Bautista Palomas y del Dr. Don. Manuel Romero Gómez, a quienes quiero expresar mi más sincero agradecimiento por la confianza y estímulo que me han prestado. Así como a mis tutores, los Profesores Dres. José Manuel Vega Pérez y Fernando Iglesias Guerra, del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, a los que debo la iniciación de mi carrera como investigadora y de los que nunca me olvido.*

*Asimismo quiero expresar mi gratitud a las siguientes personas e instituciones que han hecho posible y me han prestado su apoyo, a veces sin saberlo, durante la realización de esta Tesis:*

*A la Red Nacional de Encefalopatía por la concesión de una beca predoctoral perteneciente al Instituto de Salud Carlos III. A Mayte y Vicente, a Antonio y a la Fundación Valme. A la Universidad de Sevilla.*

*Al Prof. Dr. D. Vicente Felipe Orts, Elena Kosenko y a su grupo del Príncipe Felipe, Centro de Investigaciones Biomédicas de la Comunidad Valenciana, por la ayuda prestada en todo momento.*

*A mis Orgánicos, en especial a los Catedráticos Dr. D. Felipe Alcudía González y Dr. Don Juan A. Galbis Pérez por dejarme leer la tesis en el Departamento. Al Dr. José Luis Espartero, por contar conmigo y por estar siempre dispuesto a echarme una mano. A Margarita, mi modelo a seguir durante mis primeros años. A M<sup>a</sup>Eugenia (Eu), M<sup>a</sup> Gracia (ay, eperando a nuestro Julio), A Jesús, por los análisis de síntesis de compuestos por masas, aunque no estén en esta tesis. A Isi, Paquita, Mariana, Viola, Ana, Manolo Bueno, Manolo Mancera, Manolo Rivas, Juan Viguera, Inma e Inma Molina y José Ignacio, por sus conversaciones tan diferentes y tan estimulantes para mí. A las conversaciones mañaneras sobre geografía e historia que echo tanto de menos con Paco y Pepe. A todos los que me han hecho sentirme en mi lugar de trabajo como en mi segunda casa, aunque los resultados de estas correrías no estén en esta tesis. A Sole y Juanillo, por*

todos los pequeños problemillas que nos vais resolviendo en el día a día. A William, por su buen humor tan transmisible y necesario. A Elena, la más dicharachera de orgánica. A Cris, por hacerme sentir siempre a tu lado. A Rg, por traerme de vez en cuando al "mundo real" y por dejarte llevar al mío aunque sea un momento, y por tantas cosas imposibles, ¿de verdad, que el tiempo no estira?

A los encontronazos en los pasillos, con Migue "el chico", Migue "el grande", Isaac y Khalil, Javier Escamilla, Alfonso, Wendo y Félix, por "sus sentidos del humor" tan reparadores en los momentos más oportunos.

A mis compañeros de "laboratorios", José Antonio, Alvarito, José, Octavio, Edit, Jamileao, Regina, Omar, Ana y Rocío, Santiago, Javier, Mario, Vanesa y a todos los que he tenido la oportunidad de conocer.

A mis Bioquímicos, a Kike (Enrique), por ayudarme siempre y dar tu toque musical y buenos consejos al trabajo y la vida del laboratorio. A Juan Parrado, por su frescura y buenas ideas a todas horas, ¿por qué no te haría más caso? A Laura, por tu apoyo y por compartir conmigo tantos ratos de charla y de risas. A Juan Pº, por recordarme lo importantes que son "las pequeñas cosas". Olga Mami, Olga II (Mami también), Isabel, Rosa, Ana, por estar ahí y compartir mis momentos. A Vicentito, Eduardo, por dar un toque surrealista al laboratorio. A Mamen, por su ayuda incondicional, por sus "charlas" y por su buena voluntad para todo. Al grupo de "Los Machado", A D. Alberto y Dña. Josefina, por permitirme "estar" en bioquímica. A Sandro, por tus préstamos y tu buen humor. A Rocío, ¿iremos al fin a correr, Ruth?, a Marti y Miguel, por ser tan atentos. A los chicos del laboratorio de al lado, mi grupo alfa, a Javier Vitorica, gracias por ser siempre tan paciente conmigo. A Diego, Angélica, Juan Carlos, Pepe, Blanca, Elisa y Consuelo, Marisa, Seba, Cristina, MªPaz, Cristina y Manuel, por tener tanta paciencia en los innumerables préstamos... ¿que luego lo devuelvo, eh? Y por los buenos momentos compartidos. A Paula, Andrés y Ana Mari, por "prestarme" a Juan. Y a Rosa, Carmen y Carmen, las secres de Bioquímica, preocupándose por dónde andaba yo, "que soy de orgánica!"

A mis médicos y chicos del "Hospital", a Carmen, a Ana, a Lourdes, a Mª del Mar, a David, a Diana, a Diego, a Marta, a Elena, por enseñarme a ir de "shopping"

durante los congresos y una forma diferente de ver la vida. A Daniel Díaz, por todos los animales operados y por el orden puesto en todo. ¡Mil gracias, Manolo! A Raquel, por ser tan especial y por tu ayuda y dedicación puesta en los inicios de esta tesis. A Carlos, Pepe y los chicos de los laboratorios farmacéuticos, por invitarme a participar de momentos "Congreso" y esas estupendas charlas.

A Inés, por tu ayuda continua, tu sabiduría incondicional, compañera inagotable trabajadora y por tu amistad. A Fernando Recio, por darme esa gran iluminación y compartir su genialidad. A Ramón.

Un recuerdo muy especial para Miriam y Juanjo, para Paca González, Belén y Marcos, para Lars, para Inma y Kike, por las colaboraciones y grandes enseñanzas que fueron y que serán. A Pepe Aguilar y Javier Salmerón, por moderar la mesa de aquella mi primera charla de congreso, la mejor, sin duda.

A Lusanda y Dani Lobo, por descubrimos el mundo de lo natural y conseguir arrancarnos al infinito y más allá. A Silvia y a Isa, mis chicas del Obradoiro. A Juan y Sonsoles, por su visión tan diferente de las cosas.

A ti, Dani, por hacerme sentir especial y devolverme la ilusión a cada instante, por tu Amor en proporción cósmica, por hacerme siempre reír y por esperarme interminables veces a esas horas insospechadas.

A mi Mami, mi confidente, mi todo (hasta mi "becaria"!); A Papá. A Ton y Mercedes, a Paco e Irene, a mi Choni y a Alberto. A Tere y Evaristo, a M<sup>a</sup>Tere y Juan. A Bartolo y María. A mis abuelitos. Y a toda mi familia, que siempre están conmigo, por su aliento e inmensa comprensión, siempre dispuestos a arrancarme una sonrisa en los momentos difíciles. No puedo expresar con mejores palabras el sentimiento que a continuación muestro de mano de RQ: "Al término de esta Tesis, encerradas entre sus páginas, quedan muchas cosas no visibles [...]... Los años de trabajo, los momentos vividos día tras día con los compañeros, cada avance, cada fracaso, cada pequeño logro y también un puñadito de sueños... Unos se realizaron y otros permanecerán eternamente escondidos bajo las palabras impresas... aunque quizá sólo yo sea capaz de leer entre líneas y de encontrarme con ellos a cada vuelta de página".

*"He redactado esta carta más extensa de lo usual  
porque carezco de tiempo para escribirla más breve"*

*Isaac Newton*



## **PUBLICACIONES**

Parte de este trabajo, tanto como resultados y puesta a punto de técnicas, ha sido recogido en las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

**AUTORES:** Romero-Gómez M., Jover M., Díaz-Gómez D., Collantes de Terán L., Rodrigo R., Camacho I., Echevarría M., Felipo V., Bautista J.D.

**TITULO:** Phosphate-Activated Glutaminase Activity Is Enhanced In Brain, Intestine And Kidneys Of Rats Following Portacaval Anastomosis.

**REVISTA:** World J Gastroenterol, 2006; 12(15): 2406-2411.

**AUTORES:** M. Jover, D. Díaz, E. Fontiveros, L. Collantes de Terán, J. Parrado, I. Camacho, J. Bautista y M. Romero-Gómez.

**TITULO:** Protein oxidation in astrocyte of porto-caval shunted rats: role of oxidative stress in hepatic encephalopathy.

**REVISTA:** Journal of Hepatol 2006. (Supl 2); 44: S76.

**AUTORES:** M. Jover, D. Díaz, E. Fontiveros, L. Collantes de Terán, J. Parrado, I. Camacho, J. Bautista y M. Romero-Gómez.

**TÍTULO:** Oxidación Proteica en astrocitos de ratas sometidas a derivación porto-cava: papel del estrés oxidativo en la encefalopatía hepática.

**REVISTA:** Gastroenterol Hepatol 2006; 29 (Supl 1, AEEH): 137.

**AUTORES:** L. Collantes de Terán, D. Díaz, M. Jover, J. Chen, Y. Ah Goo, S. Shaffer, G. Taylor, J.F. Gutiérrez, D. Goodlett, J. Bautista y M. Romero-Gómez.

**TÍTULO:** Estudio proteómico cuantitativo de la glutaminasa intestinal en la patogénesis de la encefalopatía hepática.

**REVISTA:** Gastroenterol Hepatol 2006; 29 (Supl 1, AEEH): 133.

**AUTORES:** María Jover y Manuel Romero Gómez

**TITULO:** Glutaminasa intestinal y encefalopatía hepática.

**REVISTA:** Gastroenterología y Hepatología Continuada. Implicaciones clínicas de la investigación básica. Vol 4, Número 4, Julio-Agosto 2005.

**AUTORES:** Juan Parrado, Olga Cremades, María Jover, Enrique Fontiveros, Juan Bautista

TITULO: Carotenoproteínas: Un Potencial Alimento Funcional para el Tratamiento de Caquexias asociadas a procesos Cancerosos.

LIBRO: Avances de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos en los inicios del siglo XXI. Edita Servicio de Publicaciones Universidad de Burgos. 2005.pags 777-780.

AUTORES: Juan Parrado, Esther Miramontes, María Jover, Jose Carlos Márquez, Maria Angeles Mejias, Laura Collantes de Terán, E. Absi, Juan Bautista.

TITULO: Prevention of brain protein and lipid oxidation elicited by a water-soluble oryzanol enzymatic extract derived from rice bran.

REVISTA: European Journal Nutrition, Vol 42, Number 6,307-314 (2003).

Congresos regionales, nacionales e internacionales, TANTO TÉCNICAS APRENDIDAS:

PHOSPHATE-ACTIVATED GLUTAMINASE GENE  
POLYMORPHISMS ARE IMPLIED IN CIRRHOSIS  
SUSCEPTIBILITY AND RISK FOR HEPATIC  
ENCEPHALOPATHY.Romero-Gomez, M; Galan, JJ; Trabadela,  
C; Hoyas, E; Camacho, I; Jover, M; Bautista, J; Ruiz, A.  
**American Association for the study of Liver.** Hepatology,  
October, 2006.

EL HAPLOTIPO TACG DEL GEN DE LA GLUTAMINASA  
PROTEGE FRENTE A LA CIRROSIS Y EL RIESGO DE  
ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA. Galán J.J., Trabadela C., Hoyas  
E., Jover M., Camacho I., Bautista J. y Ruiz A. **XXXVII  
REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE PATOLOGÍA  
DIGESTIVA.** Cádiz, 19-21 de Octubre de 2006.

PROTEIN OXIDATION IN ASTROCYTE OF PORTO-CAVAL  
SHUNTED RATS: ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN HEPATIC  
ENCEPHALOPATHY. M. Jover, D Díaz, E. Fontiveros, L.  
Collantes de Terán, J. Parrado, I. Camacho, J. Bautista y M.  
Romero-Gómez. **41st Annual Meeting of the European  
Association for the Study of the Liver.** April 26-30, 2006.

OXIDACIÓN PROTEICA EN ASTROCITOS DE RATAS  
SOMETIDAS A DERIVACIÓN PORTO-CAVA: PAPEL DEL

ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA. M. Jover, D Díaz, E. Fontiveros, L. Collantes de Terán, J. Parrado, I. Camacho, J. Bautista y M. Romero-Gómez. Madrid, 15-17 Febrero 2006. **XXXI Congreso anual de la Fundación y Asociación Española para el Estudio del Hígado.** Madrid, Febrero 2006.

ESTUDIO PROTEÓMICO CUANTITATIVO DE LA GLUTAMINASA INTESTINAL EN LA PATOGÉNESIS DE LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA. L. Collantes de Terán, D Díaz, M. Jover, J. Chen, Y. Ah Goo, S. Shaffer, G. Taylor, JF. Gutiérrez, D. Goodlett, J. Bautista y M. Romero-Gómez. Madrid, 15-17 Febrero 2006. **XXXI Congreso anual de la Fundación y Asociación Española para el Estudio del Hígado.** Madrid, Febrero 2006.

QUANTITATIVE PROTEOMICS ANALYSIS OF THE INTESTINAL GLUTAMINASE IN THE PATHOGENESIS OF MINIMAL HEPATIC ENCEPHALOPATHY. Laura Collantes de Terán, Jinhzi Chen, Young Ah Goo, Scout Shaffer, Grez Taylor, Maria Jover, Juan Fco. Gutiérrez, David Goodlett, Manuel Romero-Gómez, Juan Bautista. **VI th European Symposium of The Protein Society.** Barcelona, 30 abril-4 de mayo de 2005.

COMUNICACIÓN ORAL: LA ACTIVIDAD GLUTAMINASA ESTÁ IMPLICADA EN LA PATOGÉNESIS DE LA HIPERAMONIEMIA EN RATAS CON DERIVACIÓN PORTO- CAVA. Jover M., Díaz-Gómez D., Collantes de Terán L., Corpas R., Fontiveros E., Parrado J., Bautista J.D., Romero-Gómez M. **Congreso de la Sociedad Española para el Estudio del Hígado.** Madrid, 17-19 de febrero de 2005.

LA RESPUESTA A LA SOBRECARGA ORAL DE GLUTAMINA DEPENDE DE LA HIPERTENSIÓN PORTAL Y LA RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA. E. Hoyas, M.M. Vitoria, M. Jover, R. Corpas, L. Collantes de Terán , I. Camacho, M. Cruz, J.D. Bautista y M. Romero-Gómez M. **Congreso de la Sociedad Española para el Estudio del Hígado.** Madrid, 17-19 de febrero de 2005.

EL INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD GLUTAMINASA FOSFATO-DEPENDIENTE CONTRIBUTE DE FORMA SUSTANCIAL A LA HIPERAMONIEMIA EN FALLO HEPÁTICO FULMINANTE (FHF).

M. Jover, L.M. Ytrebo, L. Collantes de Terán, S. Sen, C. Rose, G.A. Ten Have, N.A. Davies, S. Hodges, G.I. Nedredal, A. Revhaug, R. Jalan, N.E. Deutz, J.D. Bautista y M. Romero-Gómez. **Congreso de la Sociedad Española para el Estudio del Hígado**. Madrid, 17-19 de febrero de 2005.

COMUNICACIÓN ORAL: APPLICATION OF QUANTITATIVE PROTEOMICS AND MULTIDIMENSIONAL CHROMATOGRAPHY FOR THE ANALYSIS OF PROTEIN EXPRESSION IN THE PATHOGENESIS OF HEPATIC ENCEPHALOPATHY. L. Collantes de Terán, J. Z. Chen, Y. A. Goo, M. Jover, J.F. Gutiérrez, S. Shaffer, G. K. Taylor, D.R. Goodlett, M. Romero-Gómez, J.D. Bautista. Collantes de Terán L., Romero-Gómez M., Bautista J. **I Congreso de la Sociedad Española de Proteómica**. Córdoba, 13-17 de febrero de 2005.

ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA: OXIDACIÓN PROTEICA EN ASTROCITOS DE RATAS SOMETIDAS A DERIVACIÓN PORTO-CAVA. M. Jover, D. Díaz, E. Fontiveros, L. Collantes de Terán, J. Parrado, I. Camacho, J. Bautista y M. Romero-Gómez. **Sociedad Andaluza de Patología Digestiva**. Córdoba, 20-22 octubre 2005.

GLUTAMINASE ACTIVITY IS INCREASED IN THE CEREBELLUM & BASAL GANGLIA OF HYPERAMMONEMIC PORTO-CAVAL SHUNTED RATS. Jover M., Díaz-Gómez D., Collantes de Terán L., Corpas R., Fontiveros E., Bautista J.D., Romero-Gómez M. **International Symposium On Hyperammonemia and Hepatic Encephelopathy**. Valencia, November 14-16, 2004.

INCREASED PHOSPHATE-ACTIVATED GLUTAMINASE ACTIVITY IN THE DUODENUM AND KIDNEY CONTRIBUTES SUBSTANTIALLY TO THE HYPERAMMONEMIA IN PORTO-CAVAL SHUNTED RATS. Jover M., Díaz-Gómez D., Collantes de Terán L., Corpas R., Fontiveros E., Bautista J.D., Romero-Gómez M. **International Symposium On Hyperammonemia and Hepatic Encephelopathy**. Valencia, November 14-16, 2004.

FACTORS IMPLIED IN THE REGULATION OF INTESTINAL AMMONIA PRODUCTION. Hoyas E., Corpas R., Jover M., Collantes de Terán L., Ramos-Guerrero R., Grande L.,

Sánchez-Muñoz, Díaz-Gómez D., Camacho I., Bautista J.D., Romero-Gómez M. **International Symposium On Hyperammonemia and Hepatic Encephelopathy.** Valencia, November 14-16, 2004.

ROLE OF SMALL INTESTINE IN SUBCLINICAL HEPATIC ENCEPHALOPATHY: A PROTEOMIC APPROACH. Collantes de Terán L., Jover M., Ramos-Guerrero R., Corpas R., Díaz-Gómez D., Parrado J., Gutiérrez JF., Rodríguez O., Romero-Gómez M. and Bautista J.D. **International Symposium On Hyperammonemia and Hepatic Encephelopathy.** Valencia, November 14-16, 2004.

GLUTAMINASE ACTIVITY IS INCREASED IN THE CEREBELLUM & BASAL GANGLIA OF HYPERAMMONEMIC PORTO-CAVAL SHUNTED RATS. Jover M., Díaz-Gómez D., Collantes de Terán L., Corpas R., Fontiveros E., Bautista J.D., Romero-Gómez M. **International Symposium On Hyperammonemia and Hepatic Encephelopathy.** Valencia, November 14-16, 2004.

COMUNICACIÓN ORAL: EL INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD GLUTAMINASA FOSFATO-DEPENDIENTE CONTRIBUYE DE FORMA SUSTANCIAL A LA HIPERAMONEMIA EN FALLO HEPÁTICO FULMINANTE. María Jover, Lars M Ytrebø, Laura Collantes de Terán, Sambit Sen Christopher Rose, Gabriele AM Ten Have, Nathan A Davies, Stephen Hodghes, Geir I Nedredal, Arthur Revhaug, Rajiv Jalan, Nicolaas EP Deutz, Juan D. Bautista, Manuel Romero-Gómez. **XXXV REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE PATOLOGÍA DIGESTIVA.** Sevilla, 21-23 OCTUBRE DE 2004.

COMUNICACIÓN ORAL: PAPEL DEL GLUCAGON Y EL ÓXIDO NÍTRICO EN LA REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN INTESTINAL DE AMONIO. E. Hoyas, R. Corpas, M. Jover, L. Collantes, R. Ramos Guerrero, L. Grande, D. Díaz Gómez, I. Camacho, J.D. Bautista, M. Romero Gómez. **XXXV REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE PATOLOGÍA DIGESTIVA.** Sevilla, 21-23 OCTUBRE DE 2004.

"ROLE OF PHOSPHATE DEPENDANT GLUTAMINASE IN HEPATIC SUBCLINICAL ENCEPHALOPATHY: A PROTEOMIC APPROACH". Laura Collantes de Terán, María Jover, Rosa

Ramos, Juan Parrado, Juan F. Gutiérrez, Olga Rodríguez, Manuel Romero-Gómez and Juan Bautista. **The 15th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis (MPSA)**. Seattle, 29 August- 2 September 2004.

A TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS MAP OF HUMAN MITOCHONDRIAL PROTEINS. Maria JOVER, Laura COLLANTES DE TERÁN, Juan Fco GUTIERREZ, Juan PARRADO and Juan BAUTISTA. **XXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular**. Lérida.13-15 Septiembre 2004.

PREMIO COMUNICACIÓN ORAL: FACTORES REGULADORES DE LA PRODUCCIÓN INTESTINAL DE AMONIO. Hoyas E., Grande L., Corpas R., Camacho I., Jover M., Collantes de Terán L., Ramos-Guerrero R., Díaz-Gómez D., Bautista J.D., Romero-Gómez M. **LXIII Congreso Anual Sociedad Española de Patología Digestiva**. Valencia, 5-8 junio de 2004.

EXPRESIÓN DE LA GLUTAMINASA FOSFATO DEPENDIENTE INTESTINAL EN LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA. Jover M., Collantes de Terán L., Ramos-Guerrero R., Grande L., Díaz D, Corpas R., Bautista J., Romero-Gómez M. **LXIII Congreso Anual Sociedad Española de Patología Digestiva**. Valencia, 5-8 junio d 2004.

ENZYMATIC PROTEIN HYDROLISATES: DIETARY TREATMENT OF PATIENTS WITH LIVER FAILURE. M. Jover, L. Collantes de Terán, J.F. Gutiérrez, O. Rodríguez, O. Cremades, M.C. Álvarez-Ossorio, J. Parrado, Bautista J. **X MEETING ON INDUSTRIAL APPLICATIONS OF ENZYMES**. Barcelona, November 26-27, 2003.

ROLE OF PHOSPHATE DEPENDANT GLUTAMINASE IN SUBCLINICAL HEPATIC ENCEPHALOPATHY. Collantes de Terán,L.; Ramos,R.; Jover,M.; Rodríguez,O.; Gutiérrez,J.F.; Romero-Gómez,M.;Corpas,R.;Sánchez,L.; Díaz,D.; Alvarez-Ossorio,M.C.; Parrado,J.; Bautista,J.**I Luso-Spanish Workshop on the Structure and Function of Proteins**. La Coruña.18-20 Septiembre 2003.

EXPRESIÓN DE LA GLUTAMINASA FOSFATO DEPENDIENTE EN ENTEROCITO DE RATA. Collantes de Terán,L.; Ramos,R.; Jover,M.; Gutiérrez,J.F.; Rodríguez,O.; Romero-Gómez,M.;Corpas,R.;Sánchez,L.; Díaz,D.; Parrado,J.; Alvarez-Ossorio,M.C.; Bautista,J., **XXVI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular**. La Coruña.15-18 Septiembre 2003.

HIPERAMONEMIA DE ORIGEN INTESTINAL EN LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MINIMA: PAPEL DE LA GLUTAMINASA INTESTINAL. María Jover, Laura collantes de Terán, Rosa Ramos, Daniel Díaz, Raquel Corpas, Laura Sánchez, Manuel Romero-Gómez, Juan Parrado y Juan Bautista. **XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Química Terapéutica**. 9-12 Septiembre 2003, Santiago de Compostela.

GLUTAMINASE EXPRESSION IN HEPATIC SUBCLINICAL ENCEPHALOPATHY: A PROTEOMIC APPROACH BY 2D-DIFERENTIAL GEL ELECTROPHORESIS. Collantes de Terán L., Ramos R., Jover, M. Parrado J., and Bautista J. **Jornadas sobre Proteómica UCO-2003**. Universidad de Cordoba 2003. Córdoba, Febrero 2003.

**ESTE ES UN DOCUMENTO CONFIDENCIAL**

**QUEDA PROHIBIDA TODA REPRODUCCIÓN,  
DIVULGACIÓN O DISCUSIÓN TOTAL O PARCIAL DE  
LOS DATOS RELACIONADOS CON EL IGF-1 DE ESTA  
MEMORIA ANTES DEL DÍA 1 DE NOVIEMBRE DEL 2017  
SIN AUTORIZACIÓN ESCRITA DEL PROFESOR Dr. Juan  
Bautista Palomas y/o del Dr Manuel Romero Gómez y/o  
María Jover Cobos**

**LA CONSERVACIÓN Y DEPÓSITO DE ESTE  
DOCUMENTO DEBE ESTAR GARANTIZADA SIEMPRE  
POR LA CONFIDENCIALIDAD**



## ABREVIATURAS

|                                 |                                                                  |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>AA</b>                       | Aminoácido                                                       |
| <b>AAA</b>                      | Aminoácidos aromáticos                                           |
| <b>AAR</b>                      | Aminoácidos ramificados                                          |
| <b>AMQ</b>                      | 6-aminoquinolina                                                 |
| <b>APS</b>                      | Persulfato amónico                                               |
| <b>AQC</b>                      | 6-aminoquinolil- <i>N</i> -hidroxi-succinil carbamato            |
| <b>ARN</b>                      | Ácido ribonucleico                                               |
| <b>BHE</b>                      | Barrera hematoencefálica                                         |
| <b>BSA</b>                      | Albúmina sérica bovina                                           |
| <b>CHAPS</b>                    | 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanesulfonato          |
| <b>CoA</b>                      | Coenzima A                                                       |
| <b>DON</b>                      | 6-diazo-5-oxo-L-norleucina                                       |
| <b>DPC</b>                      | Derivación porto-cava (anastomosis)                              |
| <b>DTT</b>                      | Ditiotreitol                                                     |
| <b>EAATs</b>                    | Transportadores de aminoácidos excitadores                       |
| <b>EDTA</b>                     | Ácido Etilen-di-amino-tetracético                                |
| <b>EGTA</b>                     | Ácido Etilen-glicol-diamino- tetracético                         |
| <b>EH</b>                       | Encefalopatía hepática                                           |
| <b>EHM</b>                      | Encefalopatía hepática mínima                                    |
| <b>ELISA</b>                    | Ensayo inmunoenzimático<br>(Enzyme Linked Inmunoabsorvent Assay) |
| <b>FHF</b>                      | Fallo hepático fulminante o agudo                                |
| <b>GABA-A</b>                   | Ácido Gamma aminobutírico                                        |
| <b>GAP</b>                      | Glutaminasa activada por fosfato                                 |
| <b>GGT</b>                      | Gamma-glutamil transferasa                                       |
| <b>GH</b>                       | Hormona del Crecimiento                                          |
| <b>Glu DH</b>                   | Glutamato deshidrogenasa                                         |
| <b>GLUT-1</b>                   | Transportador de glucosa tipo 1                                  |
| <b>GLYT-1</b>                   | Transportador de glicina tipo 1                                  |
| <b>GMP</b>                      | Guanosina-3',5'-monofosfato                                      |
| <b>GS</b>                       | Glutamina sintetasa                                              |
| <b>HIAA</b>                     | Acido Hidroxiindol acético                                       |
| <b>HIF-3<math>\alpha</math></b> | Factor inducible por hipoxia-3 $\alpha$                          |
| <b>HPLC</b>                     | Cromatografía líquida de alta resolución                         |

|                  |                                                                                                                                                                               |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>IAM</b>       | Iodoacetamida                                                                                                                                                                 |
| <b>Ig E</b>      | Inmunoglobulina E                                                                                                                                                             |
| <b>IGF-1</b>     | Factor semejante a la insulina tipo 1                                                                                                                                         |
| <b>IGFBP</b>     | Proteína de unión al IGF (IGF binding protein)                                                                                                                                |
| <b>IL</b>        | Interleuquina                                                                                                                                                                 |
| <b>IPG</b>       | Gradientes de pH inmovilizados                                                                                                                                                |
| <b>KLH</b>       | Hemocianina de lapa                                                                                                                                                           |
| <b>LCB</b>       | Ligadura del conducto biliar                                                                                                                                                  |
| <b>LCR</b>       | Líquido cefaloraquídeo                                                                                                                                                        |
| <b>LOLA</b>      | <i>L</i> -ornitina- <i>L</i> -aspartato                                                                                                                                       |
| <b>MALDI-TOF</b> | Ionización por desorción de láser asistida por matriz - Tiempo de vuelo.<br>(Matriz-Assisted-Laser-Desorption-Ionization, Time-of-flight)                                     |
| <b>MAO-A</b>     | Monoamino oxidasa A                                                                                                                                                           |
| <b>MTR</b>       | Tasa de transferencia de magnetización                                                                                                                                        |
| <b>nLC/MS/MS</b> | Nano-cromatografía líquida/espectrometría de masas en tandem                                                                                                                  |
| <b>NMDA</b>      | <i>N</i> -Metil- <i>D</i> - ácido aspártico                                                                                                                                   |
| <b>N-NEDA</b>    | <i>N</i> -(1-naftil)etilendiamina                                                                                                                                             |
| <b>NO</b>        | Óxido nítrico                                                                                                                                                                 |
| <b>NOS</b>       | Nitrito óxido-sintasa                                                                                                                                                         |
| <b>NO-Tyr</b>    | Tirosina nitrada                                                                                                                                                              |
| <b>NSF</b>       | Factor sensible a la <i>N</i> -etilmaleinimida                                                                                                                                |
| <b>OPA</b>       | Ortoftalaldehído                                                                                                                                                              |
| <b>PAGE-SDS</b>  | Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS                                                                                                                 |
| <b>PBS</b>       | Tampón fosfato salino                                                                                                                                                         |
| <b>PDB</b>       | Base de datos de proteínas (Protein Data Bank)                                                                                                                                |
| <b>PHES</b>      | Bateria de tests psicométricos usados en el diagnóstico de EH.<br>Validados en la página web de la RED Nacional de EH<br>( <a href="http://www.redeh.org">www.redeh.org</a> ) |
| <b>PM</b>        | Permeabilidad mitocondrial                                                                                                                                                    |
| <b>PMSF</b>      | Fenil-metil-sulfonilo                                                                                                                                                         |
| <b>PTIC</b>      | Fenilisotiocianato                                                                                                                                                            |
| <b>PTP</b>       | Permeability transition pore<br>(Poro específico de la membrana mitocondrial interna)                                                                                         |
| <b>RIS</b>       | Respuesta inflamatoria sistémica                                                                                                                                              |
| <b>RL</b>        | Radicales libres                                                                                                                                                              |
| <b>ROS</b>       | Especies reactivas de oxígeno                                                                                                                                                 |

|              |                                                                             |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <b>RPB</b>   | Receptor periférico de benzodiazepinas                                      |
| <b>SNC</b>   | Sistema nervioso central                                                    |
| <b>SOD</b>   | Superóxido dismutasa                                                        |
| <b>TCA</b>   | Ácido tricloroacético                                                       |
| <b>TFA</b>   | Ácido trifluoracético                                                       |
| <b>TEMED</b> | <i>N,N,N',N'</i> -Tetrametiletilendiamina                                   |
| <b>TIFF</b>  | Tagged Image File Format"<br>(formato de archivo de imágenes con etiquetas) |
| <b>TNF</b>   | Factor de Necrosis Tumoral                                                  |

# **INDICE**

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>                                                                    | 1  |
| <b>1. ENCEFALOPATÍA HE PÁTICA</b>                                                         | 3  |
| <b>1.1. Nuevos conceptos en la Fisiopatología de la Encefalopatía Hepática</b>            | 5  |
| <b>1.2. Hiperamonemia como causa fundamental del desarrollo de Encefalopatía Hepática</b> | 11 |
| • Producción de amonio: papel del intestino delgado y del riñón en la hiperamonemia       | 15 |
| • Metabolismo cerebral del amonio                                                         | 21 |
| • Desarrollo de edema cerebral de bajo grado                                              | 22 |
| • Papel del óxido nítrico                                                                 | 26 |
| • Modificación de la expresión de proteínas                                               | 27 |
| • Respuesta inflamatoria sistémica                                                        | 29 |
| <b>2. HIPERAMONIEMIA Y ESTRÉS OXIDATIVO</b>                                               | 31 |
| <b>3. GLUTAMINASAS</b>                                                                    | 38 |
| <b>4. MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LA EH</b>                                         | 44 |
| • Modelo de derivación o anastomosis porto-cava                                           | 50 |
| <b>5. PERSPECTIVAS TERAPEÚTICAS</b>                                                       | 52 |
| <b>II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b>                                                    | 65 |

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| <b>III. MATERIALES Y METODOS</b>                            | 67 |
| <b>1. MATERIAL BIOLÓGICO</b>                                | 69 |
| <b>2. MODELO EXPERIMENTAL DE ANASTOMOSIS</b>                |    |
| <b>O DERIVACIÓN PORTO-CAVA</b>                              | 70 |
| 2.1. Método anestésico                                      | 71 |
| 2.2. Técnica quirúrgica                                     | 71 |
| 2.3. Sacrificio                                             | 77 |
| <b>3. TRATAMIENTO CON IGF-1</b>                             | 77 |
| <b>4. AISLAMIENTO DE TEJIDOS Y TOMA DE MUESTRAS</b>         | 78 |
| <b>4.1. Homogenizados de tejidos</b>                        | 78 |
| 4.1.1. Homogenizados de enterocito                          | 78 |
| 4.1.2. Homogenizados de cerebro                             | 79 |
| 4.1.3. Homogenizados de riñón de cerdo                      | 80 |
| <b>4.2. Homogenizados de mitocondrias</b>                   | 81 |
| 4.2.1. Obtención de mitocondrias sinápticas y no sinápticas | 82 |
| <b>5. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS</b>                       | 84 |
| <b>5.1. Determinación de amonio</b>                         | 84 |
| 5.1.1. Determinación de amonio en sangre                    | 85 |
| 5.1.2. Determinación de amonio en tejidos                   | 85 |
| <b>5.2. Determinación de óxido nítrico</b>                  | 86 |
| <b>5.3. Determinación de la glutaminasa</b>                 | 87 |
| 5.3.1. Método de Lund                                       | 87 |
| 5.3.2. Método de HEINI                                      | 89 |
| <b>5.4. Determinación de proteínas</b>                      | 92 |

|                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>6. TÉCNICAS ANALÍTICAS</b>                                                 | 93  |
| <b>6.1. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida</b>               | 93  |
| 6.1.1. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida                        | 94  |
| 6.1.1. a. <u>Tinción con Coomassie</u>                                        | 95  |
| 6.1.1. b. <u>Tinción con Plata</u>                                            | 96  |
| 6.1.2. Secado y conservación de los geles                                     | 97  |
| <b>6.2. Análisis de aminoácidos por HPLC</b>                                  | 98  |
| 6.2.1. Análisis de Glutamina                                                  | 98  |
| <u>Derivatización con feniltioisocianato (PTIC)</u>                           | 99  |
| 6.2.2. Análisis de aminoácidos libres                                         | 100 |
| <b>6.3. Análisis por espectrometría de masas</b>                              | 107 |
| 6.3.1. Control de calidad del péptido por MALDI-TOFF                          | 107 |
| 6.3.2. Preparación de las muestras para espectrometría de masas nLc-ESI-MS/MS | 108 |
| ▪ Preparación de las muestras para el análisis por Espectrometría de masas.   |     |
| Digestión <i>in gel</i>                                                       | 109 |
| ▪ Eliminación de sales antes de la inyección en el Masas                      | 110 |
| ▪ Obtención de espectros                                                      | 111 |
| ▪ Análisis de los espectros mediante ayudas bioinformáticas                   | 112 |
| 6.3.3. Análisis de las bandas oxidadas                                        | 112 |

|                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>7. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS</b>                                                              | 113 |
| <b>7.1. Generación de anticuerpos</b>                                                         | 113 |
| 7.1.1. Selección de un péptido inmunogénico                                                   | 113 |
| 7.1.2. Síntesis del péptido                                                                   | 115 |
| 7.1.3. Acoplamiento del péptido a KLH                                                         | 115 |
| 7.1.4. Inmunización en conejos                                                                | 117 |
| 7.1.5. Purificación de los anticuerpos                                                        | 118 |
| <b>7.2. Titulación del anticuerpo: Análisis por DOT-BLOT</b>                                  | 118 |
| <b>7.3. Inmunodetección de proteínas: Western-Blot (Inmunoblot)</b>                           | 119 |
| <b>7.4. Determinación de la oxidación proteica por la cuantificación de grupos carbonilos</b> | 123 |
| <b>8. EQUIPOS UTILIZADOS</b>                                                                  | 125 |
| <b>9. PROCEDENCIA DE COMPUESTOS QUÍMICOS Y BIOQUÍMICOS</b>                                    | 126 |
| <b>10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>                                                               | 127 |
| <br>                                                                                          |     |
| <b>IV. RESULTADOS</b>                                                                         | 129 |
| <b>1. INFLUENCIA DE LA DPC SOBRE EL PESO</b>                                                  | 131 |
| <b>2. INFLUENCIA DE LA DPC EN LA PRODUCCIÓN DE AMONIO</b>                                     | 134 |
| 2.1. Medida de amonio en sangre                                                               | 134 |
| 2.2. Medida de amonio en tejidos                                                              | 138 |



|                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>3. INFLUENCIA DE LA DERIVACIÓN PORTO CAVA EN EL PERFIL DE AMINOÁCIDOS EN SANGRE</b>     | 146 |
| <b>4. INFLUENCIA DE LA DERIVACIÓN PORTO CAVA EN LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO EN SANGRE</b> | 152 |
| <b>5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON IGF-1 DE RATAS CON DERIVACIÓN PORTO CAVA</b>              | 153 |
| 5.1. Efecto del tratamiento con IGF-1 sobre el peso de los animales con DPC                | 153 |
| 5.2. Efecto del tratamiento con IGF-1 sobre la producción de amonio en ratas con DPC       | 156 |
| 5.3. Efecto del tratamiento con IGF-1 en el perfil de aminoácidos en sangre                | 157 |
| 5.4. Efecto del tratamiento con IGF-1 sobre los niveles de Óxido Nítrico en sangre         | 158 |
| <b>6. HIPERAMONIEMIA Y ACTIVIDAD GLUTAMINASA EN DIFERENTES TEJIDOS EXTRAHEPÁTICOS</b>      | 162 |
| 6.1. Caracterización cinética de la glutaminasa de tipo-K                                  | 162 |
| a) Método de Lund (medida por acoplamiento enzimático)                                     | 162 |
| b) Método de Heini (medida directa de producto)                                            | 165 |
| 6.2. Inhibición de la actividad glutaminasa "in vitro"                                     | 167 |

|                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| a) Inhibición por Histidina                                                                                                       | 167 |
| b) Inhibición por Glutamato                                                                                                       | 168 |
| c) Inhibición por Lactitol                                                                                                        | 169 |
| d) Inhibición por Neomicina                                                                                                       | 170 |
| e) Inhibición por Flumazenilo                                                                                                     | 171 |
| <b>6.3. Actividad glutaminasa en intestino</b>                                                                                    | 172 |
| i) <i>Actividad PAG intestinal</i><br>(Método de Lund)                                                                            | 173 |
| ii) <i>Actividad PAG intestinal</i><br>(Método de Heini)                                                                          | 173 |
| <b>6.4. Actividad glutaminasa en riñón</b>                                                                                        | 175 |
| <b>6.5. Actividad glutaminasa en astrositos</b><br>de diferentes áreas cerebrales                                                 | 179 |
| <b>7. INFLUENCIA DE LA HIPERAMONIEMIA</b><br><b>EN LA EXPRESIÓN DE GLUTAMINASA EN</b><br><b>DIFERENTES TEJIDOS EXTRAHEPÁTICOS</b> | 184 |
| <b>7.1. Obtención de anticuerpos anti-GAP</b>                                                                                     | 184 |
| 7.1.1. Selección de un péptido inmunogénico                                                                                       | 184 |
| 7.1.2. Síntesis del péptido                                                                                                       | 187 |
| 7.1.3. Inmunización y purificación de los<br>anticuerpos                                                                          | 190 |
| 7.1.4. Titulación de los anticuerpos<br>(Dot-Blot)                                                                                | 190 |
| <b>7.2. Cuantificación de la expresión de</b><br><b>la enzima glutaminasa en intestino y</b><br><b>riñón en ratas con DPC</b>     | 192 |
| <b>7.3. Cuantificación de la expresión</b><br><b>de la enzima glutaminasa en cerebro</b>                                          | 196 |

|                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>8. INFLUENCIA DE LA HIPER AMONIEMIA<br/>EN LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS EN<br/>DIFERENTES ÁREAS CEREBRALES</b> | 197 |
| 8.1. Cuantificación de grupos carbonilos                                                                       | 197 |
| 8.2. Identificación de proteínas<br>sensibles a la oxidación                                                   | 201 |
| <b>V. DISCUSIÓN</b>                                                                                            | 203 |
| <b>1. MODELOS ANIMALES</b>                                                                                     | 205 |
| • Elección del modelo                                                                                          | 205 |
| • Recomendaciones para la estandarización<br>de los modelos de hepatopatía crónica                             | 207 |
| • Anastomosis porto-cava experimental                                                                          | 210 |
| <b>2. EFECTO DE LA DERIVACIÓN PORTO-CAVA<br/>SOBRE EL PESO, EL AMONIO Y EL<br/>PERFIL DE AMINOÁCIDOS</b>       | 211 |
| <b>3. FLUJO DE AMONIO ENTRE ÓRGANOS.<br/>ACTIVIDAD GLUTAMINASA</b>                                             | 222 |
| • Caracterización cinética de la<br>glutaminasa de tipo-K                                                      | 223 |
| • Inhibición de la actividad glutaminasa "in vitro"                                                            | 225 |
| • Actividad glutaminasa en intestino                                                                           | 227 |
| • Actividad glutaminasa en riñón                                                                               | 229 |
| • Actividad glutaminasa en cerebro                                                                             | 231 |
| • Papel de la glutaminasa en los<br>tejidos extrahepáticos                                                     | 233 |
| <b>4. OXIDACIÓN PROTEICA</b>                                                                                   | 238 |

|                          |     |
|--------------------------|-----|
| <b>VI. CONCLUSIONES</b>  | 249 |
| <b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> | 253 |

# ***I. INTRODUCCION***

## **1. ENCEFALOPATIA HEPATICA**

La encefalopatía hepática (EH) es un síndrome neurológico-psiquiátrico. Se caracteriza por alteraciones de la conciencia y de la conducta, trastornos de la personalidad, alteraciones electroencefalográficas, signos neurológicos fluctuantes, acumulación de manganeso en cerebro, aparición de astrocitos tipo II de Alzheimer, manifestaciones de estrés oxidativo y edema cerebral.

La EH puede ser aguda y reversible o crónica y progresiva. En los casos graves puede llegar a coma irreversible y muerte (**Ferenci y col., 2002**).

Clínicamente es una grave complicación de la cirrosis hepática, tanto por las serias manifestaciones clínicas, como por las necesidades terapéuticas y su pronóstico.

Numerosas hipótesis intentan explicar la patogenia de este síndrome. Estas teorías abarcan a muchas y diversas sustancias como responsables de la disfunción cerebral y de las alteraciones estructurales y/o metabólicas que modifican la función neurotransmisora como: amonio, manganeso, ácido  $\gamma$ -amino butírico y otros neurotransmisores.

Aunque, actualmente, el problema no está resuelto, la opinión general es que el amonio juega un papel crucial en el desarrollo de esta patología (**Conn y Bircher, 1994**).

La hiperamoniemia es un factor fundamental en la patogenia de la EH. Si bien, la teoría de la neurotoxicidad del amonio no está del todo clara, tiene numerosos elementos a su favor, como es que el 90% de los pacientes con EH presentan niveles altos de amonio en sangre. Además, la hiperamoniemia origina disfunción cerebral tanto en animales de experimentación, estudiado ampliamente en el modelo de ratas con hiperamonemia inducida por dieta rica en amonio, como en personas con alteración del ciclo de la urea. Por otro lado, en el líquido cefalorraquídeo (LCR) se encuentran altos niveles de glutamina como vía de detoxicación cerebral de amonio, que se correlacionan adecuadamente con el grado de EH (**Romero-Gómez y col., 2004**).

Hoy día, la base del tratamiento de la EH se basa en medidas dirigidas a evitar la formación, y el paso a la circulación, de sustancias nitrogenadas intestinales, en general, y de amonio en particular (**Ferenci y col., 2002; Conn y Bircher, 1994**). No obstante no existe un tratamiento totalmente eficaz para la cura de la EH.

En la presente tesis se ha estudiado el papel de la hiperamoniemia sobre la actividad glutaminasa en diferentes tejidos y el estrés oxidativo, en relación a mecanismos fisiopatológicos y moleculares de la EH en un modelo animal (ratas con derivación porto-cava). Para este trabajo se han puesto a punto diferentes metodologías desarrolladas en nuestro laboratorio, a partir de técnicas muy diversas que

abarcan técnicas de biología molecular, proteómica, así como técnicas analíticas y bioquímicas clásicas.

En esta introducción se muestra una visión global de la EH, haciendo especial hincapié en algunos de los nuevos conceptos en este campo, como por ejemplo, la influencia de la hiperamonemia en diferentes tejidos y su papel en el estrés oxidativo cerebral. También se describen los distintos modelos animales que se utilizan actualmente para el estudio de la EH y la toxicidad del amonio, resaltando la importancia, dentro de las perspectivas en la química farmacéutica, del desarrollo de un modelo animal óptimo para el ensayo de diferentes tratamientos.

### **1. 1. Nuevos conceptos en la fisiopatología de la Encefalopatía Hepática**

La encefalopatía hepática es un complejo síndrome neuropsiquiátrico que aparece en pacientes con disfunción hepática o grandes comunicaciones portosistémicas, que hacen que las sustancias nitrogenadas, procedentes tanto de la digestión intestinal como de fuentes todavía no establecidas, alcancen el cerebro sin la depuración que supone su paso por el hígado y dan lugar a los signos característicos de la EH. La EH se caracteriza por alteraciones de la conciencia y de la conducta, trastornos de la personalidad, signos neurológicos fluctuantes, asterixis o "temblor aleante", y alteraciones electroencefalográficas características. En los casos graves se puede llegar a un coma irreversible y a la muerte. Como ya se



## Introducción

ha indicado, la EH puede ser aguda y reversible o crónica y progresiva.

En la **Tabla-11** se muestran los distintos tipos de EH. Se clasifica en: tipo A: cuando acontece en pacientes con fallo hepático agudo; tipo B: aparece en pacientes con comunicaciones (by-pass) porto-sistémicos y tipo C: la EH ocurre en pacientes con cirrosis hepática (**Ferenci y col., 2002**).

| Tipos                   | Nomenclatura                                                                            |                         |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <b>A</b>                | Encefalopatía en la insuficiencia hepática aguda grave                                  |                         |
| <b>B</b>                | Encefalopatía en pacientes con comunicaciones porto sistémicas sin disfunción hepática. |                         |
| <b>C</b>                | Encefalopatía en la cirrosis hepática con hipertensión portal y comunicaciones porto    |                         |
|                         | <b>Categorías</b>                                                                       | <b>Subtipos</b>         |
|                         | EH Episódica                                                                            | Con factor precipitante |
|                         |                                                                                         | Espontánea              |
|                         |                                                                                         | Recurrente              |
|                         | EH Persistente                                                                          | Leve                    |
| Grave                   |                                                                                         |                         |
| Tratamiento-dependiente |                                                                                         |                         |
| EH Mínima (EHM)         |                                                                                         |                         |

**Tabla-11.** Clasificación de la Encefalopatía Hepática

Durante años se ha aceptado que los mecanismos patogénicos implicados en la EH del tipo A eran distintos de los que acontecen en la EH del tipo C. Recientemente se ha constatado que las similitudes son más que las diferencias. Por

ejemplo, el edema cerebral, que contribuye al cuadro clínico e incrementa la mortalidad en el conjunto de pacientes con encefalopatía, se consideraba exclusivo de la EH de tipo A y se ha confirmado que puede jugar un papel fundamental en el desarrollo de las manifestaciones clínicas de la EH en pacientes con cirrosis hepática (**Córdoba y col. 2001**). También, la respuesta inflamatoria sistémica (RIS) puede ser un factor patogénico importante en ambos tipos de EH (**Muckart y Bhagwanjee, 1997**).

En algunos estudios existe una falta de correlación entre el grado de EH y amoniemia (venosa o arterial) y esto supuso la consideración de otros factores, además del amonio, como el aumento del tono gabaérgico, por el incremento en el número o de la sensibilidad de los receptores cerebrales de GABA/Benzodiazepinas, o bien la presencia en sangre de sustancias semejantes a las benzodiazepinas (*benzodiazepin-like*), endógenas, de origen intestinal (**Ahboucha y col., 2003**).

Otra hipótesis se basa en el conocido trastorno del patrón de aminoácidos plasmáticos que aparece en los pacientes cirróticos, con aumento de los aminoácidos aromáticos respecto a los ramificados. Esto supondría el predominio de los aminoácidos aromáticos en el paso competitivo al cerebro, con la formación de "falsos neurotransmisores", que darían lugar a los signos de la EH al desplazar a los "verdaderos" (**Herneth y col., 1998**).

Las diferentes hipótesis de los “falsos neurotransmisores” (octopamina, feniletanolamina), los mercaptanos, los ácidos grasos de cadena corta o el GABA producido a nivel intestinal han ido sumando datos en contra a lo largo de los últimos años, de forma que hoy día no se aceptan como causas patogénicas directas en la EH.

Por último, el depósito de manganeso en los ganglios basales es responsable de que aparezca una señal hiperintensa en la fase T1 de la resonancia magnética cerebral y se ha asociado al desarrollo de signos extrapiramidales en pacientes con cirrosis hepática, por lo que dada su neurotoxicidad, parece ser responsable al menos de una parte del espectro de las manifestaciones clínicas de la EH (**Spahr y col. 2000**).

Básicamente, los nuevos conceptos en la fisiopatología de la EH giran sobre: **1)** una mayor evidencia del papel del amonio en la fisiopatología de la EH, **2)** un mejor conocimiento sobre el metabolismo del amonio en pacientes con cirrosis hepática, **3)** la importancia del desarrollo de edema cerebral de bajo grado en la EH de tipo C, **4)** la implicación del óxido nítrico intracerebral en la patogenia de la EH, **5)** el papel de la respuesta inflamatoria sistémica (RIS) en la patogenia de la EH y **6)** el estrés oxidativo (**Norenberg y col, 2004a**).

El desarrollo de EH condiciona un mal pronóstico de la enfermedad, de forma que se estima que la supervivencia se

sitúa en torno al 25% a los 3 años de sufrir un episodio de EH clínica (**Bustamante y col., 1999**). Por tanto, un reconocimiento precoz de alteraciones neuropsicológicas y su tratamiento es fundamental para el paciente cirrótico.

Desde 1978 se han publicado diferentes estudios sobre el diagnóstico de la Encefalopatía Hepática Mínima (EHM), considerada inicialmente latente, posteriormente subclínica y recientemente EHM. Se supone como la antesala para el desarrollo de episodios de EH. La EHM se define como una situación en la que los pacientes con cirrosis hepática compensada, muestran un número cuantificable de defectos neurofisiológicos, a pesar de un estado mental y neurológico aparentemente normal en la exploración clínica rutinaria (**Gitlin y col., 1986**).

La importancia diagnóstica de la EHM radica en cuatro aspectos:

i) Una alta prevalencia que afecta entre un 25% y un 33% de los pacientes con cirrosis hepática compensada (**Das y col., 2001**).

ii) La EHM se ha relacionado con un elevado riesgo de desarrollar EH clínica, por lo que se considera la primera manifestación en el espectro de alteraciones clínicas que tienen lugar en el síndrome de la EH (**Das y col., 2001; Hartmann y col., 2000**). En un estudio prospectivo, incluyendo 63 cirróticos, se comprobó que 5 de cada 6 pacientes que desarrollaron EH

presentaban datos de EHM en el estudio basal (**Romero-Gómez y col., 2001**). Por tanto, el estudio de la presencia de EHM es fundamental en el manejo del paciente cirrótico.

iii) La EHM deteriora la capacidad de conducción de vehículos. Inicialmente se postuló que la EHM podría tener un efecto negativo sobre la capacidad de conducir, basado en que un 60% de cirróticos no eran capaces de superar las pruebas de aptitud para la misma (**Schomerus y col., 1981**); sin embargo, un estudio piloto posterior demostró que los pacientes con EHM no presentaban diferencias con un grupo control corregidos por edad, sexo y profesión (**Srivastava y col, 1994**). Recientemente se ha demostrado que los pacientes con EHM requieren con más frecuencia la intervención del instructor para evitar accidentes de tráfico o errores en la conducción (36%) respecto a pacientes sin EHM (6%) y controles (8%) (**Wein y col., 2004**). Las discrepancias entre los estudios pueden ser explicadas por el número de muestras, la selección de pacientes (incluyen pacientes con antecedentes de EH) y la duración del test de conducción (90 minutos frente a 30 minutos).

iv) Por último, la EHM condiciona alteraciones en la calidad de vida. En un estudio realizado por investigadores holandeses se ha encontrado que cirróticos con EHM muestran un deterioro en las funciones de la vida diaria, valoradas mediante un cuestionario de Perfil de Impacto de la Enfermedad (**Groeneweg y col., 1998**), con mayor alteración en las categorías de tiempo libre, alerta, sueño/descanso, interacción

social, gestión del hogar, comportamiento emocional y trabajo (Groeneweg y col., 2000). El deterioro en la aptitud laboral puede considerarse como el mayor impacto en la calidad de vida, siendo especialmente importante la afectación en profesiones que requieren destreza manual, ya que, el déficit específico se aprecia en la función psicomotora e inteligencia práctica con el mantenimiento de la capacidad verbal (Schomerus y Hamster, 2001).

#### **1. 2. Hiperamonemia como causa fundamental del desarrollo de Encefalopatía Hepática**

La primera evidencia de la asociación entre la EH y el amonio se remonta a finales del siglo XIX (1893), concretamente al trabajo de Hahn y colaboradores (citado por Shawcross y Jalan, 2005) en el que se describe el "síndrome de intoxicación por carne" en perros. Estos investigadores observaron el desarrollo de estupor, desorientación y coma en perros sometidos a derivación porto-cava tras su alimentación con una comida rica en proteínas. La asociación entre hiperamonemia y las alteraciones del comportamiento en pacientes con cirrosis hepática se descubrió posteriormente, en los años 50 (Mc Demmott y Adams, 1954; Philips y col., 1952).

Se han publicado numerosos trabajos que demuestran el papel patogénico de la hiperamonemia en la E. Estas evidencias se basan en:

a) Que la **concentración de amonio** en sangre arterial aparece frecuentemente elevada en pacientes con diferentes grados de EH, encontrándose una correlación entre los niveles de amonio y la gravedad de la EH (**Ong y col., 2003**). La concentración arterial de amonio en voluntarios sanos suele ser del orden de 40-45  $\mu\text{moles/l}$  (**Clemmesen y Kondrup, 2000**), mientras que en pacientes con EH tipo C se detectan niveles del orden de 60-80  $\mu\text{moles/l}$  (**Plauth y col., 2000**). En algunos estudios se ha detectado la correlación entre los niveles de amonio y la gravedad de la EH; pero en otros no se detecta dicha correlación y además, más de la mitad de los pacientes cirróticos sin EH presentan hiperamoniemia. Estas discrepancias pueden explicarse por dos motivos: **1º**) Factores que influyen en la determinación de la amoniemia. Aunque parecería razonable que la amoniemia arterial reflejase de forma más fidedigna la concentración de amonio tóxico, se ha comprobado que la amoniemia arterial, venosa o la presión parcial de amonio, muestran un valor de correlación con el grado de EH similar entre ellas, por ello, la amoniemia venosa, aunque imperfecta, puede ser suficiente en el manejo del paciente con EH (**Nicolao y col., 2003**). Por otro lado, factores como el tabaquismo, cifras altas de GGT, el uso de diuréticos, la hipopotasemia, el pH urinario y el pH de la sangre, junto con el tiempo que transcurre desde la extracción de la muestra hasta su determinación, pueden influir en los resultados de la prueba (**Yurdaydin, 2003**). **2º**) Factores que modulan la extracción cerebral de amonio y su neurotoxicidad. El 11-20% (**Alman y col., 1956; Bessman y Bradley, 1955**) del amonio circulante pasa al cerebro a través

de la barrera hematoencefálica (BHE). En controles sanos la concentración de amonio en cerebro suele ser el doble que en sangre, mientras que en pacientes con cirrosis hepática, el cociente amonio cerebral/amonio plasmático está aumentado, siendo de aproximadamente 4 veces superior el amonio cerebral (**Lockwood y col., 1991**).

El paso del amonio desde la sangre hasta el cerebro a través de la barrera hematoencefálica depende de:

- el pH, estando aumentado en situaciones de alcalosis (**Stabenau y col., 1959**),
- el flujo cerebral, de forma que si este disminuye se produce un mayor tiempo de contacto y una mayor difusión
- la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (**Butterworth, 2002**).

Por tanto, todos estos factores, que dependen tanto de las condiciones en las que se realiza la determinación de la amoniemia como del propio individuo, pueden explicar la amplia variabilidad de resultados descritos respecto a la relación entre los niveles de amonio y la gravedad de la EH tipo C.

**b)** En estudios neuropatológicos se han detectado la presencia de **astrocitos Alzheimer tipo II**, tanto en cerebro de pacientes con EH tipo C (**Norenberg, 1987**) como en astrocitos en cultivo expuestos a concentraciones elevadas de amonio (**Gregorios y col., 1985**). Se acepta que la hiperamoniemia



cerebral induce cambios estructurales en el astrocito, de forma que éste adquiere la morfología característica de los astrocitos Alzheimer tipo II; aparición de un núcleo pálido, con nucleolo prominente y cromatina rechazada.

c) Estudios de neuroimágenes, como la **resonancia magnética espectroscópica**, han puesto de manifiesto un aumento de la concentración de glutamina cerebral. La glutamina es sintetizada en el interior de los astrositos, por acción de la enzima glutamina-sintetasa, en el proceso de detoxificación del amonio. En pacientes con EH tipo C se detecta una triada compuesta de elevación de glutamina junto al descenso de mioinositol y colina (**Spahr y col., 2000**), que surge como resultado de la metabolización cerebral del amonio hacia la síntesis de glutamina, provocando esta acumulación una salida de otros osmolitos como el mioinositol y la colina.

d) La hiperamoniemia parece estar implicada en la sobreexpresión de genes, como acuoporina IV, en el aumento de la permeabilidad de transición mitocondrial y en la disminución de la expresión de proteína glial ácida fibrilar. Elementos implicados en el desarrollo de edema cerebral. Nótese que el edema cerebral de bajo grado se considera un signo patogénico muy importante en la fisiopatología de la EH.

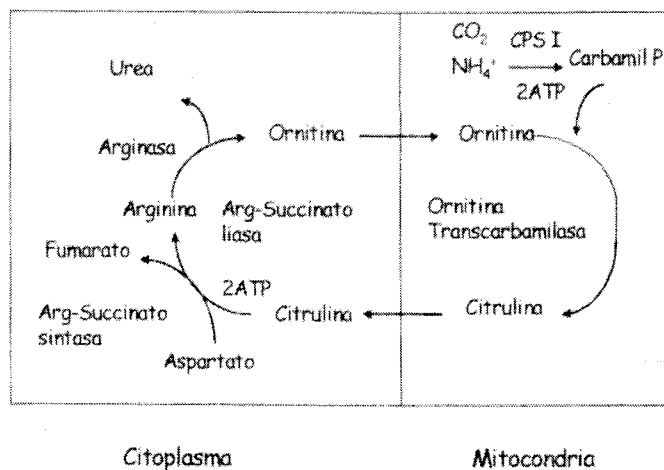
e) Ciertos componentes de la respuesta inflamatoria sistémica, como el factor de necrosis tumoral (TNF), y otras citoquinas, como IL-6, IL1 $\alpha$ , pueden potenciar el efecto

neurotóxico del amonio (Jalan y Kapoor, 2003). También, la hiperamoniemia puede inducir la síntesis de óxido nítrico intraneuronal que a su vez puede bloquear la única vía de detoxicación del amonio y perpetuar el efecto tóxico de éste.

- **Producción de amonio: papel del intestino delgado y el riñón en la hiperamoniemia**

El metabolismo del amonio depende básicamente de tres vías metabólicas:

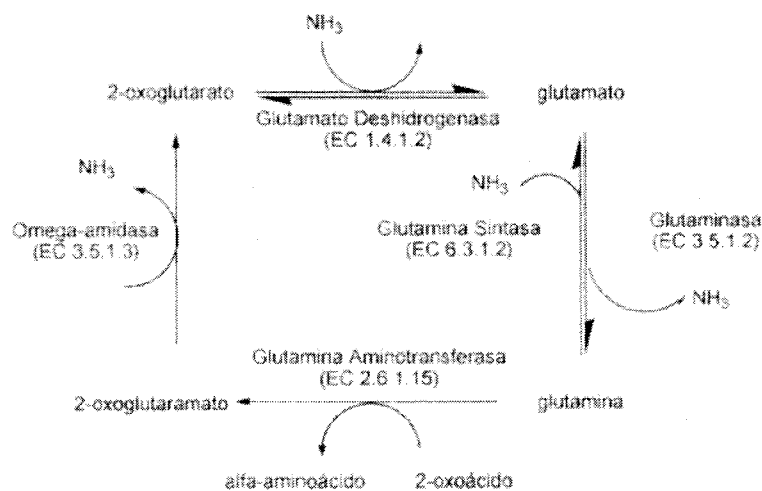
- i) el ciclo de la urea, que permite la eliminación de amonio mediante la síntesis de urea (**Figura-11**),
- ii) la síntesis de glutamina por acción de la glutamina sintetasa,
- iii) la desamidación de la glutamina, por la actividad glutaminasa (**Figura-12**).



**Figura-11.** Representación esquemática del ciclo de la urea.

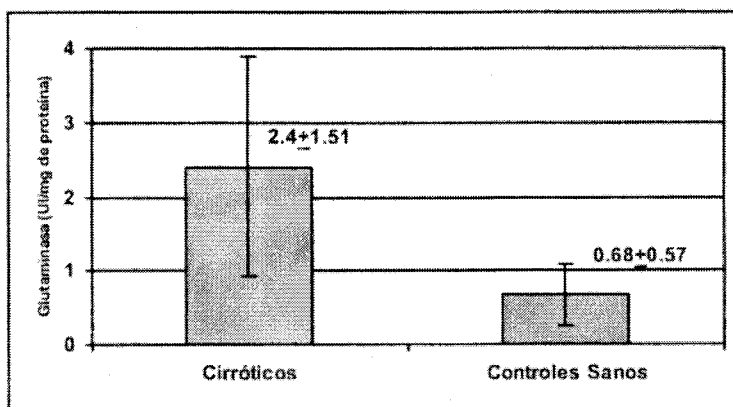
## Introducción

El ión amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) es la forma más abundante en situaciones basales, mientras que la forma gaseosa (amoníaco,  $\text{NH}_3$ ) supone sólo el 2%. La fuente principal de amonio es el intestino delgado. Inicialmente se publicó que la mayor parte del amonio se producía a partir del desdoblamiento de productos nitrogenados llevado a cabo por las bacterias del colon (**Wolpert y col., 1970**). Posteriormente se aceptó que este mecanismo era responsable del 50% de la producción de amonio (**Weber y Veach, 1979**); mientras que estudios recientes demuestran que el amonio se genera básicamente en el intestino delgado y es producido a partir de la desamidación de la glutamina, siendo el colon responsable del 10% - 15% del amonio generado (**Olde Damink y col., 2002**).



**Figura-I2.** Reacciones metabólicas implicadas en la síntesis de glutamina y metabolismo del amonio.

(GAP, PAG, en inglés). Esta enzima está elevada cuatro veces en pacientes con cirrosis hepática en comparación con controles sanos (**Figura-13**) y, a su vez, se relaciona con la presencia de EHM, así como con la concentración intracerebral de glutamina (**Grande y col., 2003**). Además, la administración oral de glutamina induce un fuerte incremento de la amoniemia venosa en pacientes con cirrosis hepática y EHM, mientras que este aumento no se aprecia en controles sanos o en cirróticos después del trasplante hepático. Los resultados de esta prueba dependen de la función hepática, del grado de comunicaciones portosistémicas y de la actividad glutaminasa intestinal, y por tanto, avalan la importancia de la producción intestinal de amonio, independiente de la acción de las bacterias (**Romero-Gómez y col., 2002**).



**Figura-13. Actividad glutaminasa fosfato-dependiente tipo renal (K) en intestino delgado.** Pacientes con cirrosis hepática (n=49) frente a controles sin hepatopatía (n=36) (medido en extracto de mitocondrias de biopsias endoscópicas duodenales) (Romero-Gómez y col., 2002).

El amonio producido en el intestino alcanza el hígado por vía portal y es detoxicado mediante el ciclo de la urea, cuyas enzimas se localizan en los hepatocitos periportales. Es la vía metabólica más eficaz, ya que retira más del 80% del amonio portal y no consume energía. En caso necesario, el amonio es metabolizado hacia la síntesis de glutamina mediante la actividad glutamina sintetasa localizada en los hepatocitos pericentrales (Figura-14). En la cirrosis hepática se ha constatado que la capacidad de síntesis de urea disminuye paralelamente a la disfunción hepática y además resulta insensible a las principales vías de estimulación, como la concentración de alanina (Krahenbuhl y col., 1991). Por ello, en esta situación, el músculo juega un papel fundamental en la

destoxicación del amonio, de forma que representa una vía más eficaz que el propio hígado. Se basa en una captación neta de amonio para la síntesis de glutamina por la actividad glutamina sintetasa; sin una liberación posterior del aminoácido, de forma que el músculo extrae la mayor parte del amonio arterial y apenas libera glutamina, permaneciendo en el músculo como reserva de amonio no tóxico (Lockwood y col., 1979).

El riñón posee, al igual que el intestino, actividad glutaminasa, por lo que produce amonio derivado de la desamidación de la glutamina. En condiciones normales un tercio de este amonio es eliminado por la orina, mientras que el resto pasa a la circulación sistémica (Figura- I4).

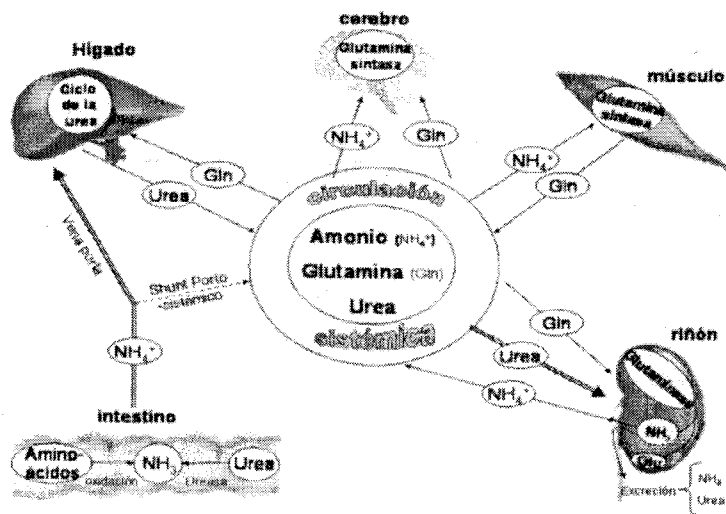


Figura-I4. Representación esquemática de la circulación de amonio y glutamina entre los diferentes órganos implicados en su metabolismo.

En situaciones de hiperamonemia y/o acidosis el cociente se invierte, mientras que se acentúa en condiciones de hipopotasemia. La génesis de amonio renal, producida básicamente por la desamidación de la glutamina en el túbulo proximal, depende de la actividad glutaminasa, de la concentración de glutamina en el túbulo proximal y del flujo luminal (**Good y DuBose, 1987**). Además, el metabolismo del amonio y la glutamina a nivel renal parece estar modulado por el equilibrio ácido-base, el flujo renal y los niveles plasmáticos de angiotensina II (**Hamm y Simon, 1990**), de forma que las alteraciones hemodinámicas del síndrome de hipertensión portal están implicadas en la amoniagénesis renal y por ello en la patogenia de la EH.

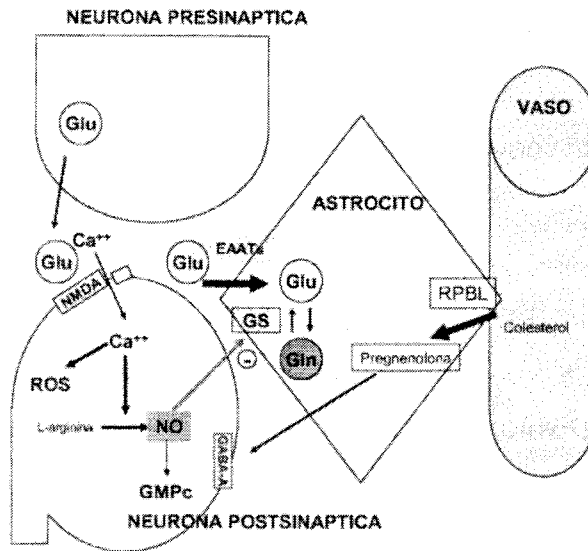
La hemorragia digestiva por varices esófago-gástricas o una situación simulada, mediante la administración de una concentración de diferentes aminoácidos sin leucina (aminoácido ausente en la hemoglobina), se ha asociado a un aumento de la producción renal de amonio y su liberación al torrente circulatorio (**Olde Damink y col., 2003**). Por otra parte, se ha demostrado que la reposición de volumen en pacientes cirróticos se acompaña de una mayor excreción renal de amonio y un descenso de la amoniemia plasmática (**Jalan y Kapoor, 2003**), lo que avalaría esta vía de eliminación como una potencial diana terapéutica.

- **Metabolismo cerebral del amonio**

La principal ruta del metabolismo del amonio en el cerebro es su incorporación al aminoácido glutamato para formar glutamina, reacción catalizada por la enzima glutamina-sintetasa, localizada exclusivamente en los astrocitos (**Norenberg y Martínez-Hernández, 1979**). Un pequeño porcentaje de amonio es metabolizado por vía de la aminación reductiva del 2-oxoglutarato a glutamato. En las neuronas se detecta actividad glutaminasa, encargada de sintetizar glutamato a partir de la glutamina (**Cooper y Lai, 1987**). Recientemente se ha implicado (**Waagepetersen y col, 2000**) la transaminación de glutamato a alanina, como un importante paso en la transferencia intracelular de amonio.

La acumulación de amonio en el cerebro provoca una serie de cambios neuroquímicos que son responsables de, al menos en parte, las alteraciones neuropsiquiátricas detectadas en la EH (**Figura-I5**).





**Figura-15. Interacción entre las neuronas, astrocitos y endotelio vascular.** Glu: Glutamato. Gln: Glutamina. GS: Glutamina sintetasa. EAATs: Receptores de glutamato. RPB: Receptor periférico de benzodiazepinas. NMDA: Receptor de glutamato. ROS: Especies reactivas de oxígeno. NO: Oxido nítrico.

- **Desarrollo de edema cerebral de bajo grado**

La hiperamoniemia induce cambios morfológicos en el astrocito (astrocitos Alzheimer tipo II). Estas alteraciones estructurales parecen ser el final de un proceso que comienza con el edema astrocitario. De hecho, en situaciones de hiperamoniemia, se produce un descenso en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial, una proteína del citoesqueleto encargada de la regulación del volumen celular (Sobel y col., 1981). Por otro lado, la expresión de acuoporina IV, una proteína

de membrana que regula el movimiento de agua a través de la membrana celular, está elevada en cultivos de astrocitos sometidos a condiciones de hiperamoniemia, lo que llevaría a una sobreexpresión en el desarrollo de edema astrocitario (**Rama-Rao y col., 2003a**). Otro fenómeno que promueve la hiperamoniemia es el aumento de la permeabilidad mitocondrial (PM). Consiste en la apertura de un poro específico (PTP), en la membrana interna de la mitocondria, que permite el colapso de los gradientes iónicos y parece que está implicado en el inicio del proceso de apoptosis celular (**Kim y col, 2003**). Aunque la estructura proteica del poro no se conozca bien, parece que el receptor periférico de benzodiazepinas forma parte del poro. Este podría ser el mecanismo por el cual se ha asociado el consumo de benzodiazepinas con la aparición de edema cerebral. Este fenómeno de aumento de la permeabilidad mitocondrial es inhibido por la ciclosporina A y favorecido por factores que se asocian a la patogénesis de la EH como los radicales libres, el aumento del calcio intracelular, el óxido nítrico, el pH alcalino y la concentración de glutamina (**Rama-Rao y col., 2003d**). La inhibición completa de la apertura del poro específico de permeabilidad mitocondrial mediante ciclosporina A evita el desarrollo de edema astrocitario (**Rama-Rao y col., 2003b**). Por tanto, aunque estos datos se han obtenido a partir de modelos animales con disfunción hepática e hiperamoniemia o en cultivos de astrocitos, la expresión de proteína ácida fibrilar glial, de acuoporina IV y de la permeabilidad mitocondrial de la transición, están promovidos por la hiperamoniemia y son partícipes en el desarrollo del

edema astrocitario, base fundamental para el desarrollo de edema cerebral de bajo grado. Por otra parte, situaciones de hiponatremia, o el aumento de producción del factor de necrosis tumoral (TNF) se han asociado también con el desarrollo del edema astrocitario (**Haussinger y col., 2002**).

En pacientes con cirrosis hepática se ha detectado edema cerebral de bajo grado y se ha relacionado con la patogenia de la EH. El edema astrocitario altera el funcionamiento del astrocito, de forma que no se desarrollan las principales funciones de mantenimiento del medio extracelular perineuronal, es decir, captación de potasio sobrante, liberación de neurotransmisores y canalización de las señales intercelulares cerebrales (**Haussinger y col., 2000**), lo que conlleva una neurotransmisión defectuosa, con alteración del transporte de metabolitos entre el astrocito y la neurona, y por último la disfunción neuronal y el desarrollo de EH.

El edema cerebral de bajo grado puede ser detectado mediante resonancia magnética analizando la tasa de transferencia de magnetización (MTR). Un descenso de señal de MTR se relaciona con la presencia de edema cerebral de bajo grado y además con la existencia de alteraciones neuropsicológicas (EHM) (**Córdoba y col., 2001**). Este edema de bajo grado desaparece tras el trasplante hepático, de forma paralela a la desaparición de la EHM.

El metabolismo cerebral del amonio conduce a la síntesis y acumulación de la glutamina en el astrocito. Ha existido una gran controversia sobre el papel patogénico de la glutamina intracerebral en la EH. La detección de altas concentraciones de glutamina es la norma en estos pacientes. Se han encontrado niveles elevados de glutamina en tejido cerebral, en muestras de líquido cefalorraquídeo y en la visualización de la resonancia magnética nuclear espectroscópica (en ganglios basales y corteza cerebral), de pacientes fallecidos por coma hepático (**Butterworth, 2003**); y todo ello, a pesar de la no inducción de la glutamina sintetasa.

La glutamina es un aminoácido osmótico y por tanto su acumulación en el astrocito puede favorecer el edema astrocitario. No obstante, el bloqueo de la síntesis de glutamina mediante metionina-sulfoximina conduce a un control de los niveles de glutamina cerebrales; pero no evita completamente el desarrollo de edema cerebral (**Blei y col., 1994**). Además, el bloqueo de los receptores glutamatérgicos NMDA conduce a un aumento de la glutamina cerebral sin que se desarrolle edema cerebral ni síntomas de EH (**Kosenko y col., 2003**). Por otra parte, el tratamiento con metoxamina-sulfoximina produce un descenso de los niveles de glutamina al tiempo que se aprecia un efecto beneficioso sobre la EH (**Brusilow, 2002**), por lo que se ha especulado que podría ejercer su efecto beneficioso a través de otros efectos metabólicos, evitando el aumento de la permeabilidad mitocondrial (**Bai y col., 2001**). Por tanto, parece que la glutamina es más una consecuencia de la

hiperamoniemia que la causa del desarrollo de edema y de la disfunción astrocitaria, que puede ser explicada por las modificaciones en la regulación de expresión de proteínas y receptores debidas a la hiperamoniemia.

Recientemente se ha postulado que la entrada de glutamina en la mitocondria permitiría su desdoblamiento a glutamato y amonio, por acción de la glutaminasa, lo que perpetuaría la situación de hiperamoniemia (**Rama-Rao y col., 2003, Zieminska y col., 2000**).

- **Papel del óxido nítrico**

Dado que en el cerebro no se encuentran enzimas del ciclo de la urea como la ornitín-transcarbamilasa o la carbamoil-fosfato sintetasa-I, la única vía de destoxicación del amonio es la síntesis de glutamina. No obstante, y a pesar de la hiperamoniemia, no suele detectarse activación de la glutamina sintetasa.

El óxido nítrico es un potente inhibidor de la actividad glutamina sintetasa astrocitaria. En situaciones de hiperamoniemia el principal daño cerebral tiene lugar por la hiperestimulación de los receptores NMDA de glutamato en la neurona postsináptica. Esto se constató al demostrar que el bloqueo de estos receptores conseguía un control completo de las alteraciones bioquímicas y manifestaciones clínicas asociadas con la hiperamoniemia. La estimulación de los receptores NMDA produce la entrada de calcio en el interior de la célula y la activación de la calmodulina, que a su vez estimula

la actividad oxido nítrico sintetasa neuronal, produciendo altos niveles de óxido nítrico que difunden hasta el astrocito, bloqueando la actividad glutamina sintetasa, mediante su nitración (NO-Tyr), inhibiendo por tanto la única vía de detoxificación de amonio (**Master y col., 1999**) (**Figura-15**). Esta producción neuronal de óxido nítrico también podría ser responsable de las modificaciones del flujo cerebral detectado en pacientes con EH, caracterizado por una redistribución córtico-subcortical (**O'Carroll y col., 1991**), así como en el desarrollo de edema cerebral y el consiguiente deterioro cognitivo (**Rama-Rao y col., 2002**).

En pacientes con EH se ha detectado lipofucsina en el interior de los astrocitos Alzheimer tipo II, reflejando la existencia de peroxidación lipídica (**Norenberg, 1981**). Por otro lado, la formación de radicales libres tiene lugar en astrocitos cultivados en hiperamoniemia (**Murthy y col., 2001**). Por tanto, el estrés oxidativo detectado en los astrocitos puede estar implicado en la fisiopatología de la EH.

- **Modificación de la expresión de diferentes proteínas**

En la EH se modifica la expresión de diferentes proteínas:

**MAO-A.** Su expresión está aumentada en pacientes con EH. Esta enzima está localizada en la membrana externa mitocondrial de las neuronas monoaminérgicas y es la encargada de metabolizar la serotonina a 5-HIAA. Un aumento

de su actividad deteriora la neurotransmisión serotoninérgica. Se ha especulado que esta alteración podría ser responsable de la alteración del ritmo del sueño y de las modificaciones de la conducta (**Butterworth, 2001**).

**El receptor periférico de benzodiazepinas.** Es un complejo protéico heterodímero localizado en la membrana externa de las mitocondrias de células no neuronales (básicamente astrocitos). El aumento de la densidad de receptores se relaciona con la gravedad del deterioro cognitivo detectado en pacientes con EH. Este receptor podría estar implicado en la patogenia de la EH por la capacidad de aumentar el transporte de colesterol al interior de la mitocondria, lo que provoca la síntesis de neuroesteroides, que son potentes estimuladores del receptor GABA-A, lo que favorece la neuroinhibición (**Ahboucha y col., 2003**). Por otro lado, juegan un papel primordial en el mantenimiento del metabolismo celular, al formar parte del poro de la transición, implicado en la regulación de la permeabilidad mitocondrial y, por tanto, puede estar implicado en el desarrollo de edema de bajo grado.

**Receptores implicados en la neurotransmisión glutamatérgica.** La neurotransmisión glutamatérgica puede modificarse intensamente por la hiperamoniemia, mediante la modulación de la expresión de proteínas transportadoras del astrocito. Una infraexpresión de receptores EAAT-2 provoca un aumento del glutamato extracelular, impidiendo su recaptación hacia el astrocito y, por tanto, dificultando la síntesis de

glutamina en el interior del astrocito, lo que evita la destoxicación del amonio (**Knecht y col., 1997**).

**El transportador GLYT-1.** Esta proteína que transporta glicina, un neurotransmisor neuroinhibidor, también se encuentra infraexpresado en la EH, provocando acumulación de glicina extracelular y esta acumulación de glicina en la sinapsis puede provocar una alteración en la excitabilidad neuronal (**Zwingmann y col., 2002**).

**Receptores GLUT-1.** La hiperamoniemia genera una mayor expresión de receptores GLUT-1, encargados de introducir glucosa en el astrocito, lo que provoca una mayor glucólisis, con el consiguiente aumento de la producción de lactato (**Felipo y Butterworth, 2002; Butterworth, 2003**).

- **Respuesta inflamatoria sistémica**

En pacientes con fallo hepático fulminante y EH, la existencia de una respuesta inflamatoria sistémica (RIS) provoca un agravamiento rápido de la EH. La RIS tiene lugar frente a numerosas agresiones y se caracteriza por la presencia de al menos dos de los siguientes parámetros (**Muckart y Bhagwanjee, 1997**): fiebre ( $>38^{\circ}\text{C}$ ) o hipotermia ( $<36^{\circ}\text{C}$ ), taquicardia ( $> 90$  spm), taquipnea ( $> 20$  rpm), hipocapnia ( $< 32$  mmHg) o leucocitosis ( $>12.000$ ). Las citoquinas liberadas en esta situación pueden alcanzar el cerebro e interactuar con sus receptores en las células endoteliales o pueden ser generadas



en el propio astrocito. La interleuquina  $1\beta$ , secretada por los astrocitos, provoca un aumento de liberación de óxido nítrico, radicales libres y prostaglandinas, que son elementos favorecedores de la neurotoxicidad por amonio. Por otra parte, estas citoquinas pueden modular la neurotransmisión glutamatérgica, ya que inhiben la recaptación astrocitaria de glutamato, impidiendo la destoxicación del amonio (**Hu y col., 2000**). Por último, citoquinas como el TNF puede modular el flujo sanguíneo cerebral, al mismo tiempo que está implicado en la patogenia de la EH, ya que se ha demostrado que puede inducir edema astrocitario (**Bender y col., 1992**). Por todo ello, la RIS, podría formar parte del repertorio patogénico de la EH, ya que favorecería la toxicidad del amonio y además podría implicarse en el desarrollo de edema cerebral de bajo grado. Recientemente, se ha constatado que la RIS influye directamente en la aparición de las manifestaciones clínicas de la EH. En pacientes con RIS sometidos a hiperamoniemia provocada por la ingesta de una solución de aminoácidos similar a la hemoglobina, (simulando una hemorragia digestiva), se detectan manifestaciones clínicas de EH. En cambio en estos pacientes, una vez controlado el evento infeccioso y habiendo desaparecido la RIS, la provocación de una hiperamoniemia de cuantía similar no se acompaña de manifestaciones clínicas de EH (**Muckart y Bhagwanjee, 1997**). Estos datos avalan fuertemente el papel de la RIS en la patogenia de la EH y su capacidad para favorecer la neurotoxicidad del amonio.

## **2. HIPERAMONEMIA Y ESTRES OXIDATIVO**

Como ya se ha indicado, durante el fallo hepático, y particularmente en la EH, grandes cantidades de amonio, presentes en la sangre portal, escapan de los mecanismos detoxicadores hepáticos y entran en la circulación sistémica. De esta forma, los niveles de amonio plasmáticos y tisulares (especialmente en el cerebro) aumentan rápidamente.

Los mecanismos fisiopatológicos precisos subyacentes, que conducen a las alteraciones neurológicas observadas en la EH, siguen sin conocerse con exactitud. Sin embargo, es de aceptación general que los altos niveles plasmáticos y/o tisulares de amonio juegan un papel crucial en la fisiopatología de la EH (**Hazell y Butterworth, 1999**). A pesar del alto número de trabajos realizados sobre el tema, el mecanismo, mediante el cual el amonio ejerce su acción neurotóxica, sigue sin conocerse de manera exacta. Entre las diferentes hipótesis propuestas están: I) las alteraciones bioenergéticas, II) la alteración de la neurotransmisión, III) el desacople electrofisiológico, y IV) la excitotoxicidad mediada por glutamato (**Norenberg y col., 2004b**). También podrían estar implicados efectos indirectos asociados al metabolismo del amonio, particularmente la producción excesiva de glutamina, que puede conducir a daños importantes en el SNC (**Rama-Rao y col., 2005**).

Diferentes trabajos publicados en los últimos años sugieren que el estrés oxidativo es un factor de gran importancia

en la patogenia asociada a la neurotoxicidad del amonio en la EH (**Norenberg y col., 2004a**). Así, hay evidencias de oxidación lipídica en ratones hiperamonémicos, lo que es consistente con la presencia de grandes cantidades de lipofucsina (lípidos peroxidados) en células de Alzheimer tipo II *in vivo*, así como en cultivos de astrocitos tratados con amonio (**Norenberg, 1981**). Recientemente se ha publicado que el amonio es capaz de generar radicales libres (RL) en cultivos de astrocitos (**Murthy y col., 2001**). El amonio aumenta la producción de superóxido y disminuye la actividad de las enzimas antioxidantes: glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa. También se ha descrito un incremento de la expresión génica de la hemo-oxigenasa-I y una disminución de la Cu/Zn-SOD en ratas con derivación porto-cava (DPC) (**Song y col., 2002**), lo que es totalmente consistente con un estado de estrés oxidativo. Además, se ha visto que la administración de sequestradores de RL ejerce un efecto beneficioso en la EH experimental y en los estados hiperamonémicos en general (**Bruck y col., 1999**).

El óxido nítrico (NO) es otro RL implicado en la EH y la hiperamonemia. Así, se ha visto, que la actividad y expresión génica de la nítrico-óxido-sintasa (NOS) están incrementadas en modelos animales de EH (**Rama-Rao y col., 1997**), y se han observado niveles altos de NO cerebral en ratas con DPC tratadas con infusiones de amonio (**Master y col., 1999**). La nitroarginina, inhibidor de la NOS, atenúa la neurotoxicidad causada por el amonio. En este contexto, la hipótesis de que el estrés oxidativo y nitrosativo son elementos claves en la

patogenia de los desórdenes causados por la hiperamonemia es cada vez mayor (**Görk y col., 2003**). Así, se ha publicado que los ligandos de los receptores periféricos de las benzodiazepinas (RPB) inducen la nitración de proteínas tanto en cultivos de astrocitos como en el cerebro de ratas *in vivo* (**Jayakumar, 2002a**). Algunos de estos efectos son aditivos a los producidos por el amonio. Estos datos son, potencialmente, de una gran importancia, ya que abren una nueva vía de investigación en este campo. Se sabe que las benzodiazepinas agravan los síntomas de la EH, y es posible que algunos de sus efectos secundarios no deseables, pudieran estar mediados por la activación de los RPB. Estos datos son complementarios al descubrimiento de que el amonio también aumenta la nitración de proteínas en cultivos de astrocitos y en el cerebro de ratas *in vivo*. En parte, la acción de las benzodiazepinas está mediada por los RPB, unas proteínas hidrofóbicas transmembranales, de unos 18 kDa, localizadas en la membrana mitocondrial externa. Los RPB, que se localizan en la mayor parte de los tejidos periféricos (de donde toman el nombre). También se encuentran en el cerebro donde se localizan principalmente en astrocitos y microglia. Aunque los RPB están implicados en numerosas funciones, la función mejor estudiada es su papel en la regulación de la síntesis de neuroesteroides.

El estudio de los mecanismos implicados en la EH y la hiperamonemia, se ha realizado fundamentalmente en astrocitos, ya que juegan un papel crucial en la patogenia de la EH y los desórdenes causados por la hiperamonemia en general

(Norenberg, 2001). Los astrocitos son las células en las que se metaboliza el amonio, fundamentalmente, así como las que soportan el daño debido a los cambios patológicos tanto en la EH crónica como aguda (Norenberg, 1981). Sin embargo en neuronas y otras células cerebrales no se han observado cambios significativos o morfológicamente consistentes. Además, el tratamiento de astrocitos en cultivo con amonio reproduce los cambios observados tanto en la EH crónica (formándose astrocitos Alzheimer tipo-II) como en la aguda (hinchamiento) (Bai y col., 2001). De igual forma, las alteraciones funcionales observadas *in vivo* también se encuentran en cultivos de astrocitos tratados con amonio (Norenberg, 2001). A este respecto es de particular relevancia señalar que los RPB, en el cerebro, se localizan fundamentalmente en las células de la glía.

Una de las dianas identificadas en la nitración de proteínas es la glutamina sintetasa (GS), enzima clave en la detoxificación de amonio en los astrocitos. Además, se ha visto que, la nitración de restos de Tyr de la GS conduce a la inactivación de la enzima. Sin embargo, no está claro cual es el impacto funcional de esta inactivación, ya que la inhibición de la GS se ha asociado con una mejora (reducción) del edema cerebral y del hinchamiento de los astrocitos. Por lo que en futuros estudios, probablemente, se descubran otras dianas celulares del estrés nitrosativo, que nos permitan entender consecuencias funcionales importantes. Una consecuencia importante del estrés oxidativo y nitrosativo es el aumento de la

permeabilidad mitocondrial (**Bai y col., 2001**), que se caracteriza por un aumento de la permeabilidad, dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , de la membrana mitocondrial interna, a los solutos pequeños (iones y moléculas < 1500 Da). Esto es debido a la apertura de un gran poro, de permeabilidad no-selectiva, localizado en la membrana mitocondrial interna, que conduce a la disipación/desaparición del potencial de la membrana mitocondrial interna, hinchamiento osmótico coloidal de la matriz mitocondrial, fosforilación oxidativa defectuosa, cese/interrupción de la producción de ATP, y generación de RL. Los últimos fenómenos, además, conducen a un agravamiento o empeoramiento de la PM. El mejor inhibidor específico de la PM es la ciclosporina-A. Este efecto de la ciclosporina-A es independiente de su bien conocido efecto como inmunosupresor que está mediado por la inhibición de la calcineurina. Los RBP son unos constituyentes importantes de los poros de transición mitocondrial, y los ligandos de los RPB son capaces de generar RL (**Jayakumar y col., 2002a**) y favorecer la permeabilidad de la transición mitocondrial en cultivos de astrocitos. Estudios recientes han demostrado que el amonio es capaz de inducir la PM en cultivos de astrocitos, pero no en cultivos de neuronas (**Bai y col., 2001**). La inducción de PM por el amonio puede bloquearse mediante el uso de antioxidantes e inhibidores de la NOS, sugiriendo la participación de RL y NO en la inducción (**Jayakumar y col., 2002b**). La inducción de la PM podría explicar la disfunción mitocondrial y la alteración bioenergética cerebral asociadas a la hiperamonemia (**Rama Rao y col., 2001**).

## *Introducción*

---

Para explicar estos fenómenos se han propuesto diferentes mecanismos, entre los que cabe destacar: I) la inhibición de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa; II) la desviación del glutamato hacia otras vías metabólicas en lugar de a glutamina (privando así a los astrocitos de una de sus fuentes energéticas principales); III) la activación de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa (contribuyendo así a la depleción de ATP); IV) la alteración de la oxidación del piruvato y del glutamato, y V) la alteración de la lanzadera malato-aspartato. Estos descubrimientos son totalmente consistentes con una serie de estudios que muestran cambios morfológicos de las mitocondrias en estados de EH y/o hiperamonemia; principalmente el hinchamiento de la matriz mitocondrial. Es de destacar que el NO, inductor de la PM y agente activamente implicado en la EH y la hiperamonemia, es también un potente inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial y de la respiración celular.

Como ya hemos indicado, una consecuencia de la elevación de los niveles de amonio en el cerebro es el incremento de la producción de glutamina, gracias a la acción de la enzima glutamina sintetasa (GS), proceso que, en el cerebro, ocurre fundamentalmente en los astrocitos. Mientras que la síntesis de glutamina, tradicionalmente, se ha visto como un mecanismo de detoxicación del amoniaco, este efecto, presumiblemente beneficioso, ha comenzado a cuestionarse recientemente, a medida que aumentan las evidencias a favor de que algunas de las acciones dañinas del amonio podrían ser debidas a la propia glutamina más que al amonio "per se". A

este respecto hay que tener en cuenta que la "metionina sulfoximina", un inhibidor de la GS, bloquea la PM inducida por amonio, sugiriendo que la glutamina puede ser la responsable de la PM inducida por amonio (**Bai y col., 2001**).

Más recientemente se ha observado que la glutamina directamente es capaz de inducir PM en cultivos de astrocitos (**Rama-Rao y col., 2003d**). Al igual que el amonio, la glutamina es capaz de formar RL. Estos descubrimientos están de acuerdo con un estudio de Zieminska y colaboradores (**Zieminska y col., 2000**) en el que se indica que la glutamina provoca el hinchamiento de las mitocondrias (una medida de la PM). La glutamina también se ha relacionado con el hinchamiento cerebral (edema) y de astrocitos observados en el fallo hepático fulminante. Se ha propuesto que la acumulación de glutamina por los astrocitos provoca un aumento de la presión osmótica que, como consecuencia, provoca el hinchamiento. Como ya hemos indicado, la glutamina puede inducir PM, así como generar RL. Además, estudios preliminares han demostrado que la ciclosporina-A y los antioxidantes son capaces de bloquear el hinchamiento de los astrocitos inducido por amonio. Esto sugiere que la PM y/o los RL (incluido el NO) pueden constituir elementos esenciales a través de los cuales la glutamina induce el hinchamiento de los astrocitos y quizás el edema asociado al fallo hepático fulminante.

Considerando que los trabajos anteriormente citados indican que el amonio puede inducir una producción excesiva de



RL, consecuentemente puede afectar la función mitocondrial. Sin embargo, la mayor parte de los estudios citados se han realizado *in vitro*, en cultivos de astrocitos. Estos estudios pueden ayudar a identificar el sitio celular evitando tanto las complicaciones resultantes de las interacciones inter-órganos e inter-células que tienen lugar en los estudios *in vivo*, o de otros factores tóxico-protectivos producidos en el organismo en respuesta al daño hepático. Las respuestas de las células *in vivo* en contraposición a las respuestas *in vitro* están gobernadas por un conjunto muy complejo de diversas interacciones entre células vecinas y otros componentes extracelulares que están gobernadas en gran parte por su accesibilidad y concentración.

### **3. GLUTAMINASAS**

Bajo la denominación de glutaminasa (L-glutamina amidohidrolasa; EC 3.5.1.2) se engloba una serie de isoenzimas que catalizan la siguiente reacción:



Se han descrito dos tipos de glutaminasa: Glutaminasa fosfato dependiente (GAP) y Glutaminasa independiente de fosfato.

#### **Glutaminasa fosfato dependiente (GAP)**

Requiere la presencia de fosfato para desarrollar su actividad catalítica. La localización tisular es fundamentalmente en hígado, riñón, intestino y cerebro. En general, la GAP

presenta *in vitro* un pH óptimo alcalino entre 7,7 y 9, según la fuente natural de obtención. Su localización celular es la cara externa de la membrana mitocondrial interna.

Actualmente se han descrito varios tipos de GAP (Curthoys y Watford, 1995), si bien los dos tipos fundamentales son la forma L y K, que presentan importantes diferencias en cuanto a sus requerimientos de activador, a sus características cinéticas y a sus propiedades reguladoras:

#### **GAP hepática (forma L)**

- Localización tisular: hasta fecha reciente se consideraba una enzima exclusivamente hepática, si bien en la actualidad se ha descrito su localización en otros tejidos (Olalla y col., 2002).
- Km para el fosfato = 20-30 Mm
- Estructura: Dímero (PM = 330 KDa)
- Inhibida por Glutamato y reactivos bloqueantes de grupos sulfhidrilos
- Activada por fosfato, borato, acetil-CoA y algunos acil-CoA. *In vivo* se estimula en situación de acidosis metabólica (Nissim, 1999; Szweda y Atkinson, 1990).

#### **GAP extrahepática o renal (forma K)**

- Localización tisular: ampliamente distribuida por los tejidos que utilizan glutamina: riñón, cerebro, enterocito, etc.
- Km para el fosfato = 5 mM

- Estructura: Heterotetrámero compuesto de 3 péptidos de 66-KDa y uno de 68-KDa (6) (PM = 266 KDa)
- Inhibida en acidosis.
- Activada por fosfato y  $\text{NH}_4^+$ . Su actividad se estimula por glucagón y todas las situaciones que conlleven elevados niveles de glucagón, tales como diabetes mellitus, adrenalina y en situación de alcalosis metabólica (**Roberg y col., 2000**).

### **Otras isoformas de la GAP**

En la actualidad se conocen al menos 3 isoformas no hepáticas que se producen a partir de un mismo gen por "splicing" de ARNm. Estas tres isoformas han sido descritas recientemente por Labow y col., (**Labow y col., 2001**). La primera de estas isoformas se ha denominado como hKGA y coincide prácticamente con la clásica isoforma de riñón (GAP tipo K). La segunda se denominó hGAC y presenta una secuencia idéntica a la de la hKGA en el extremo amino-terminal, pero con un extremo carboxilo-terminal original. A partir del aminoácido 550 las secuencias divergen y la hGAC muestra una cadena de 48 aminoácidos de longitud que no presenta homologías con la cadena de 113 aminoácidos que presenta la hKGA en su extremo carboxilo-terminal. Al tiempo que se desarrollaba este trabajo en el laboratorio del Dr. Steve F. Abcouwer (**Imbert y col., 1996, Elgadi y col., 1999**) aislaron otra nueva isoforma que se ha denominado hGAM. Esta isoforma tiene una secuencia aminoacídica de 169 aminoácidos idénticos a la secuencia tanto de la hKGA como de la hGAC

hasta el residuo 161 y finaliza con un extremo carboxilo-terminal diferente y original. La distribución de estas tres isoformas se ha estudiado mediante análisis por Northern blot (**Elgadi y col., 1999**). La hKGA se expresa predominantemente en cerebro y riñón; la hGAC en músculo cardíaco, páncreas, placenta, riñón y pulmón; y la hGAM sólo en músculo cardíaco y esquelético. Ninguna de estas isoformas se ha detectado en hígado.

No se conoce la importancia que tendrá el hecho de que sólo la isoforma hGAC contiene una región en el extremo 3' denominada secuencia del elemento de respuesta a pH (le confiere estabilización en condiciones ácidas) descritas por Laterza y Curthoys para la clásica isoforma de riñón (**Laterza y Curthoys, 2000**). Ni la hKGA ni la hGAM contienen estos elementos. Dicha región de la hGAC contiene 2 secuencias con 8 bases (UUUAAAUA) que coinciden con la primera mitad de este elemento y otras 2 secuencias separadas de 8 bases (UUAAAAUA) que se corresponden con la segunda mitad de este elemento. Los resultados del laboratorio del Dr. Curthoys sugieren que una secuencia media de 8 bases podría ser suficiente para la función de respuesta al pH. La presencia de elementos de respuesta a pH en la isoforma hGAC junto con su ausencia en las isoformas hKGA y hGAM sugiere que sea un mecanismo a nivel de ARNm el que regule la sobre-regulación de la enzima en condiciones de acidosis en riñón.

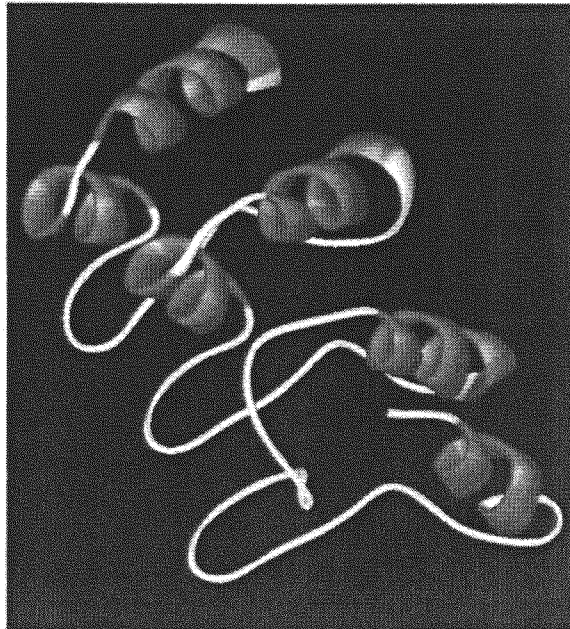
En resumen podemos decir que la GAP es una enzima ampliamente estudiada en los principales órganos metabólicos

## Introducción

---

(corazón, hígado, riñón...) si bien los estudios realizados sobre la regulación y expresión de esta enzima a nivel intestinal son escasos.

La estructura proteica de la enzima L-glutamina aminohidrolasa (EC 3.5.1.2) no ha sido introducida todavía en el servidor del "Protein Data Bank" (PDB) <http://www.rcsb.org/pdb/>; pero se pueden hacer predicciones aproximadas mediante modelos informáticos y por semejanza con proteínas de la misma familia. Probablemente posea una estructura globular en general pero parece tener dos brazos cortos que se extienden desde un mismo punto. La enzima está formada por dos cadenas con dos dominios por cadena. Cada uno consiste en un plegamiento  $\alpha$ - $\beta$  de tres capas en el que la hebra  $\beta$  se encuentra entre las dos hélices  $\alpha$ . La enzima está formada por 23 hélices y 24 hojas  $\beta$  aproximadamente y la topología es la de un plegamiento Rossman. La estructura que se muestra a continuación (**Figura-16**) representa una aproximación a la estructura tridimensional que se cree más probable para esta proteína y ha sido obtenida a través del servidor <http://us.expasy.org/sprot/> del Instituto Suizo de Bioinformática.



**Figura- I6.** Estructura tridimensional de la GAP

### **Distribución de la GAP en el tracto gastrointestinal**

James y colaboradores estudiaron la distribución de dicha enzima a lo largo del tracto digestivo, y concluyeron que la mayor actividad glutaminasa se localiza en la mucosa del intestino delgado (James y col., 1998; James y col., 1988), la cual supone más del 80% de la actividad total del tracto gastrointestinal.

### **Glutaminasa independiente de fosfato, y estimulada por malato**

Esta enzima se encuentra, fundamentalmente, en hígado y riñón y su localización es citoplasmática. Su actividad representa tan sólo un pequeño porcentaje de la actividad glutaminasa total de dichos tejidos, por lo que generalmente su

cuantificación se desprecia frente a la GAP (Curthoys y Kuhlenschmidt, 1975).

#### **4. MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LA EH**

La disponibilidad de un modelo animal tiene gran importancia en el estudio de los mecanismos de la enfermedad y para poder testar posibles terapias. Actualmente existen varios modelos para el estudio de enfermedades hepáticas aunque permanecen todavía lejos de ser un modelo animal de enfermedad hepática crónica con EH y con anomalías en el metabolismo del nitrógeno o cambios en el comportamiento típicos en la EH, como sucede en el hombre. Los diferentes problemas asociados a los modelos experimentales han llevado a los investigadores a desarrollar sus propios, a veces únicos, modelos experimentales, lo que dificulta la comparación entre los resultados de los estudios realizados por cada uno de ellos (Mullen y McCullough, 1989).

Los modelos animales para mimetizar la EH más extendidos son: la cirrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) en la rata y el "shunt" portocava o derivación porto cava (DPC) en la misma especie. En relación con la EH, sin embargo, la cirrosis inducida por el  $\text{CCl}_4$  en ratas, parece desarrollar escasos cambios del comportamiento típicos a pesar de originar una cirrosis avanzada y descompensada, y constituir, en teoría, un buen modelo para la EH tipo C. En contraposición, la DPC se relaciona claramente con un evidente, aunque sutil,

conjunto de cambios del comportamiento. Aunque en el modelo de anastomosis se mimetiza la situación inducida en la cirrosis por circulación colateral o comunicaciones portosistémicas, y suele presentar el inconveniente de la ausencia de daño hepatocelular, esta aparente deficiencia se ha ido paliando gracias a los más recientes avances en las sucesivas mejoras en la detección de los citados cambios y, de manera destacada, la reversibilidad de los síntomas asociada con la administración de neomicina o dietas de bajo contenido protéico (**Mullen y col., 1994**).

Además, recientemente, miembros de la RED Nacional de Encefalopatía, al que pertenecemos, los grupos de los Dres. Vicente Felipo (Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia) y Rodrigo Jover (Hospital General Universitario de Alicante) han validado un modelo en rata de EH, que consiste en la ligadura del conducto biliar (usado como modelo de cirrosis) unido a un factor precipitante de EH (dieta rica en amonio) (**Jover y col., 2006**).

Un modelo ideal de EH generalizada en enfermedad hepática crónica debería tener cirrosis hepática unida a un factor desencadenante de EH, también mostrar las características neuropatológicas desencadenantes de la EH, las alteraciones neuroquímicas en las principales vías metabólicas inherentes a esas complicaciones de la cirrosis y el edema cerebral de bajo grado. A pesar de no tener daño hepatocelular, el modelo de derivación porto-cava en ratas es el más ampliamente aceptado



## Introducción

---

como modelo de EH. En él hemos estudiado el edema de bajo grado, con el fin de estudiar en el modelo lo que sucede en las personas con EHM, susceptibles de desarrollar EH y tener una referencia para probar en un futuro posibles terapias.

Dada que la principal toxina implicada en la EH es el amonio y que la EH tipo C (episódica, persistente o mínima) es la más frecuente, existen actualmente buenos modelos animales para el estudio de la encefalopatía en fallo hepático agudo. También hay un modelo específico en la EH tipo B, el modelo de anastomosis porto-cava, que podría ser buen modelo para mimetizar la EHM, lo que mostraremos en esta tesis.

El modelo de ratas con DPC es el más ampliamente usado en el estudio de la EH, por ello es el que hemos elegido para los estudios realizados en el presente trabajo. Este modelo se basa en la realización de una derivación porto-sistémica (end-to-side anastomosis porto-cava) que mimetiza la situación inducida en la cirrosis por la circulación colateral. En este sentido la DPC es un claro modelo de EH tipo B (animales sin daño hepatocelular). Numerosas de las características de este modelo tienen una amplia variabilidad a través de diferentes estudios (**Chamuleau, 1996**). Por ejemplo, la dependencia del género ha sido descrita en algunos artículos (solamente las ratas macho muestran un descenso en el crecimiento y una espontánea actividad motora después de la DPC) (**Conjeevaram y col., 1994a**); pero no confirmada en otros (**Isteindl y col., 1995**). En nuestros estudios hemos utilizado

siempre ratas macho. Parte de esta variabilidad puede ser atribuida a diferencias en gradientes de presión porto-cava debido a diferentes técnicas quirúrgicas o a la experiencia personal (**Coy y col., 1991**). La técnica utilizada en esta tesis siempre ha sido llevada a cabo por el mismo cirujano, mediante microcirugía. Los cerebros de este modelo no muestran células tipo II de Alzheimer (**Pilbeam y col., 1983a**) y según unos estudios no se ha aumentado el contenido en agua cerebral (**Pilbeam y col., 1983b**), aunque en la presente investigación hemos observado que si se pueden ver afectados canales de paso de agua a nivel de expresión. Sin embargo, como hemos indicado, las ratas con DPC han mostrado consistentemente anomalías neurológicas en el comportamiento (**Bengtsson y col., 1986; Tricklebank y col., 1978**). Numerosas observaciones han sugerido que el modelo de DPC es apropiado como equivalente a la EHM humana, como una sobre expresión de signos clínicos de la encefalopatía, si bien, los cambios en el electroencefalograma y potenciales evocados parecen estar ausentes (**Chamuleau, 1996**).

Un modelo de hiperamonemia podemos decir que consiste en la inducción de hiperamonemia en animales sin enfermedad hepática o sin derivación porto-cava. En los modelos animales más simples de hiperamonemia a los animales se les alimenta con una dieta suplementada con acetato amónico (**Azori y col., 1989**). El amonio también puede ser administrado parenteralmente (**Ferenci y col., 1982**) o inducido por tratamiento con ureasa (**Prior y Visek, 1972**), pero

no puede hacerse el estudio durante largos periodos de consumo.

Comparado con el modelo de DPC el modelo de hiperamoniemia es más sencillo, en el sentido de no requerir una microcirugía compleja como es la realización de la anastomosis, y este modelo es mejor tolerado por el animal, con menores efectos colaterales que animales con DPC (tras la realización de DPC puede producirse fallecimientos, según datos de la bibliografía y propios (del orden del 10-18%). Sin embargo, es un modelo que carece de fallo hepático y además de derivaciones porto-sistémicas, por eso no ha sido nuestro modelo de elección. Este es un modelo muy completo para estudiar los efectos de una exposición con amonio en el cerebro como tóxico, a niveles en los que no se producen en el ser humano. Este modelo ha sido utilizado para el estudio a nivel molecular de procesos implicados en la EH como la vía del GMP cíclico del óxido nítrico- glutamato (**Hermenegildo y col., 1998**), y las consecuentes alteraciones cognitivas. Las ratas en este modelo con exposición pre o neonatal al amonio presentan un menor aprendizaje (**Aguilar y col., 2000**).

Otro modelo para el estudio de la EH y la hiperamoniemia es el modelo de la ligadura del conducto biliar. Una obstrucción en el conducto biliar común induce muy reproduciblemente cirrosis biliar en ratas. Los animales con ligadura del conducto biliar (LCB) tienen fallo hepático. Estos animales desarrollan ictericia, hipertensión portal (**Kountouras y col., 1984**),

comunicación porto-sistémica (**Dunn y col., 1991**), traslocación bacteriana y disfunción del sistema inmune (**Roughneen y col., 1986; Greve y col., 1990**). No obstante, las ratas con LCB no tienen tendencia a desarrollar EH, a pesar de que los niveles de amonio podrían estar incrementados (**Weisdorf y col., 1990; Huang y col., 2004**).

Aunque los animales con este modelo muestran una disminución de las actividades motoras y déficit de la memoria espacial, como sabemos que la principal toxina en la EH es el amonio, descartamos este modelo y elegimos el modelo de DPC. Se están desarrollando diferentes aproximaciones para inducir EH en ratas cirróticas con LCB. Se ha desarrollado un modelo crónico de EH combinando LCB con comunicaciones porto-sistémicas inducidas por la ligadura portal, pero este modelo no ha sido utilizado de forma general desde su descripción. No obstante, recientemente se ha descrito un modelo que combina LCB e hiperamonemia inducida por la dieta (**Jover y col., 2006**). La combinación de la LCB y la hiperamonemia causan un incremento en los niveles de amonio en sangre y cerebro, y reproduce, según el grupo del Dr. Felipo, las alteraciones en la regulación de la guanilato-ciclasa soluble por NO encontrado en el córtex cerebral y en el cerebelo de pacientes cirróticos (**Rodrigo y col., 2005**), mientras que en el modelo LCB o el de hiperamonemia reproducen los efectos en el cerebelo pero no en el córtex cerebral. Estudios posteriores podrían clarificar el papel de este prometedor modelo en el estudio de la EH crónica.

- **Modelo de derivación o anastomosis porto-cava**

Las primeras derivaciones portales, es decir, la puesta en comunicación directa del sistema porta con el sistema cava, cortocircuitando más o menos completamente el aporte sanguíneo al hígado, fueron realizadas en 1877 en perros por Nikolai Vladimirovich Eck (**Child, 1953**). Esta técnica fue poco conocida y usada hasta que en 1945 que unos estudios de Whipple y Blakemore especificaron los efectos de la intervención sobre la hipertensión portal (**Whipple, 1945; Blakemore, 1955**). Rápidamente se extendió el uso de esta cirugía, dada la eficacia comprobada en la prevención de las recidivas hemorrágicas por ruptura de varices, si bien después su uso disminuyó tras comprobar sus consecuencias inmediatas: el agravamiento de la insuficiencia hepatocelular previa y la aparición de alteraciones neuropsiquiátricas.

Simultáneamente con estos estudios clínicos se desarrollaron otros en el terreno experimental, que intentaron explicar el fenómeno desde un punto de vista fisiopatológico. Los primeros, realizados en ratas, datan de 1946, cuando Whitaker practicaba un método en dos tiempos iniciado por la ligadura de la cava, seguido por la confección de una fístula porto-cava mediante un punto de salida y entrada entre las dos paredes venosas y finalizado por la ligadura de la porta 4 días más tarde (**Whitaker, 1946**). En la misma época, Reinhard y Bazell propusieron una técnica de anastomosis porto-renal que precisaba de una nefrectomía y de la interposición de un tubo de

vidrio (**Reinhard y Bazel, 1946**), si bien era un acortamiento del "shunt" con polivinilo entre las venas iliaca y porta descrito por Berstein y Cheicker durante la hepatectomía para evitar la hipertensión portal (**Berstein y Cheicker, 1959**). Todas estas técnicas resultaron poco satisfactorias por la enorme mortalidad operatoria que las acompañaba, la gran tasa de trombosis de los "shunt" y la escasa reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Lee y Fisher (**Lee y Fisher, 1961**) en 1961 y Bismuth en 1962 (**Bismuth y col., 1963**) describieron una técnica de anastomosis porto-cava directa, fiable y reproducible, realizada por microsutura vascular, que aun hoy en día continua vigente debido a sus buenos resultados y a su reproducibilidad por los diferentes grupos de investigación. Sin embargo, no es despreciable la dificultad técnica que se le asocia, por lo que han existido intentos ulteriores de simplificarla. Funovics (**Funovics y col., 1974**) describió en 1974 una técnica de anastomosis mediada por un tubo de teflón que pretendía evitar la sutura directa y Jerkins (**Jerkins y Steele, 1988**) en 1988 otra en la que la unión entre las venas cava y porta se realizaba mediante adhesivo de cianoacrilato, siempre con la intención de facilitar la manipulación microquirúrgica de los vasos y con ello, la técnica. Sin embargo, estudios posteriores que comparaban estos tipos de "shunt" alternativos con el descrito por Lee y Bismuth concluyeron que los gradientes de presiones entre los sistemas porta y cava eran menores tras los "shunt" quirúrgicos. Esto sugeriría que las anastomosis microquirúrgicas mantienen una tasa de viabilidad a largo plazo mayor que los "shunt"

alternativos, que presentarían mayores gradientes por su mayor tendencia a estenosarse en el postoperatorio. Así se explicaría la variabilidad de los resultados que se habían descrito previamente en trabajos que utilizaban dichas técnicas quirúrgicas alternativas (Coy y col., 1991).

En 1983 Numata describió una modificación de la técnica que la hace más fácil y reproducible y contribuye a minimizar el tiempo operatorio, vital en la viabilidad del animal después de la intervención (Numata, 1983). La técnica se basa en una anastomosis microquirúrgica veno-venosa látero-lateral entre la porta y la cava de la rata, que permite un mayor calibre de "shunt" que la anastomosis término-lateral de Lee y Bismuth, con una tasa de estenosis a largo plazo teóricamente menor. Además permite su utilización bien como anastomosis látero-lateral, en función de que la dejemos como quede tras la realización del "shunt" quirúrgico, o bien prosigamos a término-lateral, si ligamos y seccionamos la vena porta en sentido proximal inmediatamente después de realizar la anastomosis, lo que permitiría aplicarla a estudios experimentales diferentes en función de los intereses.

## **5. PERSPECTIVAS TERAPEUTICAS**

La hiperamonemia, derivada de un aumento de la producción intestinal y renal, junto a un descenso de la eliminación hepática y la saturación de la eliminación muscular, es la responsable de la EH. Los factores que regulan la extracción cerebral de amonio, el desarrollo de edema cerebral

de bajo grado, así como las alteraciones hemodinámicas del síndrome de hipertensión portal y la respuesta inflamatoria sistémica, se consideran factores fundamentales en la fisiopatología de la EH. Partiendo de estas premisas, el tratamiento de la EH debe ir encaminado a disminuir la producción de amonio, aumentar su eliminación, mejorar la situación hemodinámica sistémica y evitar el desarrollo de RIS. Al mismo tiempo se deben modular farmacológicamente las alteraciones de la neurotransmisión y el desarrollo de edema cerebral de bajo grado. En este cambio de enfoque, aunque basado en datos preliminares que han de ser confirmados en futuros estudios, el origen de la hiperamonemia es diferente según el tipo de factor que desencadena la aparición de EH. En casos de hemorragia digestiva, disfunción renal por diuréticos o hipopotasemia, la amoniagénesis renal sería la diana terapéutica más importante; mientras que en pacientes con comunicaciones porto-sistémicas, espontáneas o no, en aquellos con estreñimiento o antecedentes de ingesta proteica excesiva, sería la hiperamonemia de origen intestinal la que habría que reducir. Por último, en los pacientes en los que la EH aparece en el contexto de una infección (PBE o cualquier otra), se deben utilizar antibióticos de amplio espectro para disminuir la respuesta inflamatoria sistémica.

Hasta el momento, los fármacos utilizados para disminuir la amoniagénesis, como los disacáridos no absorbibles (**Blanc y col., 1992**) (lactulosa, lactitol) o antibióticos (**Strauss y col., 1992**) (neomicina, metronidazol, rifaximina) no han demostrado



ser superiores a placebo en el manejo de la EH. Esto es debido, probablemente, a que su principal mecanismo de acción requiere de la participación de la flora bacteriana del colon (lactitol / lactulosa) o sustentan su efecto beneficioso en la eliminación de las bacterias (antibióticos) y actualmente se acepta que la flora bacteriana del colon juega un papel marginal en la producción de la hiperamoniemia. En este sentido, la utilización de enemas de limpieza o de disacáridos no absorbibles, carecería de fundamento fisiopatológico, incluso, a pesar de que en un estudio controlado se demostrasen superiores a los enemas de agua corriente (**Uribe y col., 1987**), ya que estos datos no se han vuelto a reproducir.

La producción intestinal y renal de amonio a partir de la glutamina mediada por la actividad glutaminasa mitocondrial dependiente de fosfato, podrían ser las principales dianas terapéuticas para evitar la aparición de hiperamoniemia. No obstante, los efectos de la inhibición de la actividad glutaminasa no se conocen y podrían aparecer efectos deletéreos ya que esta enzima es fundamental en el mantenimiento del metabolismo celular. De todas formas inhibiciones parciales sí podrían ser útiles en el control de la producción de amonio. De hecho, la neomicina inhibe la actividad glutaminasa intestinal en ratas sometidas a derivación porto-cava (**Hawkins y col., 1994**). Probablemente este efecto sea más importante en el control de la hiperamoniemia y de los síntomas de EH que las modificaciones de la flora intestinal. Existen diferentes

moléculas, ensayadas principalmente en cultivo, que inhiben la actividad glutaminasa:

-El mersalyl (ácido mersalílico:  $C_{10}H_{11}NO_4$ ), como sal de tiol y mercurio, ha sido utilizada como diurético. Inhibe varios procesos bioquímicos, especialmente en la mitocondria, entre los que se encuentra la inhibición de la glutaminasa.

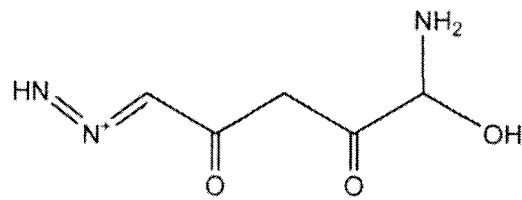
-La *N*-etil-maleimida ( $C_6H_7NO_2$ ). En el citoplasma, o alternativamente en el aparato de Golgi, existe el factor sensible a la *N*-etil-maleimida (NSF), y se expresa en cerebelo, espermatozoides y cerebro. Se inhibe por el reactivo *N*-etil-maleimida y NSF es un miembro de la familia genética de las ATPasas asociadas con diversas actividades celulares (**Sayre y Roberts, 1958**).

-El derivado aminoacídico 6-diazo-5-oxo-*L*-norleucina (DON,  $C_6H_9N_3O_3$ ), es un aminoácido que inhibe la actividad glutaminasa e interfiere con el metabolismo de la glutamina. Es un antineoplásico producido por especies no identificadas de *Streptomyces peruvian*. (From Merck Index, 11th ed).

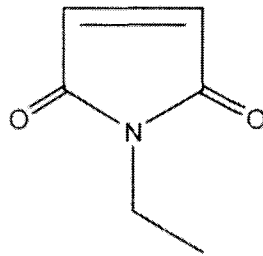
-Además el dipéptido análogo de la glutaminilglicina se ha usado para inhibir la glutaminasa en cultivo de astrocitos. Éste dipéptido inactiva la unión de la gamma-glutamil transferasa (GGT) a la membrana de las vesículas de borde en cepillo renales pero no inactiva la transferasa purificada.

Introducción

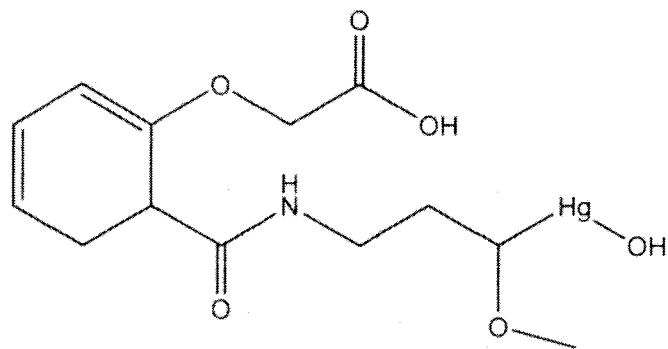
---



**DON**



**N-etil-maleimida**



**Mersalyl**

Se ha descrito que el glutamato y la histidina también inhiben la actividad glutaminasa. Se ha intentado tratar la EH con glutamato pero no ha surtido efecto, quizás por la naturaleza de neurotransmisor del aminoácido en el cerebro.

Por otro lado, la vía más importante de eliminación de amonio y que no requiere consumo de energía, es el ciclo de la urea y, en pacientes cirróticos, la mayor parte del amonio se extrae en el músculo, de ahí la importancia de mantener un estado nutricional, con un aporte equilibrado de proteínas. La L-ornitina-L-aspartato (LOLA) es un complejo aminoacídico que estimula tanto la síntesis de glutamina como la eliminación de amonio mediante el ciclo de la urea, al tiempo que aumenta la síntesis proteica muscular. En dos estudios randomizados y doble ciego para el tratamiento de la EH tipo C, LOLA fue superior a el placebo en la mejoría del estado mental, el descenso de la hiperamoniemia y mejoría en los tests psicométricos (Tets PHES, valorados en por la Red Nacional de Encefalopatía, [www.redeh.org](http://www.redeh.org)), tanto administrado por vía oral (Stauch y col., 1998) como por vía intravenosa (Kircheis y col., 1997). Por otro lado, LOLA ha demostrado inhibir el catabolismo protéico muscular y mejorar la capacidad de síntesis muscular de proteínas (Kircheis y col., 2002). Por tanto, el tratamiento con LOLA, tanto por vía oral como por vía intravenosa, debería ser el tratamiento de elección en la EH en la actualidad ya que permite actuar sobre los principales elementos implicados en la producción y eliminación del amonio.

Se han publicado datos preliminares avalando la utilidad de la perfusión rápida de 1000 ml de suero salino en pacientes con hiperamoniemia de origen renal, como ocurre en pacientes con hemorragia digestiva o EH inducida por diuréticos (**Jalan y col., 2003**). Este tratamiento consiguió una mejoría en los niveles de hiperamoniemia. No obstante, se requieren futuros estudios que avalen este tipo de medidas terapéuticas.

Entre las medidas terapéuticas encaminadas a modular la neurotransmisión, el flumazenilo, un antagonista de los receptores benzodiazepínicos del complejo receptor GABA-A, podría ser beneficioso en un tercio de los pacientes ya que mejoraría el estado mental a corto plazo (**Als-Nielsen y col., 2003**). El flumazenilo podría utilizarse como fármaco de elección en pacientes con EH desencadenada por consumo de benzodiazepinas y sería un fármaco de segunda línea en pacientes con EH que no respondan a medidas habituales, basándose su efecto beneficioso en la capacidad de disminuir el tono GABAérgico, aumentado por la síntesis de neuroesteroides provocada por la hiperamoniemia.

La memantina es un antagonista de los receptores NMDA, que podría ser útil en el tratamiento de la EH. En modelos animales mejora la hiperamoniemia y la encefalopatía (**Vogels y col., 1997**). Aunque, en humanos no se han realizado ensayos, y además, la actividad de los receptores NMDA puede ser diferente según áreas cerebrales. No obstante, la

intervención sobre la neurotransmisión glutamatérgica puede ser beneficiosa en el manejo de la EH.

Dada la depresión de la neurotransmisión serotoninérgica detectada en pacientes con EH, basándose en resultados de estudios animales (**Apelqvist y col., 2000**), los inhibidores de la recaptación de la serotonina podrían emplearse en pacientes con formas de leves de EH manifestadas por cambio del ritmo de sueño.

El control del edema cerebral de bajo grado constituye un desafío en el futuro próximo, ya que hasta ahora, la utilización de manitol o diuréticos no parecen ejercer un efecto beneficioso. Los fármacos que bloquean los receptores de TNF, como infliximab o pentoxofilina teóricamente podrían ser útiles en el tratamiento del edema cerebral de bajo grado, aunque esto debe ser confirmado en futuros estudios.

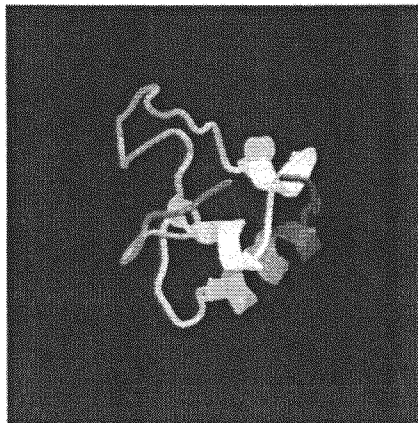
En pacientes con datos de respuesta inflamatoria sistémica se deben utilizar antibióticos de amplio espectro, aún en ausencia de infección diagnosticada, como tratamiento de base de la EH. Para ello, podrían ser útiles los marcadores precoces de infección como la procalcitonina que muestra una buena especificidad y sensibilidad para el diagnóstico precoz de infección en pacientes con cirrosis hepática descompensada (**Connert y col., 2003**).

Por último, dado que el desarrollo de un episodio de EH se acompaña de una baja supervivencia al año, estimada entre el 42% (**Bustamante y col., 1999**) y el 58% (**Romero-Gómez y col., 2004**), el trasplante hepático debe ser el tratamiento definitivo de esta complicación mayor de la cirrosis hepática.

El factor semejante a la insulina tipo I (IGF-1) es una hormona importante en el anabolismo cuya secreción está estimulada por la hormona del crecimiento (GH) (**Daughaday y Rotwein, 1989; Schmid, 1995**) y los hepatocitos son su principal productor. El IGF-1 circula unido a 6 diferentes proteínas (IGFBP-1 hasta -6), interactúa con receptores específicos o en tejidos diana (hueso, intestino, testículos, músculo, etc) y además actúa en el hipotálamo para suprimir la secreción de GH (**Jones y Clemonds, 1995; Sandhu y col., 2002; Le Roith, 1997**). El hígado también es el mayor productor de IGFBPs, principalmente IGFBP-1 y IGFBP-3 (**Picardi y col., 1997**). En individuos con cirrosis hepática los niveles plasmáticos de IGF-I total, IGF-I libre y IGFBP-3 están disminuidos mientras que la GH se incrementa, indicando la resistencia a GH y la reserva funcional hepática reducida (**Scharf y col., 1996; Caufriez y col., 1991; Assy y col., Cuneo, 1995**). La cirrosis hepática, además, es un estado de deficiencia de IGF-I, cuya severidad se correlaciona con la progresión de la enfermedad hepática (**Cuneo, 1995 y col.; Donaghy y col., 1997**). Por todo ello, muchas de las características de la cirrosis avanzada como la malnutrición, el desgaste muscular, la pérdida de masa ósea y el

hipogonadismo, podría estar adscrito a la actividad anabólica de la falta de IGF-I. El posible uso terapéutico del IGF-I en la cirrosis hepática está contrastado por estudios en ratas cirróticas. Estos demuestran que la terapia sustitutiva de IGF-I (20 mg/kg): (a) incrementa el consumo de alimento, el balance de nitrógeno y el rendimiento de la alimentación (**Picardi y col., 1997**); (b) estimula la absorción intestinal de glucosa y aminoácidos (**Castilla-Cortazar y col., 1997b**); (c) incrementa la densidad ósea (**Cemborain y col., 1998**); (d) corrige el hipogonadismo (**Castilla-Cortazar y col., 2000**); (e) disminuye el daño oxidativo del hígado (**Castilla-Cortazar y col., 1997a**); (f) mejora la función hepática y (g) disminuye la fibrogénesis del hígado.

Se ha visto que el IGF-I mejora la función hepática en pacientes con cirrosis (**Conchillo y col., 2005**):



**Figura-17.** Molécula de IGF-I. (**Cooke y col., 1991**).



## **II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

Como se sabe a partir de los datos publicados, el amonio es el principal causante de la Encefalopatía Hepática (EH).

La **hipótesis de partida** del presente estudio es que la principal fuente de amonio plasmático es el amonio esplénico, y que éste se forma debido a una mayor actividad de la glutaminasa activada por fosfato (GAP) en el intestino y el riñón.

Como **segunda hipótesis** de trabajo se parte de que los altos niveles de amonio plasmático y la elevada actividad de la enzima glutaminasa (GAP) en astrocitos, en determinadas áreas del cerebro, podrían ser factores contribuyentes a la elevada concentración extracelular de glutamato, observada en modelos animales de EH y enfermos con EH causada por fallo hepático.

Como **tercera hipótesis** se plantea el posible papel de la hiperamonemia y la elevada concentración de glutamato en los fluidos cerebrales extracelulares, como agentes desencadenantes del estrés oxidativo.

Por ello los **objetivos** del presente trabajo son estudiar, en un modelo animal de ratas con DPC, los siguientes puntos:

### Objetivos y Plan de Trabajo

---

1. Establecer los niveles de amonio en plasma y en tejidos extrahepáticos y cerebro.
2. Establecer la actividad glutaminasa en tejidos extrahepáticos y cerebro
3. Establecer el grado de oxidación de las proteínas del cerebro, mediante la cuantificación de grupos carbonilos, como índice de oxidación.
4. Estudiar el papel de determinados productos: histidina, glutamato, lactitol, neomicina, IGF-1 y flumazenilo, sobre la actividad glutaminasa, con el fin de iniciar estudios encaminados a reducir su actividad (inhibición) como posible vía terapéutica o de tratamiento de la EH.

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

## **1. MATERIAL BIOLÓGICO**

En el presente trabajo de investigación se han utilizado ratas Wistar, macho, de 250-350 g de peso, divididas en grupos según el uso al que iban a ser destinadas: grupo control sin operar, grupo control operado o *sham* y grupo sometido a derivación porto-cava (DPC). Un subgrupo de este último grupo se ha utilizado para el tratamiento con IGF-1 (Factor 1 semejante a la insulina, de sus siglas en inglés *Insulin Growth Factor-1*).

Los animales se han alimentado con una dieta estándar (Panlab, Barcelona, España), de composición: 54% carbohidratos, 12% proteínas (caseína) y 5% lípidos, siendo el resto material no digerible. Los animales se han mantenido en condiciones estándares de luz (12 horas luz /12 horas oscuridad), temperatura de  $23\pm 2$  °C, humedad del 60-70 % y con libre acceso tanto a la comida como al agua.

En los tratamientos a los que se han sometido los animales se ha evitado, en todo momento, cualquier sufrimiento innecesario, y se han seguido las normas dictadas por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla.

También se han utilizado riñones de cerdo, para la obtención de GAP de riñón utilizada en los ensayos de inhibición *in vitro* de la glutaminasa y como control positivo en las medidas

de actividad glutaminasa; así como conejos para la preparación de anticuerpos policlonales anti-GAP.

## **2. MODELO EXPERIMENTAL DE ANASTOMOSIS O DERIVACION PORTO-CAVA**

Un grupo de animales fueron sometidos a derivación porto-cava (DPC) con el fin de producirles Encefalopatía Hepática (EH)

Todas las intervenciones quirúrgicas se realizaron bajo la Normativa vigente, RD 223 de 14 de Marzo de 1998 (BOE 18 de Marzo de 1998), en el quirófano de Cirugía Experimental del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

Tras la operación los animales se han mantenido dos días en el Centro de Experimentación Animal del Hospital Universitario Virgen del Rocío, trasladándose posteriormente al estabulario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, para recibir el tratamiento oportuno, manteniéndose allí hasta su sacrificio.

Las condiciones ambientales y dietéticas de los animales han sido las correspondientes a un mantenimiento estándar, descrito anteriormente. La manipulación del animal se ha efectuado siempre bajo lo recogido en la Norma Directiva 86/609/CEE.

### **2.1. Método anestésico**

Previamente a la intervención, los animales se han sometido a anestesia general por inhalación con isoflurano, mediante la exposición del animal a una mezcla de oxígeno, aire y gases anestésicos (5%), a flujos altos. Se ha aplicado la mezcla gaseosa mediante una mascarilla en la que se introduce la cabeza completa del animal, consiguiéndose la anestesia en unos 20-30 segundos. El animal queda en ventilación espontánea. El mantenimiento de la anestesia se consigue con porciones del gas anestésico de entre el 2 y el 3% (según peso del animal). Una vez que se ha producido el clampaje de los grandes vasos, ya sea para la realización de la técnica de la anastomosis o para el grupo *sham* (ratas sometidas a las mismas condiciones de la intervención quirúrgica, pero en las que no se realiza la anastomosis), la proporción del gas anestésico se reduce a un 0,5%-0,75%.

### **2.2. Técnica quirúrgica**

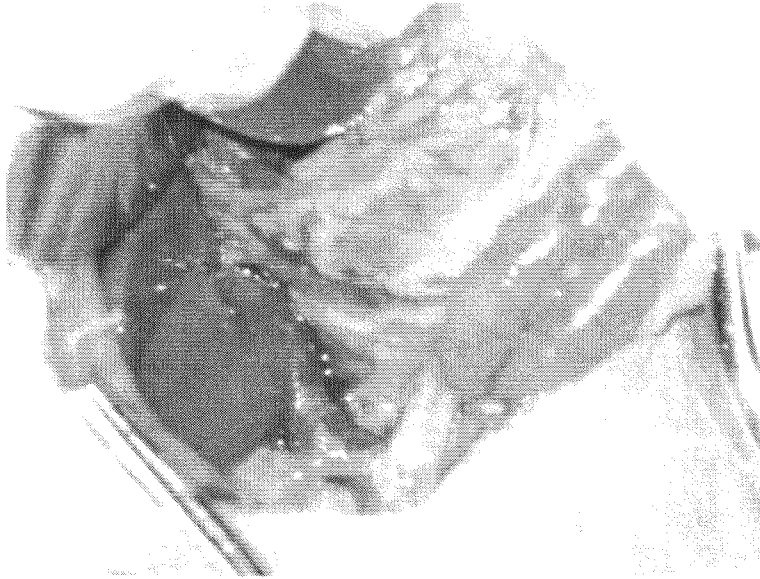
Una vez el animal anestesiado, se procede al rasurado abdominal y desinfección de la piel con povidona yodada. La operación se lleva a cabo por laparotomía media y evisceración del paquete intestinal, disección de la cava infrahepática por encima de las venas renales y de la grasa del retroperitoneo y disección del hilio hepático, en especial de la vena porta, prestando especial atención a la liberación de la misma de la arteria hepática común, que se encuentra íntimamente unida a la porta por su cara posterior. En esta fase es fundamental no

lesionar ninguna de las dos, puesto que durante el clampaje de la porta, la arteria es la única que suministra flujo sanguíneo al hígado. A continuación se hace pasar un primer hilo trenzado de 2-3 ceros por detrás de la cava y por detrás de la porta, justo por encima del confluente espleno-mesaraico y otro segundo hilo por debajo de dicho confluente. Al traccionar de ambas suturas en sentidos cefálico y caudal, respectivamente, ambos vasos sanguíneos quedan aproximados entre sí. Una vez dispuestos de este modo los vasos, son clampados con un clamp vascular de Satinsky, que mantiene ambos vasos en esa postura, permitiendo la realización de la técnica de anastomosis (Numata, 1983).

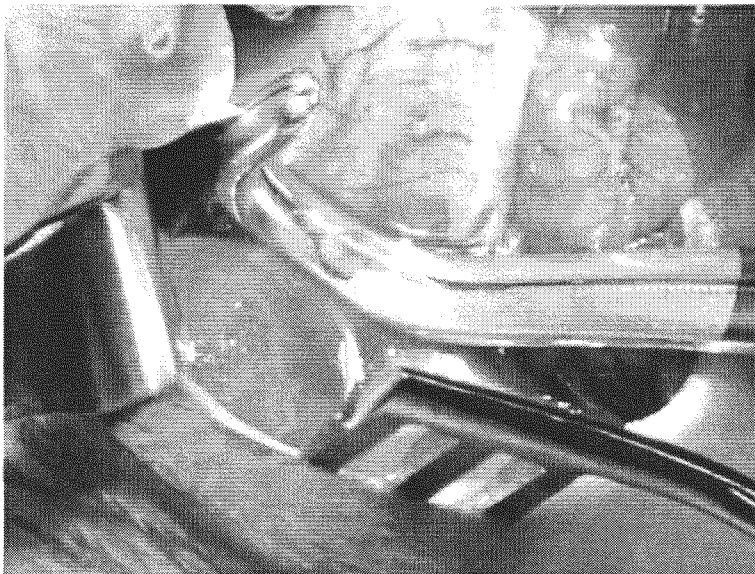
Para garantizar el éxito de la técnica, así como la viabilidad del animal tras la intervención, es necesario que el tiempo de oclusión vascular no exceda de 20 minutos, minimizando así el efecto de los fenómenos tromboticos tanto en la porta como en la cava, que impiden la supervivencia del animal. Cuando la operación no es efectiva no existirá descenso del peso del animal, como discutimos más adelante.

En el grupo *sham* se ha mantenido dicho clampaje 25 minutos en todos los animales, sin haberse producido ningún caso de mortalidad postoperatoria. En ratas con DPC o anastomosis esta mortalidad ha sido de un 12%. En las **Figuras-M1 a -M4** se muestra la operación.

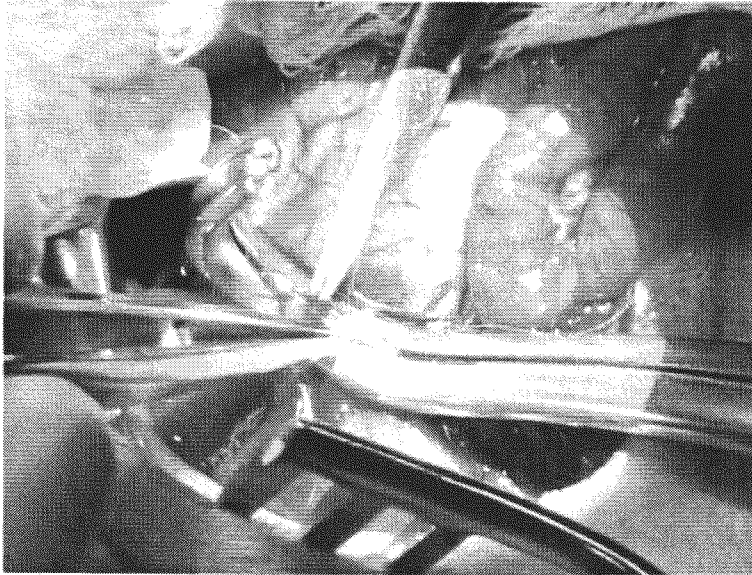




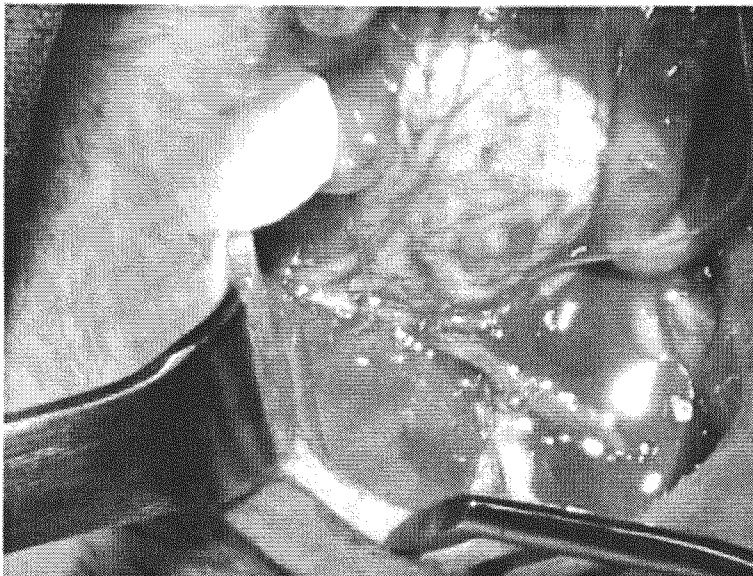
**Figura-M1.** Evisceración y búsqueda de la vena hepática.



**Figura-M2.** Clampaje.



**Figura-M3.** Cortar y coser cada extremo de las venas porta y cava



**Figura-M4.** Vista de la anastomosis terminada

### **2.3. Sacrificio**

El sacrificio de los animales se ha llevado a cabo por decapitación a las 4 semanas de la cirugía, tras anestesia con Hidrato de cloral (al 6%), 1,5 ml por cada 250g de peso del animal.

### **3. TRATAMIENTO CON IGF-I (*Insulin-like growth factor-I*)**

Un grupo de animales sometidos a DPC se ha subdividido en dos subgrupos:

- Un subgrupo sin tratamiento farmacológico
- Un subgrupo tratado con el factor de crecimiento semejante a la insulina- tipo 1 (IGF-1)

Ambos subgrupos se han utilizado para estudiar su efecto sobre los diferentes parámetros bioquímicos relacionados con la EH, fundamentalmente los niveles de amonio

El IGF-1 (GroPep, Australia), ha sido proporcionado por los Dres. Carlos Rodríguez y Jesús Prieto, del Centro de Investigaciones de Medicina Aplicada (CIMA) de Pamplona. El producto (liofilizado) se ha disuelto en HCl 10 mM, a una concentración de 1 mg/ml, y una vez alicuoteado (5 µl) lo conservamos a -80°C hasta su uso. En estas condiciones el producto es estable durante 3 meses.

Para el tratamiento se han descongelado las alícuotas de IGF-1 necesarias, diluyéndose cada alícuota con 500  $\mu$ l de suero fisiológico estéril. Se ha inyectado 250  $\mu$ l, subcutáneamente, a cada animal, (0,02  $\mu$ g /g de animal), cada 12 horas, durante 21 días

Al grupo control se le ha realizado el mismo tratamiento, pero inyectando placebo, HCl 10 mM, diluido con suero fisiológico.

#### **4. AISLAMIENTO DE TEJIDOS Y TOMA DE MUESTRAS**

Los tejidos se han obtenido de forma rápida tras el sacrificio del animal. Los restos de sangre se eliminan mediante sucesivos lavados con tampón de diferente composición según el tejido y el fin a que iban a ser destinados.

##### **4.1. Homogenizados de tejidos**

Se han utilizado homogenizados procedentes de un *pool* con los diferentes tejidos de ratas sanas para la realización de los estudios de western-blot. Para la inhibición de la glutaminasa *in vitro* se han utilizado tanto diferentes tejidos de ratas sanas como riñones de cerdo.

##### **4.1.1. Homogenizados de enterocito**

Los homogenizados de enterocito se preparan a partir de intestino de rata, utilizando fundamentalmente el duodeno y el ileon. Para ello, tras el sacrificio de las ratas por decapitación,

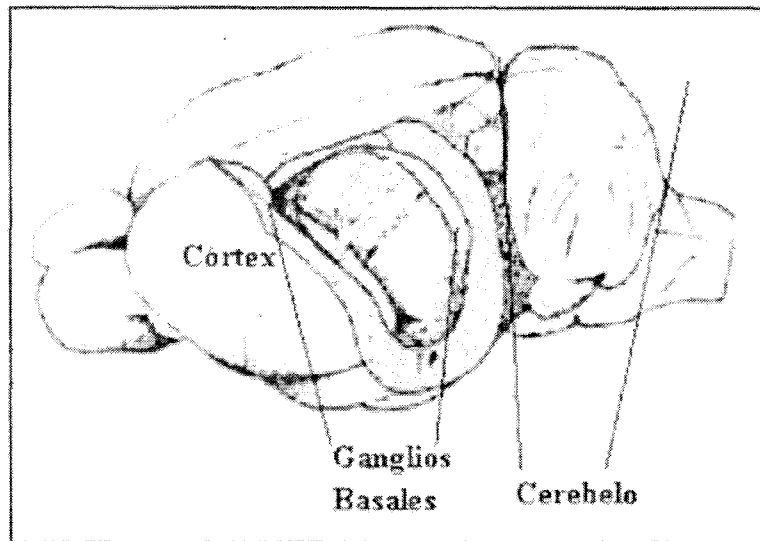
rápidamente se les extrae el intestino, se corta el duodeno y el íleon y se lavan en tampón fosfato salino frío (PBS: ClNa 0,1M, KCl 3mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,002M, pH 7,4). Posteriormente se corta con unas tijeras en trozos de aproximadamente 5 cm y se lavan de nuevo. Cada trozo se abre por la mitad y con ayuda de un porta se arrastran las vellosidades intestinales, que se vierten en un tubo de plástico y se pesa.

Unos 100 mg, de las vellosidades intestinales, se homogeniza en 1,5 ml de tampón de homogenización (Tris 10 mM, EDTA 1mM, sacarosa 320 mM, pH 7,4, mas PMSF 0,005 mM, justo antes de homogeneizar), en un homogenizador mecánico Potter-Elvehjem con pistilo de teflón, en posición 8 (1000 r.p.m.) dando 5 pasadas, manteniendo la muestra en hielo. Se centrifuga a 1000 x g y el sobrenadante se ha utilizado para la obtención de mitocondrias.

#### **4.1.2. Homogenizados de cerebro**

Una vez diseccionado el cerebro, se obtiene en primer lugar el cerebelo. Posteriormente tomamos las diferentes áreas siguiendo el protocolo usado por el Dr. Vicente Felipo. Las diferentes áreas tomadas (cortex, ganglios basales y cerebelo) se muestran en el siguiente esquema (**Figura-M5**).

Una vez separadas las diferentes áreas, éstas se han homogeneizado de manera análoga a la descrita para el caso de los enterocitos.



**Figura-M5.** Esquema de las diferentes áreas cerebrales tomadas para los distintos estudios. Se extrajeron en ambos hemisferios, separando el hipotálamo.

#### **4.1.3. Homogenizados de riñón de cerdo**

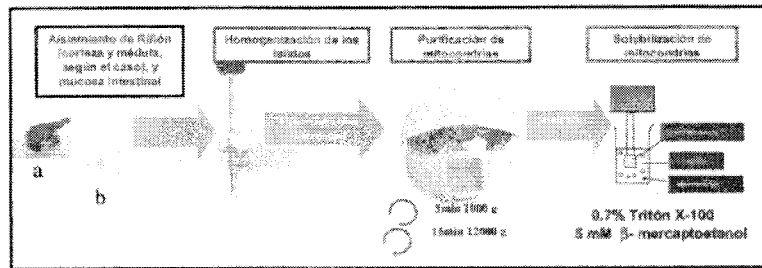
Los riñones se han lavado en primer lugar con PBS para eliminar la mayor parte de la sangre, se han troceado y seguidamente se han homogenizado en tampón de homogenización. Se ha centrifugado a 3000 g, 15 min, y el sobrenadante se ha alicuoteado en fracciones de 25 ml, que posteriormente, tras congelarse a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se han liofilizaron. El polvo obtenido una vez mezclado hasta homogeneidad, se ha guardado en un recipiente herméticamente cerrado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Este producto constituye el material enzimático de partida (enriquecido en actividad glutaminasa) para realizar todos los ensayos de inhibición *in vitro* de la glutaminasa, por diferentes inhibidores.

#### **4.2. Obtención y homogenizados de mitocondrias**

Se han obtenido mitocondrias, por el método de Haser y colaboradores (**Haser, 1985**), tanto a partir de tejidos frescos como a partir de tejidos congelados a -80 °C, no observándose diferencias significativas para nuestro estudio.

El sobrenadante obtenido en la homogenización de los tejidos, se ha centrifugado a 13.000 x g, 10 minutos. El precipitado (enriquecido en mitocondrias) se ha resuspendido en tampón de homogenización, y se ha centrifugado durante 5 minutos a 13.000 g. El proceso se repite dos veces más. El precipitado, así obtenido, se resuspende en tampón de incubación (Tris 20 mM, manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, EDTA 1mM, pH 8), y constituye una fracción altamente enriquecida en mitocondrias.

Las proteínas mitocondriales se han solubilizado utilizando tampón de incubación que contenía  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM y Tritón X-100, 0.7% (**Ramos, 2004**), para la realización de electroforesis y western-blot. Las mitocondrias también se han solubilizado en tampón de homogenización, únicamente, para la determinación del contenido en proteínas y medida de la actividad enzimática. En la **Figura-M6** se muestra esquemáticamente el proceso de preparación de mitocondrias.



**Figura-M6.** Esquema de la preparación de la mitocondrias de riñón completo, corteza y médula renal (riñón diseccionado (a), al que se le ha extraído parte de la corteza renal), así como también enterocitos procedentes de raspado intestinal (b).

#### **4.2.1. Obtención de mitocondrias sinápticas y no-sinápticas**

Para la obtención de mitocondrias no sinápticas se ha seguido una variación del procedimiento descrito por Kosenko y colaboradores (**Kosenko y col., 2001**).

Tras la decapitación del animal, se ha abierto el cráneo y extraído la masa encefálica rápidamente, se sumerge en tampón de homogenización sin EDTA ni EGTA bien frío (granizado pero sin cristales) y se coloca sobre un bloque congelado de tampón de homogenización sin EDTA ni EGTA, y se procede a diseccionar las diferentes áreas lo más rápidamente posible.

Cada zona de tejido se ha homogenizado en un *potter* de vidrio, a mano, con suavidad, 6 pasadas, evitando la formación de espuma. El homogenado locentrifugamos a 2000 x g, durante 3 min, a 4 °C, y recogemos el sobrenadante. El precipitado se resuspende de nuevo en el mismo volumen de tampón de



homogenización y lo centrifugamos nuevamente a 2000 x g, durante 3 min, a 4°C, recogiendo nuevamente el sobrenadante. Se han juntan los dos sobrenadantes y se centrifugan durante 10 min a 13000 x g, recogiendo el precipitado. Las mitocondrias así obtenidas se han lavado con tampón de homogenización sin EDTA y nuevamente se centrifugan, 10 min, a 13000 x g, a 4°C.

La separación de las mitocondrias de los astrocitos se ha llevado a cabo en un gradiente de Ficoll. Se disuelve el precipitado de mitocondrias en Ficoll al 3% (preparado a partir del Ficoll al 6%), y se mezcla ayudándose suavemente con la punta de una pipeta. Se añade gota a gota el Ficoll al 6%. El volumen de Ficoll 3%- Ficoll 6% está en proporción 4:1.

Centrifugamos 15 min a 2000 x g, a 4°C y lavamos con tampón de homogenización sin quelantes, guardándose las mitocondrias congeladas a -80 °C. Para la rotura de la pared mitocondrial y la liberación de la enzima glutaminasa en la solución, se descongelan las muestras en dos ciclos de congelación-descongelación antes de la realización de la medida de actividad enzimática (**Figura-M7**).

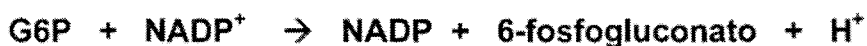
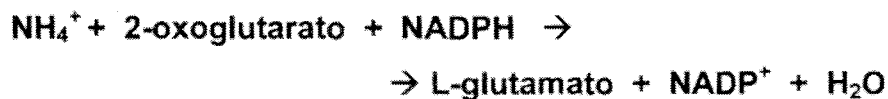
Esta muestra de mitocondrias de astrositos, de las diferentes áreas cerebrales, constituyen las muestras de partida para la realización de los estudios de western-blot y cuantificación de oxidación proteica (añadiendo  $\beta$ -

mercaptoetanol 5mM y Tritón X-100 ,0.7%) y para medidas de actividad glutaminasa.

## **5. DETERMINACIONES BIOQUIMICAS**

### **5.1. Determinación de amonio**

La cantidad de amonio presente en la muestra se ha medido por el método enzimático de la glutamato-deshidrogenasa (ROCHE, Barcelona), en un analizador COBAS Integra 700. La glutamato-deshidrogenasa (GLDH) cataliza la aminación reductora del 2-oxoglutarato en presencia de  $\text{NH}_4^+$  y NADPH, para producir glutamato y  $\text{NADP}^+$ . La concentración del  $\text{NADP}^+$  es directamente proporcional a la concentración del amonio consumido, por lo que la reacción se puede seguir midiendo la disminución de la absorbancia del NADPH a 340 nm (**Van Anken y Schiphorst, 1974**). Para desplazar la reacción completamente hacia la derecha y poder hacerla cuantitativa, esta reacción se acopla a una segunda reacción, la de la G6P-deshidrogenasa, que consume el  $\text{NADP}^+$  que se forma en la primera.



### **5.1.1. Determinación de amonio en sangre**

Tras dormir al animal, con hidrato de cloral, se pincha la yugular y, rápidamente, se recogen unos 150 µl de sangre en un tubo Eppendorf con 150 µl de TCA al 10 % (frío), se pone en hielo, y se deja precipitar las proteínas durante 15 minutos. Centrifugamos a 13000 x g, durante 15 min, a 4 °C y nos quedamos con el sobrenadante. Del sobrenadante obtenido tomamos 150 µl en un Eppendorf y lo ponemos en hielo. Añadimos KHCO<sub>3</sub> 2M, preparado el mismo día de su uso, para neutralizar las muestras, pH 6.8- 7.5, ya que en medio ácido la glutamina se descompone en glutámico y amonio. Esta muestra, obtenida por precipitación con TCA, la hemos denominado sangre desproteinizada (**Kosenko y col, 2001; Romero-Gómez y col., 2006**).

La sangre también se ha recogido en tubos preparados con EDTA (10mg/ml), suero y en tubos sin anticoagulante, plasma. Estos tubos también se han utilizado para medir la cantidad de amonio como se ha indicado anteriormente. Estos ensayos se han realizado para ver la influencia de la medida de amonio en estas muestras respecto de las preparadas con TCA al 10%.

### **5.1.2. Determinación de amonio en tejidos**

Normalmente hemos utilizado tejidos congelados a -80°C, por lo que la homogenización se ha realizado en nitrógeno

líquido en mortero. Una vez homogenizado, añadimos 2 volúmenes de TCA al 10%, y sonicamos (6 ciclos de 30 segundos). Seguidamente centrifugamos a 13000 x g, 15 min, a 4°C. El sobrenadante se neutraliza con  $\text{KHCO}_3$  2M, igual que en la sangre y determinamos las distintas cantidades de amonio evitando la descongelación de los tejidos en su manipulación. La determinación de las concentraciones de amonio en tejidos se realizó como máximo dos días después del sacrificio (**Kosenko y col., 2001**).

## **5.2. Determinación de óxido nítrico**

El óxido nítrico se ha determinado, utilizando el suero como muestra de partida, por el método enzimático de la nitrato reductasa, mediante la determinación indirecta del paso de nitrato a nitrito. El nitrito se ha determinado mediante la reacción de diazotación de Griess-Illosay, en dos pasos, en los que el  $\text{NO}_2^-$  acidificado produce agentes nitrosantes, los cuales reaccionan con el ácido sulfanílico para producir el ion diazonio. Este ión es entonces acoplado a *N*-(1-naftil)-etilendiamina para formar el compuesto cromóforo azoderivado, un compuesto de color rosado, que absorbe luz a 565 nm (según las instrucciones del kit comercial, R&D System, Minneapolis, **Miles y col., 1996**).

En un primer paso se diluyen las muestras de suero con tampón diluyente (R&D System, Minneapolis), se filtra a través de un filtro de Microcon YM-10 (Millipore Iberica).

Se añade sulfanilamida al 1% (p/v) disuelta en HCl 2.5 M y cloruro de *N*-(1-naftil)-etilendiamina al 0.02% (p/v) (*N*-NEDA).

Se deja desarrollar el color a temperatura ambiente durante 10 min y se lee a 565 nm.

La concentración de nitrito se determina por extrapolación a partir de una recta de calibrado hecha con cantidades conocidas de nitrato en condiciones semejantes. El estándar también fue proporcionado por la casa comercial R&D System (Minneapolis).

### **5.3. Determinación de la glutaminasa (GAP)**

La determinación de la actividad GAP de enterocito se ha llevado a cabo mediante dos procedimientos distintos: adaptación del método de Lund (Lund, 1988) y por el método de Heini (Heini y col., 1987).

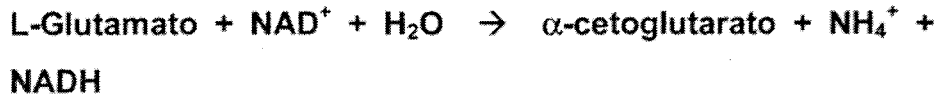
#### **5.3.1. Método de Lund**

La medida de la actividad de la enzima GAP mitocondrial de enterocitos se determinó espectrofotométricamente a 340 nm, siguiendo la aparición del NADH, acoplando la reacción de la glutaminasa (GAP: L-glutamina amidohidrolasa (EC 3.5.1.2.)), a la catalizada por la Glutamato deshidrogenasa (Glu DH: L-glutamato: NAD(P)<sup>+</sup> oxidoreductasa (EC 1.4.1.3.)).

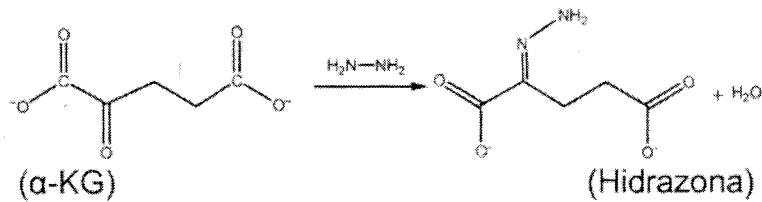
**GAP**



**GluDH**



Para desplazar la segunda reacción completamente hacia la derecha, trabajamos en un medio con baja concentración de protones (pH 8), y adicionamos hidrazina, que reacciona con el  $\alpha$ -cetoglutarato.



Los principales parámetros cinéticos de GAP (isoenzima mitocondrial intestinal) se determinaron, previamente a la medida de la actividad, mediante diversos métodos de linealización (Lineweaver-Burke) y el método de la representación lineal directa o representación de Eisenthal y Cornish-Bowden utilizando para ello el programa EnzFitter (Biosoft) (Eisenthal y Cornish-Bowden, 1974). (<http://www.biosoft.com/w/enzfitter.htm>).

Los ensayos cinéticos se han realizado bajo condiciones catalíticas, utilizando las siguientes condiciones: Tampón de

reacción: Tris 100 mM, Fosfato 300 mM, EDTA 2 mM, Hidracina 0,63 M, NAD<sup>+</sup> 30 Mm, ADP 100mM, concentración fija de la enzima GluDH (12U/mL) y concentraciones variables de Gln entre 5-150 mM.

La reacción se dispara añadiendo la muestra, se mide la absorbancia-1 a 340 nm, y se incuba a 37°C durante 40 min., Se mide la absorbancia-2.

La actividad glutaminasa se ha calculado aplicando la siguiente formula.

$$\text{Actividad GAP (U/mL)} = \frac{(\Delta \text{ Absorbancia}) (1,5 \cdot 10^{-3}) 10^6 4}{\epsilon d V t}$$

Donde

( $\Delta$  Absorbancia) / $\epsilon$  d → concentración en moles/litro en los 2 ml

Factor de dilución: 4

Volumen final de la MUESTRA\* →  $1,5 \cdot 10^{-3}$  l

V: volumen de "solución mitocondrial" en ml

t: tiempo.

La actividad específica se ha expresado como Unidades ( $\mu$ mol de Gln/min)/mg proteína.

### **5.3.2. Método de Heini**

Se basa en la medida directa de uno de los productos de la reacción, el amonio. El ensayo se realiza en dos pasos:

## Materiales y Métodos

---

\* Un primer paso o reacción de la glutaminasa propiamente dicha:

- Tampón de reacción ( $K_2HPO_4$  150 mM pH 8; L-Gln 171 mM,

NH<sub>4</sub>Cl 1 mM, pH 8)

- Muestra (glutaminasa liofilizada)

- Incubar 60 min a 37°C

- TCA (20%) (parar reacción), baño de hielo 15 min

- Centrifugar a 12000 x g, 5 min, a 4 °C.

\* Un segundo paso o medida del amonio formado mediante el método

del OPA :

- Reactivo OPA ( $K_2HPO_4$  0,2 M pH 7,4, 0,7% de etanol, O-

ftaldialdehido 10mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,4mM).

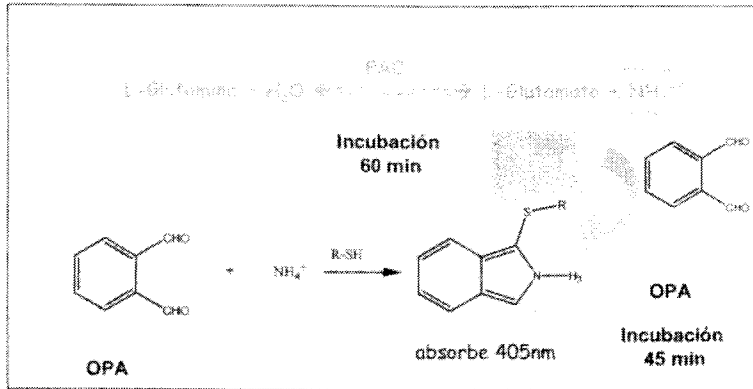
- Añadir 50  $\mu$ l de la reacción anterior

- Incubamos 45 min en oscuridad.

- Leer la absorbancia a 405 nm en lector de placas

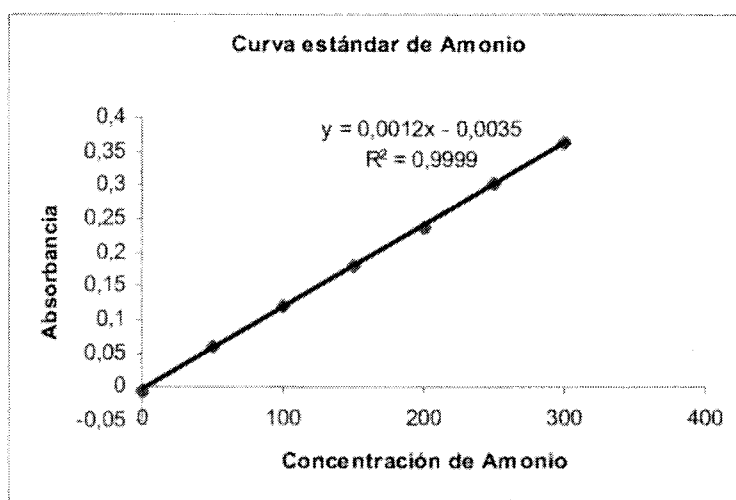
(BIORAD)





**Figura-M7.** Esquema de medida de actividad glutaminasa por el Método de Heini.

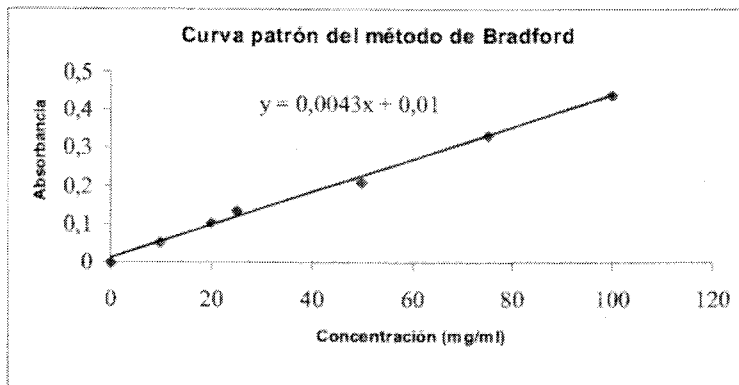
La concentración de amonio se determinó en cada caso por comparación con una recta de calibrado hecha con cantidades conocidas de amonio en condiciones semejantes. En la **Figura-M7** se muestra un esquema del procedimiento seguido. En la **Figura-M8** se muestra un ejemplo de curva patrón con diferentes concentraciones de amonio.



**Figura-M8.** Curva patrón de amonio. Concentraciones en placa de 0 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250mM y 300 mM de  $\text{Cl NH}_4$ .

#### **5.4. Determinación de proteínas.**

La determinación de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Bradford (**Bradford, 1976**). El método de Bradford se utiliza para cuantificar proteínas totales en un rango comprendido entre 100-1  $\mu\text{g/ml}$ , empleando como patrón albúmina bovina. El método se basa en las interacciones (básicamente hidrofóbicas e inespecíficas) de las proteínas con determinados colorantes. El complejo que se forma, de color azulado, presenta un máximo de absorbancia a 595nm.



**Figura-M9. Curva patrón de BSA. Método de Bradford.**

## **6. TECNICAS ANALITICAS**

### **6.1. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida**

Las separaciones analíticas mediante electroforesis se han realizado en geles de poliacrilamida: al 5% el gel de empaque, y al 8 y 10 % (p/v) el gel de resolución, utilizando como equipo de electroforesis la Mini-PROTEAN II Duak slab cells de BioRad, con una fuente de alimentación EPS 500/400 de Pharmacia, a 4°C.

Los geles, al 8 %, se preparan mezclando: 4,8 ml de una disolución que contine acrilamida al 30 % (p/v) y bis-acrilamida al 0.8 % (p/v), 3 ml de una disolución amortiguadora Tris-HCl 3 M, pH 8.8, 16 µl de TEMED comercial, 120 µl de solución de persulfato amónico al 2% (p/v) preparada inmediatamente antes

de su uso y agua destilada c.s.p. 12 ml. Para geles a otras concentraciones de acrilamida se varia el volumen de la disolución de acrilamida y se corrige el volumen final de agua destilada. Una vez polimerizados, los geles se cubren con una pequeña capa de gel de "empaquetamiento" conteniendo 5 % (p/v) de acrilamida, utilizando una solución amortiguadora a pH 6.8.

Las muestras, 20-40 µg de proteína, se mezclan con solución amortiguadora Tris-HCl 0.1M, pH 6.8 conteniendo glicerol al 10 % (p/v) y azul de bromofenol al 0.1 % (p/v), usado como marcador del frente de la electroforesis, se someten a una intensidad de corriente de 25 mA/gel, hasta que el colorante alcanza el extremo inferior del gel. La solución amortiguadora usada como electrolito es Tris 0,025 M y glicina 0,19 M, pH 8.4.

El peso molecular se ha estimado a partir de su movilidad electroforética por comparación con proteínas patrones (Sigma) con el software Quantity One (BIORAD) y el densitómetro calibrado GS-800 (BioRad).

#### **6.1.1. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida**

Para la tinción de los geles se han preparado las siguientes soluciones:

|                                 |                   |              |
|---------------------------------|-------------------|--------------|
| <b>Solución de incubación S</b> | Acetato sódico    | 0.5 M        |
|                                 | Tiosulfato sódico | 0.2% (w/v)   |
|                                 | Glutaraldehído    | 0.5% (v/v)   |
|                                 | Etanol            | 30% (v/v)    |
| <b>Solución de tinción S</b>    | Nitrato de plata  | 0.1% (w/v)   |
|                                 | Formaldehído      | 0,01% (v/v)  |
| <b>Solución de lavado S</b>     | Carbonato sódico  | 2.5% (w/v)   |
| <b>Solución revelado S</b>      | Carbonato sódico  | 2.5% (w/v)   |
|                                 | Formaldehído      | 0.01% (v/v)  |
| <b>Solución de parada S</b>     | EDTA              | 0.05 M       |
|                                 | Timerosal         | 0.02% (w/v)  |
| <b>Solución de incubación C</b> | Metanol           | 34% (v/v)    |
|                                 | Acido fosfórico   | 2% (v/v)     |
|                                 | Sulfato amónico   | 17% (w/v)    |
| <b>Solución de tinción C</b>    | Metanol           | 34% (v/v)    |
|                                 | Acido fosfórico   | 2% (v/v)     |
|                                 | Sulfato amónico   | 17% (w/v)    |
|                                 | Serva Blue G-250  | 0.066% (w/v) |
| <b>Solución de lavado C</b>     | Metanol           | 25% (v/v)    |

### **6.1.1. a. Tinción con Coomassie**

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se localizaron tiñéndolas por inmersión de los geles en una solución de Azul de Coomassie coloidal de acuerdo con el protocolo descrito por Klose (**Klose, 1999**). La tinción con azul de Coomassie permite visualizar las proteínas gracias a la

interacción inespecífica entre los restos aminoacídicos de las proteínas y el colorante. El límite de detección de este método es de aproximadamente 1 µg.

La tinción con azul de Coomassie coloidal es más específica y sensible, comparado con el método estándar de tinción con azul de Coomassie, ya que el colorante Coomassie coloidal es mucho más fino que el azul de Coomassie estándar, penetrando de manera mucho más fácil en el gel de electroforesis y por tanto se une más fácilmente a las proteínas.

Tras la fijación, durante 1 hora en agitación suave y constante, el gel se lava tres veces durante 30 min, con abundante agua Milli Q. A continuación se incuba durante 4 hora en la solución de tinción-C (solución de azul brillante de Coomassie G-250 coloidal). Por último el gel se destiñe en la solución de desteñido C durante unas 2 horas, utilizando trozos de esponja para acelerar el desteñido, al final del cual las proteínas se visualizaban como bandas de color azul, mientras que el resto del gel se ha decolorado.

#### **6.1.1. b. Tinción con Plata**

La tinción con plata se ha llevado a cabo de acuerdo con el protocolo descrito por Klose (**Klose y Kobalz, 1995**). Este procedimiento es muy sensible con unos límites de detección de proteínas entre los 1 y 10 ng. El procedimiento se funda en el elevado potencial reductor del ión  $\text{Ag}^+$ . El ión  $\text{Ag}^+$  forma

complejos con las proteínas de una manera mucho más fuerte que con la poliacrilamida. Los iones  $\text{Ag}^+$  que están formando complejos se reducen mucho más rápido que los iones  $\text{Ag}^+$  libres. Durante todo el proceso de tinción con plata, el gel está en constante agitación; y tras cada etapa se eliminan las disoluciones correspondientes por succión con una bomba de agua.

En una primera etapa el gel se incuba durante 2 horas en la solución de incubación-S. Durante esta etapa el tiosulfato sódico y el glutaraldehído, presentes en la solución, actúan como agentes complejantes y unen las proteínas a través de enlaces covalentes. A continuación el gel se lava dos veces con abundante agua MilliQ, con el fin de eliminar al máximo el glutaraldehído libre y minimizar los ruidos de fondo (*background*). La tinción con plata dura unos 30 min., utilizándose, en esta etapa el formaldehído como agente reductor. Una vez tratado el gel con la plata, éste se lava con la solución de lavado-S durante 1 min y se revela con la solución de revelado-S durante varios minutos y una vez que se ven claramente las manchas se para la reacción añadiendo la solución de parada-S.

### **6.1.2. Secado y conservación de los geles**

Una vez desteñido el gel es necesario guardar los resultados y almacenar/conservar el gel. Con el gel aun húmedo, se escanea en un escáner equipado con un

transiluminador y las imágenes se guardan en formato TIFF con una resolución de 150-300 dpi. A continuación el gel se seca. Para ello se coloca entre dos piezas de celofán húmedo y dos piezas de papel de filtro Wattman N°3, formando una especie de "sándwich", procurando eliminar cualquier burbuja de aire entre el gel y el celofán, así como cualquier tipo de plegamientos, y se coloca en un secador de geles. El secado se lleva a cabo mediante la aplicación de vacío y calor (80 °C) durante 2-3 horas. El gel, una vez seco, se marca con número de registro, nombre de la muestra y fecha, y se guarda a temperatura ambiente en sobres cerrados al vacío.

## **6 .2. Análisis de aminoácidos por HPLC**

### **6.2.1. Análisis de Glutamina**

La medida de la Gln se ha llevado a cabo por derivatización con PITC, según el método de Pico-Tag (Waters corporation) para aminoácidos fisiológicos, utilizando una columna, de 3,9 x 300 mm (C18 Pico-Tag, P/N WAT010950, Waters). Fotografía del aparato en la **Figura-M13**.

El análisis por HPLC se ha realizado utilizando un sistema de Waters (Millipore Corporation, Milford, MA) para el análisis de aminoácidos por HPLC, equipado con una bomba Waters 600E (Multisolute Delivery System), un detector de fluorescencia Water-474 (Scanning Fluorescence Detector), un detector de UV Waters-2487 (Dual  $\lambda$  Absorbance Detector), y una columna de fase reversa (C18 Pico-Tag, P/N WAT010950 de 3,9 x 300 mm,



Waters). Hemos utilizado el software Millenium-2000 para el registro y tratamiento de datos.

Derivatización con feniltioisocianato (PTIC) Una vez terminada la reacción, previa a la derivatización de la muestra, es necesario extraer los aminoácidos libres, para lo que hemos seguido el siguiente protocolo: En un tubo Eppendorf se añade 100µl de la muestra, se adicionan 100µl de Tricloroacético al 20% para precipitar las proteínas. Se mantiene en hielo durante 10 minutos y pasado este tiempo se centrifuga a 8000 x g durante 15 minutos, recogiendo el sobrenadante.

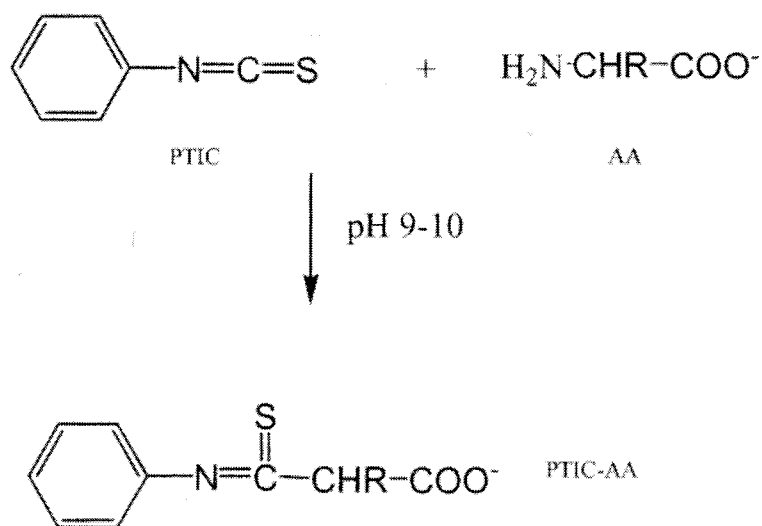
La Gln y los aminoácidos libres se derivatizan según la técnica que se describe a continuación (**Tsao y Otter, 1999**). Los datos mostrados en esta tesis mediante este método han sido únicamente para la determinación de la glutamina, para los demás aminoácidos libres se ha realizado el método que se describe en el apartado siguiente (6.2.2.)

En un tubo Eppendorf se alicuotean 50 µl de muestra desproteinizada (mezcla de reacción u homogenado), y se secan al vacío en una centrifuga de vacío. A continuación, se adicionan 10 µl de solución de rehidratación (etanol, agua Milli-Q y trietanolamina en proporción 2:2:1) para neutralizar los residuos ácidos. Posteriormente se agitan y se secan a vacío.

Las muestras se derivatizan con 20 µl de solución de derivatización (etanol, agua, trietilamina y PTIC, en una relación

7:1:1:1). La mezcla se agita bien y se deja reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos, antes de secarlas a vacío en una SPD Speed Vac (Thermo Electron Corporation). La reacción de derivatización se muestra en la **Figura-M10**.

Una vez las muestras secas, se reconstituyen con 10µl de solución de reconstitución (HNa<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, ácido fosfórico al 10%, acetonitrilo al 5%, pH 7,4).



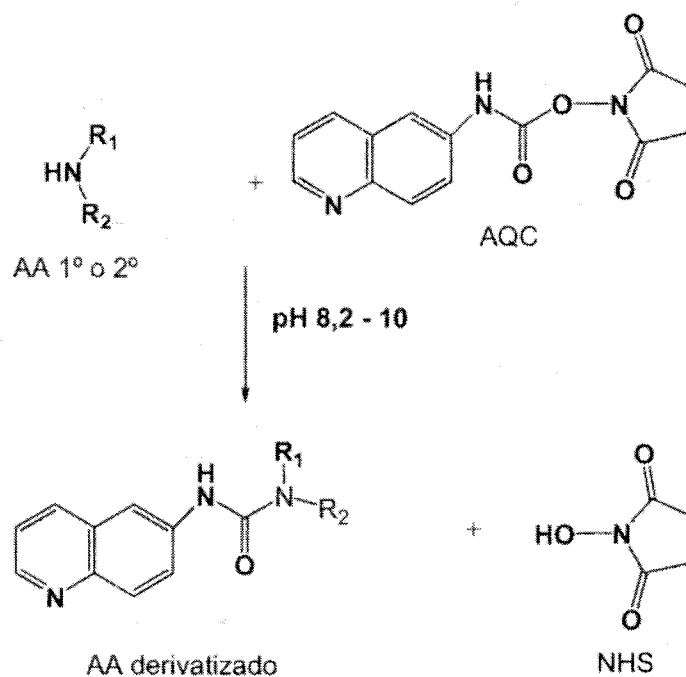
**Figura-M10. Reacción de derivatización (PTIC: feniltioisocianato, AA: aminoácido)**

### 6.2.2. Análisis de aminoácidos libres

El contenido en aminoácidos libres se ha determinado mediante HPLC, previa desproteinización de la muestra con ácido tricloroacético (TCA) al 10%.

Derivatización con AQC La derivatización se ha llevado a cabo utilizando el reactivo 6-aminoquinolil-*N*-hidroxi-succinimidil carbamato (AQC), que es un derivado heterocíclico del *N*-hidroxisuccinimidil carbamato, que reacciona tanto con aminas primarias como secundarias, convirtiéndolas en derivados de la urea estables, fácilmente detectables por fluorescencia a 395 nm, y liberando 6-aminoquinolina (AMQ), que no interfiere en la detección.

El proceso de derivatización tiene lugar de acuerdo con la reacción:



**Figura-M11. Reacción de derivatización con 6-aminoquinolil-*N*-hidroxi-succinimidil carbamato (AQC), liberando *N*-hidroxi-succinimidil (NHS)**

Los derivados aminoacídicos así obtenidos son estables a temperatura ambiente durante una semana.

Para la identificación y cuantificación de los aminoácidos se ha utilizado el estándar de aminoácidos de Pierce (**Figura-M12**). El contenido aminoacídico de las distintas muestras, expresado en porcentaje de aminoácido respecto al total de la muestra, se ha llevado a cabo mediante el software Millennium-2000 y Empower. El procedimiento seguido ha sido una modificación del descrito por Reverter y col. (**Reverter y col., 1997**) y el manual de Waters para la determinación de aminoácidos. El procedimiento se ha realizado como se describe a continuación:

Se alicuotean 35  $\mu$ l de muestra desproteínizada y 200  $\mu$ l de tampón Fluorborato ACQ para la obtención del pH óptimo de derivatización (entre 8,2 y 10). Las muestras así obtenidas se filtran a través de 0,22  $\mu$ m, en tubos Microcon YM-10 (Millipore Iberica). A 70  $\mu$ l de esta solución filtrada se añaden 37  $\mu$ l de reactivo fluorescente, se agitan 15 segundos en vórtex, dejamos a temperatura ambiente durante 1 min lo introducimos 10 min en un bloque a 55°C. Se inyectan 5  $\mu$ l en el HPLC.

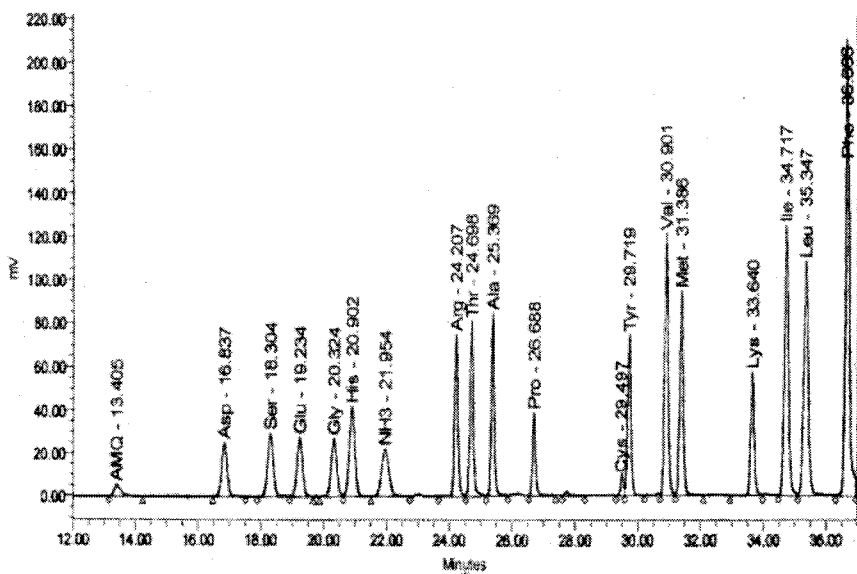
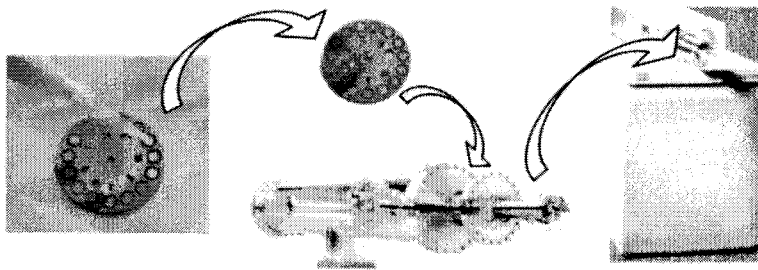


Figura-M12. Cromatograma de la solución estándar de aminoácidos (2,5  $\mu$ moles/ml de los aminoácidos).



**Figura-M13.** HPLC usado en los diferentes análisis.



**Figura-M14.** Figura ilustrativa de la metodología seguida desde la preparación de la matriz hasta la colocación de la placa en el MALDI-TOF.

### **6. 3. Análisis por espectrometría de masas**

#### **6.3.1 Control de calidad del péptido por MALDI-TOF**

Para corroborar la pureza del péptido inmunológico (la forma de obtención se muestra en el apartado 7.1.1) y comprobar su identificación se procede al análisis del péptido inmunogénico frente a la glutaminasa, mediante la técnica de ionización blanda: ionización desorción asistida por láser con una matriz (MALDI, utilizando las siglas inglesas de Matriz-Assisted-Laser-Desorption-Ionization), y detectando los iones en un detector de tiempo de vuelo (TOF, Time-of-Flight).

Para comprobar la calidad del péptico, conocido su peso molecular, se ha procedido como sigue: disolvemos 3-4 mg del péptido en 1 ml de TCA 0,1%. Preparamos la solución de la matriz (15 mg/ml de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi cinámico, TFA al 0.03% (v/v) y acetonitrilo al 70%). Tomamos 5  $\mu$ l de matriz y 5  $\mu$ l de muestra de péptido y mezclamos bien. Cargamos 2  $\mu$ l de la mezcla en un pocillo del disco y se deja cristalizar (secar) a temperatura ambiente o a 37°C, como se muestra en la **Figura-M14**. Una vez bien seco, se lleva el disco al espectrómetro de masas, y se bombardea con un láser de N<sub>2</sub>.

El espectro del péptido se ha obtenido en un espectrómetro de masas MADI-TOF (TOFSPEC, Micromass), trabajando en el modo reflectrón. Con una precisión por debajo de 0,1 Da utilizando un calibrador interno. El espectro se obtiene a partir de la acumulación de los resultados obtenidos de unos 100-140 bombardeos (espectros). La calibración se ha realizado

## **Materiales y Métodos**

utilizando, como estándar interno, el pico monoisotópico correspondiente al trimero de la matriz ( $3M+H^+ = 568,14$ ). Los datos se han procesado mediante el programa informático XMASS 5.0 proporcionado por el fabricante del espectrómetro.

### **6.3.2 Preparación de las muestras para nLC-ESI-MS/MS**

Las disoluciones que se han utilizado en la preparación de las muestras para espectrometría de masas, para el sistema Q-TRAP LC/MS/MS, fuente de iones Flow Nanospray o nLC-ESI-MS/MS (para identificación de proteínas oxidadas), son las siguientes:

|                                                         |                                                                          |                               |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <b>Solución de desteñido</b>                            | 100 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3$                                         | 60%<br>(v/v)                  |
|                                                         | Acetonitrilo                                                             | 40%<br>(v/v)                  |
| <b>Solución de tripsina</b>                             | Tripsina 12,5ng/ $\mu\text{l}$<br>(Promega Sequencing grade, cat.#V5111) | 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
|                                                         | $\text{NH}_4\text{HCO}_3$                                                | 50 mM                         |
| <b>Solución DTT</b>                                     | Ditiotreitol (DTT)                                                       | 20 mM                         |
|                                                         | $\text{NH}_4\text{HCO}_3$                                                | 100 mM                        |
| <b>Solución de IAM</b>                                  | Yodoacetamida (IAM)                                                      | 55mM                          |
|                                                         | $\text{NH}_4\text{HCO}_3$                                                | 100 mM                        |
| <b>Solución de <math>\text{NH}_4\text{HCO}_3</math></b> | $\text{NH}_4\text{HCO}_3$                                                | 20 mM                         |
| <b>Solución de <math>\text{NH}_4\text{HCO}_3</math></b> | $\text{NH}_4\text{HCO}_3$                                                | 100 mM                        |



Digestión in gel

Las bandas de proteínas se cortan con un sacabocado/bisturí y trocean en fragmentos más pequeños. Se colocan en la solución de desteñido durante toda la noche a temperatura ambiente. Tras mantenerlas en 1 ml de nueva solución de desteñido 10 min se agita en vórtex. Repetimos 3 veces, quitando el líquido cada vez. A los fragmentos de la banda añadimos 100 µl de amonio 100 mM, y con agitación, quitamos el sobrenadante y se deshidratan añadiéndole 100 µl de acetonitrilo. Repetimos este proceso dos veces. Se elimina la fase líquida, y los trozos de gel se pasan a un tubo de 0,25 ml y se secan por completo en una centrifuga de vacío. A continuación se procede a la reacción de reducción y alquilación. Se sumergen los trozos de gel en 100 µl de solución de DTT y se incuba durante una hora a 60°C. Se quita la solución de DTT y se añade 100 µl de la solución de IAM, incubándose en oscuridad y a temperatura ambiente durante 45 min. Quitamos la solución de IAM y añadimos 100 µl de solución de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100 mM y agitamos, manteniendo el gel en esta solución durante 10 min. Lo quitamos y añadimos 100 µl de acetonitrilo y agitamos nuevamente, incubamos durante 10 min. Repetimos 2 veces este proceso.

Secamos a vacío el gel, y procedemos a la digestión con tripsina. Para ello se añaden 50 µl de solución de tripsina a 4°C e incubamos durante 45-60 min en baño con hielo, permitiendo actuar a la proteasa (tripsina) dentro del gel y minimizando así el proceso de autodigestión. Quitamos la solución de digestión y

## Materiales y Métodos

---

añadimos 25 µl de solución de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  20 mM, sin enzima. El proceso de digestión se deja actuar toda la noche a una temperatura de 37°C. y a continuación centrifugamos durante 1 min. y sonicamos durante 15 min. Recolectamos el líquido de digestión. Los péptidos se eluyen del gel sumergiendo alternativamente el gel tres veces durante 10 min cada vez en 100 µl ácido fórmico al 5% (hinchado del gel) y cuatro veces (10 min cada vez) en 100 µl de acetonitrilo (exprimido del gel), recogiendo todas las fases líquidas por centrifugación y secándolas en la centrifuga de vacío.

### Eliminación de sales

Se secan los sobrenadantes que contienen los péptidos tripticos. A continuación añadimos una solución de acetonitrilo al 5% y ácido fórmico al 0,1%.

Hacemos pasar esta solución por una columna de intercambio iónico Spincolumn™ (Con't, Harverd Apparatus, G50-C18) previamente compactada con 100 µl de disolvente A (Acetonitrilo al 80% y ácido fórmico al 0,1%). Una vez añadidos los 100 µl se centrifuga 4 min a 3100 rpm, repitiendo este proceso tres veces. Equilibramos con 100 µl de disolvente B (Acetonitrilo al 5% y ácido fórmico al 0,1%). Centrifugamos 4 min a 3100 rpm Este proceso lo repetimos dos veces más. Tras el equilibrado de la columna añadimos la solución con la muestra y pasamos a recolectar el líquido eluido con 100 µl de solución B. Este proceso lo repetimos tres veces.

Obtención de espectros

Los espectros se han obtenido en un espectrómetro de masas Q-TRAP LC/MS/MS (Applied Biosystems, USA). Fuente de iones Flow Nanospray. con nanoHPLC (Sistema LC-Packings UltiMate Integrated System), Autosampler (Famos Carousel) y Software: Analyst®v. 1.4 (Applied Biosystems).

Los disolventes utilizados para el sistema nanoHPLC acoplado al espectrómetro de masas han sido: Solución A (Acetonitrilo al 95% y ácido fórmico al 0,1%) y Solución B (Acetonitrilo al 5% y ácido fórmico al 0,1 %) con un gradiente lineal.

El espectrómetro de masas se ha utilizado en el modo Basic LCMS. Hemos usado un calibrador interno: [GluI]-Fibrino péptido B (humano) (GluIib) y como estándar citocromo C. La intensidad de iones ha sido  $>10^7$  y con un voltaje de 1600 vol. y "courtain gas" de 10 a 20 unidades. La inyección ha sido de 1  $\mu$ l y el flujo se ha mantenido a 0,20  $\mu$ l/min. Se usó una nano columna PepMap™100 C18, 3 $\mu$ m,100A de 15cm de largo (LC-Packings, USA). Cada espectro se obtiene a partir de la acumulación de los resultados obtenidos de unos 100 espectros. La calibración se ha realizado utilizando, como estándar interno, un péptido, perfectamente conocido, GluIib. (785,9 Da) y Citocromo C (12384 Da) como control. Los datos se procesarán mediante el programa informático Analyst® v1.4 proporcionado por el fabricante del espectrómetro.

**Análisis de los espectros mediante ayudas bioinformáticas.**

La identificación de las proteínas a partir del espectro de los péptidos trípticos se ha llevado acabo, fundamentalmente, con el programa Mascot Software (Matrix Science Ltd.) complementado con las ayudas bioinformáticas ProFound y PeptideSearch.

Una vez que se ha encontrado una proteína, los datos experimentales se han comparado con los péptidos obtenidos en la digestión "*in silicon*" de la secuencia de dicha proteína. Si no se encuentra se desechan estos resultados.

**6.3.3. Análisis de las bandas oxidadas**

Los geles y las membranas se han analizado con un densitómetro GS-800 (Bio-Rad). Los pesos moleculares aproximados de las proteínas oxidadas se han determinado a partir de la movilidad electroforética ( $M_{\text{electrof}}$ ):  $\log PM \rightarrow M_{\text{electrof}}$ .

Una vez identificada la banda oxidadada, en el gel de azul de Coomassie, ésta corta y se procede a su digestión *in gel* como se ha descrito en el apartado anterior, y a la preparación de los péptidos trípticos para la inyección en el espectrómetro de masas, previo tratamiento con columnas Spincolumn™ para quitar las sales. La inyección en el sistema nLC-MS/MS se ha realizado utilizando un sistema de nanoHPLC equipado con una

nanocolumna Columna C18 PepMap™100 3µm,100Å (LC-Packings, USA) acoplado a una fuente de electrospray. El procedimiento posterior es semejante al descrito más arriba.

## **7. TECNICAS INMUNOLOGICAS**

### **7.1. Generación de anticuerpos**

Con el fin de poder detectar específicamente la presencia de la enzima GAP y semi-cuantificar la cantidad de proteína que se corresponde con esta enzima, se ha procedido a la obtención de anticuerpos específicos contra esta proteína.

#### **7.1.1. Selección de un péptido inmunogénico**

El conocimiento de la secuencia aminoacídica de la enzima GAP, obtenida de la base de datos de Swiss-Prot (servidor <http://us.expasy.org/sprot/>), nos permite la selección y síntesis de péptidos específicos de la enzima. Esto se ha realizado mediante el uso del programa informático ANTHEPROT (ANalyse THE PROTEins) (<http://antheprot-pbil.ibcp.fr/>), el cual nos permite comparar las secuencias y seleccionar el péptido más antigénico y específico.

Para la elección de un péptido debemos tener en cuenta los siguientes criterios (Niman y col., 1983):

- La secuencia debe ser específica de la proteína
- La secuencia elegida debe estar accesible al medio

## Materiales y Métodos

---

-El péptido debe ser antigénico, es decir, debe provocar una respuesta inmunitaria. Esto a priori no lo podemos saber, pero como norma general:

-Una secuencia hidrofílica es más antigénica que una hidrofóbica, probablemente por problemas de reconocimiento por linfocitos B.

-Los péptidos de masa molecular menor a 10 kDa deben ser acoplados a una proteína (*carrier*), ya que pueden carecer de algún sitio de unión que sea necesario para la producción de anticuerpos.

-Los epítomos deben estar accesibles al medio para ser reconocidos. Parece ser que aquellas regiones de una proteína sin estructura definida son buenos inmunógenos. Se piensa que el aumento de la movilidad de la región incrementa su antigenicidad.

### Secuencia empleada para el diseño de anticuerpos específicos contra de GAP:

MMRLRGSGMLRDLLLRSPAGVSATLRRQPLVTLRPRGGG  
RPAAGPAAAARLHPWWGGGGWPAEPLARGLSSSPSEILQELGK  
GSTHPQPGVSPPAAPAAPGPKDGPGETDAFGNSEGKELVASGE  
NKIKQGLLPSLEDLLFYTIAEGQEKIPVHKFITALKSTGLRTSDPR  
LKECMDMLRLTLQTTSDGVMLDKDLFKKCVQSNIVLLTQAFRR  
KFVIPDFMSFTSHIDELYESAKKQSGGKVADYIPQLAKFSPDLW  
GVSVCTVDGQRHSTGDTKVPFCLQSCVKPLKYAIAVNDLGTEY  
VHRYVGKEPSGLRFNKLFLNEDDKPHNPMVNAGAIVVTSLIKQ  
GVNNAEKFDYVMQFLNKMAGNEYVGFSNATFQSERESGDRNF

AIGYYLKEKKCFPEGTDMVGILDFYFQLCSIEVTCESASVMAAT  
LANGGFCPITGERVLSPEAVRNTLSLMHSCGMYDFSGQFAFHV  
GLPAKSGVAGGILLVVPNVMGMMCWSPPLDKMGNSVKGIHFC  
HDLVSLCNFHNVDNLRHFACKLDPRREGGDQRVKSVINLLFAA  
YTGDVSAARRFALSAMDMEQRDYDSRTALHVAAAEGHVEVV  
KFLLEACKVNPFPKDRWNNTPMDEALHFGHHDVFKILQEYQV  
QYTPQGSDNGKENQTVHKNLDGLL

### **7.1.2. Síntesis del péptido**

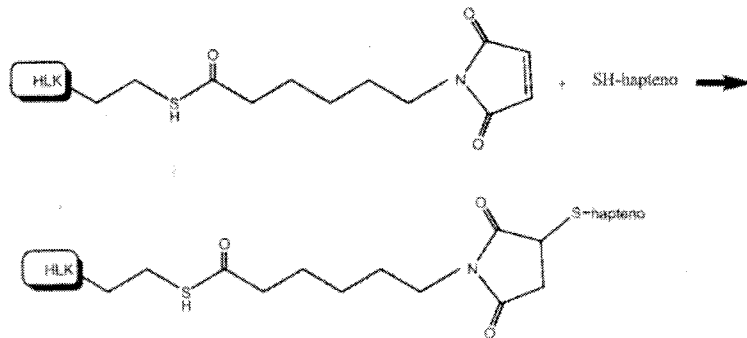
El péptido fue sintetizado por Neosystem Laboratoire (Francia), con una cisteína adicional en el extremo amino para su acoplamiento con el *carrier*. La pureza del péptido fue analizada por HPLC en los laboratorios Neosystem y por nuestro laboratorio por espectrometría de masas (MALDI-TOFF).

### **7.1.3. Acoplamiento del péptido a KLH.**

Los péptidos, debido a su pequeño tamaño, no son antigénicos, por lo que suele ser necesario su unión a una proteína transportadora (*carrier*). Entre las más utilizadas figuran la hemocianina de lapa (Liu y col., 2004) (Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH, Boehringer Mannheim), seroalbúmina bovina y ovoalbúmina. Seleccionamos la KLH que presenta varias ventajas con respecto a las otras dos, como son su alto peso molecular, 450 kD, y su origen no mamífero, que la convierten en altamente antigénica.

La KLH usada es reactiva a grupos sulfhidrilos (SH) debido a su activación con el reactivo heterobifuncional *m*-

maleimidobenzoil-*N*-hidrosuccinimida, con lo que, para acoplarla al péptido, es necesario que éste tenga un grupo SH y por ello el péptido se sintetizó con una cisteína en su extremo amino (no en su extremo carboxilo porque en este caso éste es el extremo antigénico que debe quedar en contacto con el medio). Los grupos SH de la cisteína reaccionan con el complejo KLH-maleimidato formando un enlace tioeter según el esquema mostrado en la **Figura-M15**.



**Figura-M15.** Esquema del acoplamiento entre el péptido y la KLH. La reacción se ve favorecida a pH 7

Para acoplar el péptido a la KLH activada lo resuspendemos en agua destilada y de este cogemos 10 mg, que lo llevamos a un volumen de 1.5 ml con tampón fosfato monopotásico 0.1 M, pH 7. El péptido restante lo conservamos a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y lo utilizamos para la síntesis de columnas de péptidos para la purificación del anticuerpo en cuestión. Estos 10 mg de péptido lo mezclamos con 10 mg de KLH activada, disuelta en 1 ml de agua destilada, y la reacción la dejamos 3 horas a temperatura ambiente, El péptido acoplado a la KLH lo



alicuteamos y almacenamos a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El rendimiento se encontró entre un 95-100%. Una vez conocido el rendimiento de la reacción se realizan alícuotas de 200  $\mu\text{g}$ , que se congelan a  $-80^{\circ}$  hasta su uso.

#### **7.1.4. Inmunización en conejos**

En la obtención de anticuerpos policlonales se usaron dos conejos machos recién destetados (New Zealand White), mantenidos en instalaciones propias de la Universidad de Sevilla (Espartinas). Tras un período de aclimatización de 20 días en el animalario, se obtiene un suero preinmune de unos 5 ml y se procede a la inmunización con 200  $\mu\text{g}$  de péptido, unido a KLH, emulsionado con un adyuvante completo de Freund (1:2, v/v). La inmunización se realiza, mediante inyecciones subcutáneas a lo largo de la columna vertebral con cinco inyecciones a cada lado. Es muy importante no inocular todo el volumen en una única inyección ya que puede producir granulomas en el animal.

Tras veinte días de la primera inmunización, se inyecta nuevamente la misma cantidad de péptido emulsionada en coadyuvante incompleto de Freund (1:1, v/v). El primer suero se obtiene a los 10 días después de la segunda inmunización y, posteriormente, diez días después de cada inmunización. De cada conejo inmunizado se obtuvo un volumen final entre 70-100 ml de suero.

### **7.1.5. Purificación de los anticuerpos:**

A partir del suero, por precipitación con sulfato amónico al 40%, se ha obtenido una fracción enriquecida en inmunoglobulinas que contiene los anticuerpos contra la GAP. La presencia de dichos anticuerpos se confirma mediante un Dot-blot utilizando los péptidos sintetizados como antígenos.

### **7.2. Titulación del anticuerpo: Análisis por DOT-BLOT**

Para determinar la positividad y especificidad de los anticuerpos y la sensibilidad de estos a diferentes concentraciones del péptido se ha procedido a la titulación de los mismos por Dot-blot.

#### Inmovilización del péptido a la nitrocelulosa

Cortar varias tiras de nitrocelulosa y depositarla sobre un papel de filtro. Señalar cuatro círculos y añadir en cada uno de los círculos distintas concentraciones del péptido antígeno específico de la isoforma GAP de intestino, (1µg, 0,1µg, 0,01µg) y en uno de ellos ponemos un antígeno distinto como control negativo. Dejar secar.

#### Incubación con el anticuerpo

Colocar el anticuerpo utilizando una dilución 1:1000 en cada círculo. Se deja en incubación durante toda la noche a 4°C. Todas las diluciones del anticuerpo se realizan en TPBS con un 2% de leche desnatada, junto con un 1% de suero preinmune de conejo, con el objetivo de bloquear los posibles sitios no

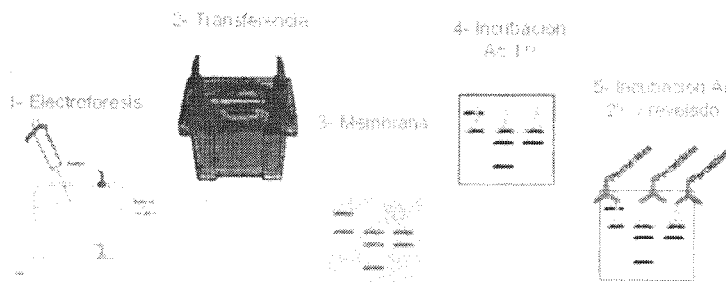
específicos de la membrana de nitrocelulosa. Lavamos 4 veces 5 minutos con TPBS Incubamos durante 2-3 h a temperatura ambiente en agitación.

### Lavado

Transferir las tiras a un vaso de precipitado con 50 ml de PBS-Tween 20. Incubar 5 minutos. Descartar el medio y repetir el proceso. Para la detección del complejo antígeno-anticuerpo se realiza el revelado con Diaminobencidina (DAB) que se describe posteriormente.

### **7.3. Inmunodetección de proteínas: Western Blot (Inmunoblot)**

En la **Figura-M16** se muestran, esquemáticamente, los principales pasos a seguir para la inmunodetección de proteínas:



**Figura-M16.** Representación esquemática del Western Blot

Se han utilizado enterocitos de ratas control, ratas con anastomosis porto-cava (modelo de encefalopatía hepática), así como ratas sometidas a las mismas condiciones de la intervención quirúrgica pero en las que no se realiza la anastomosis (*Sham*). La preparación de las muestras de enterocitos de ratas y la purificación y aislamiento de las mitocondrias se lleva a cabo tal como se ha descrito previamente.

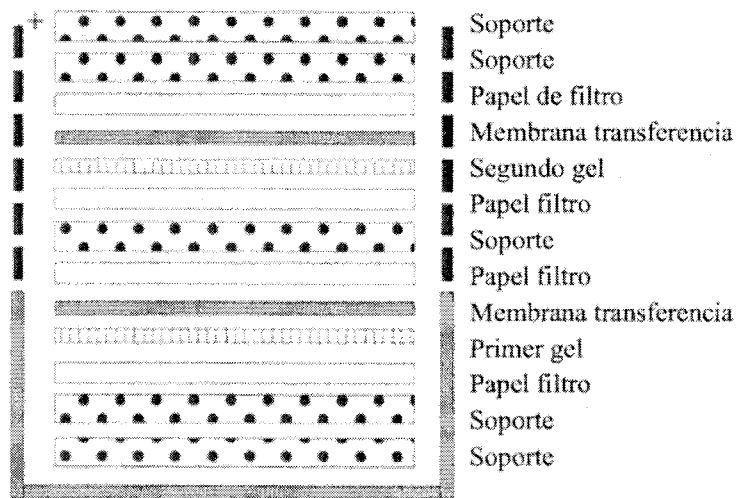
Después de la electroforesis de la muestra en geles de poliarilamida-SDS, procedemos a la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Hybond-C extra, Amersham®-Pharmacia), según el método de Towbin (**Towbin J. y col, 1979**). En la **Figura-M17** se muestran el orden de colocación del gel y de la nitrocelulosa. Posteriormente, para comprobar la calidad de la transferencia y localizar los carriles donde se ha transferido la proteína, teñimos la membrana con rojo Ponceau S (Sigma, P-3504), ya que esta solución nos permite teñir temporalmente las proteínas transferidas y luego se elimina fácilmente con 3 lavados en TPBS (NaCl 140 mM,  $\text{HPO}_4\text{Na}_2$  10 mM y Tween 0.1% (p/v), pH 7.4). La superficie de membrana no ocupada por proteínas se bloquea con leche desnatada (BioRad) para evitar la unión no específica de los anticuerpos. Dejamos el bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente, en leche al 5% (p/v) en TPBS.

La incubación de la membrana con el anticuerpo primario se mantiene toda la noche a 4°C. La dilución del anticuerpo (suero, purificado o anticuerpo comercial) varía en cada caso (para detección de grupos carbonilo o para la detección de la glutaminasa) y se realiza en leche al 2% en TPBS.

A continuación, después de incubar la membrana con el anticuerpo primario, le damos 3 lavados de 5 minutos cada uno en TPBS e incubamos con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente.

Realizamos la detección de la actividad de la enzima peroxidasa con dos métodos:

- *Método quimioluminiscente.* Usamos el reactivo ECL + Plus Amersham®-Pharmacia, (referencia RPN 2132) y la luminiscencia se detecta mediante la impresión de películas Kodak X-OMAT. Las imágenes obtenidas se digitalizan mediante un densitómetro calibrado GS-800 y el programa Quantity One (BIORAD).



**Figura M17.** Esquema de orden de preparación de Western-Blot. Transferimos durante 2.5 horas a 300 mA y a una temperatura de 4°C.

- *Método de revelado con diaminobencidina.* La enzima peroxidasa, con la que están marcados los anticuerpos secundarios, en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), cataliza la polimerización oxidativa de la diaminobenzidina (DAB) y da lugar a un producto final insoluble que origina un precipitado marrón. Se puede intensificar la reacción añadiendo iones de Cobalto o de Níquel, que provocan un cambio de color del precipitado de marrón a gris-negro. La reacción es muy rápida y es fácil que se desarrolle en exceso provocando un elevado "background" (ruido de fondo) en el filtro. La DAB es una molécula de acción carcinogénica y es necesario tomar precauciones para su manipulación.

Se preincuba la membrana a temperatura ambiente en el tampón de preincubación (se añade lentamente, con agitación

suave, 3 ml de una solución al 1% de níquel y 1% de cobalto sobre 100 ml de la solución de DAB en fosfato 50mM, pH 7,5) durante 5 minutos. Desarrollamos la reacción enzimática con el tampón de incubación ( $H_2O_2$  al 30%) hasta que se aprecien las bandas de GAP o los grupos carbonilo por precipitación del polímero de DAB oxidada. Este procedimiento hay que llevarlo a cabo en campana de flujo laminar evitando aspirar la DAB (cancerígena). Lavar varias veces los filtros con tampón buffer fosfato. Lavar con agua destilada y si queremos que el marcaje sea visible durante mucho tiempo tendremos que fijar los filtros con tetraóxido de Osmio (0,1%  $OsO_4$  en  $H_2O$ ).

Se revelaron todas las membranas preferentemente con diaminobencidina y sólo se utilizó el revelado por quimioluminiscencia cuando se hizo necesario por la falta de sensibilidad.

#### **7.4. Determinación de la oxidación proteica por la cuantificación de grupos carbonilo**

Los grupos carbonilos de las proteínas se han cuantificados mediante reacción con el 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) según el protocolo de Levine (**Levine y col., 1994**).

El perfil de proteínas oxidadas (carbonizadas) se ha realizado según el método de inmunoensayo (**Levine y col., 1994; Bautista y col., 1998**). Alícuotas de las muestras anteriormente preparadas se han disuelto en SDS al 24% (p/v) y

## ***Materiales y Métodos***

---

mezclado con un volumen igual de solución de DNPH, para que reaccionen los grupos carbonilos, incubándose a temperatura ambiente. La solución se ha neutralizado y preparado para cargar tratándolas con SDS al 1%, Tris/HCl 2M, glicerol al 30% (v/v) y  $\beta$ - mercaptoetanol al 15%. Las muestras se han separado por electroforesis en geles de PAGE-SDS al 12% y posteriormente se han transferido las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.

Tras la transferencia se tiñe con 1ml de Rojo Ponceau para comprobar que se han transferido. Posteriormente se destiñe por sucesivos lavados.

Las membranas se han incubado con un anticuerpo anti-DNPH de ratón en una dilución de 1:100 durante toda la noche a 4°C. Después de un lavado amplio, las membranas se han incubado con un segundo anticuerpos anti-ratón obtenido en conejo, conjugado con peroxidasa (Boehringer Mannheim) en una dilución de 1:8000 durante dos horas y se lavó con tampón saturado. La oxidación de las proteínas se ha detectado por su revelado con diaminobencidina o por revelado con quimioluminiscencia (Kit de Boehringer Mannheim) si se necesitó más sensibilidad.



## **8. EQUIPOS UTILIZADOS**

Espectrofotómetro: Espectrofotómetro UV/Visible Ultrospec 2100 Pro (Amersham Biosciences).

pHmetro: Crison MicropH-2000 (Crison Instruments S.A., Barcelona) de electrodo combinado.

Bloque de calentamiento: Reacti-Therm™ Heating Module (PIERCE).

Cromatógrafos:

i) Sistema de HPLC (Waters, Milford, MA, USA), constituido por un detector de U.V. W 2487, un detector de fluorescencia Waters™ 474, un sistema de bombas "multisolvente" Waters™ 600 Pump controlado por el programa Millennium<sup>32</sup> y Empower.

ii) Sistema LC-Packings UltiMate Integrated System acoplado a detector de masas. Sistema Q-TRAP LC/MS/MS (Applied Biosystems, USA).

Electroforesis: Sistema de electroforesis Miniprotean-2 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), XCell SureLock (Invitrogen) para la realización de electroforesis y para western.

Los equipos y materiales utilizados en la tinción de los geles: Shaker (3016) (Gesellschaft für Labor mbH) Plastic troughs (bottom 30\*40 cm) (Brukle-Labo-Plast) Drying/vacuum incubator (type UL-60) (Mettler) water-saving vacuum pump (type TOM JET 1/A4) (Genser Wissenschaftliche Apparate)

## Materiales y Métodos

---

water-jet vacuum pump (Th. Séller) Cellophane (Gehring & Neidweiser GmbH & Co).

Liofilizador: Telstar modelo Cryodos (Telstar, España).

Medida de Actividad Enzimática: Detector de Microplaca Modelo 680 (BIORAD)

Espectrometría de masas:

Preparación de muestras: skin-biopsy punch (various diameters) (Stiefel). Centrifuga de vacío (Speedvac) (PLCT 60-E) (Heraeus), Incubador (PersonalHyb) (Stratagene), Agitador (AVM) (E<sup>TS</sup> Jean Robin).

Sistema Q-TRAP LC/MS/MS. Fuente de iones Flow Nanospray. nanoHPLC con Autosampler (Famos Carousel). Columna C18 PepMap™100 3µm,100Å (LC-Packings, USA). Software: Analyst® v 1.4.

Sistema MADI-TOF (TOFSPEC, Micromass)

## **9. PROCEDENCIA DE COMPUESTOS QUÍMICOS Y BIOQUÍMICOS**

Todos los reactivos y materiales utilizados han sido de calidad analítica, de las siguientes empresas: Sigma-Aldrich,

Bio-Rad, Amersaham-Biosciences, Invitrogen, Dako-Cytomation, Waters, Eppendorf, Beckam.

Detalles específicos sobre cada uno de ellos se han indicado en el correspondiente apartado.

## **10. ANALISIS ESTADISTICO**

Se ha usado el test exacto de Fisher o test de Chi-cuadrado para comparar variables cualitativas.

Las comparaciones entre actividad glutaminasa y contenido proteico, así como las demás variables cuantitativas, se han realizado mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman. La importancia de la asociación entre variables cuantitativas se valoró mediante la significación estadística y la observación de la distribución de puntos en la gráfica. Para el análisis de la influencia de variables dicotómicas como DPC: si o no; o tratamiento: sí o no, con variables cuantitativas se realizó un test de U-Mann-Whitney o test de t-student según la distribución normal de las variables valorado por el test de Kolgomoro-Smirnov. Las variables analizadas en diferentes momentos en todos los animales, como el peso, se analizó utilizando la t-student para datos pareados. Para el análisis multivariante utilizamos una regresión logística hacia atrás (Backward LR).

## ***Materiales y Métodos***

---

Los valores de probabilidad ( $p$ ) que se han considerado con significación estadística para todos los test aplicados ha sido  $p \leq 0,05$ .

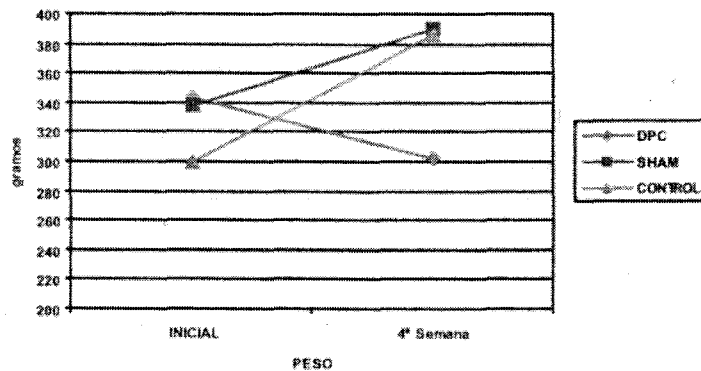
Los datos se han presentado como el valor de la media  $\pm$  la desviación estándar.

Para el análisis estadístico y la generación de las gráficas se ha empleado el programa SPSS 8.0 y SPSS 14.0 (spss, Chicago, IL) y Excel para Windows (Microsoft).

## **IV. RESULTADOS**

## 1. INFLUENCIA DE LA DERIVACION PORTO-CAVA SOBRE EL PESO

En la **Figura-R1** se muestran los pesos de los animales usados en nuestro estudio. Los animales (ratas controles, sin operar y operadas o *sham*, y ratas con DPC) se han pesado al inicio del estudio, así como a las cuatro semanas. Como se puede observar, en ratas control sin operar el peso al inicio del estudio fue de  $300,2 \pm 63,8$  g y  $386,9 \pm 46,3$  g al finalizar el mismo; en las ratas control operadas o *sham*, el peso antes de la intervención fue de  $338,2 \pm 70,2$  g y al final del estudio pesaron  $389,9 \pm 48,1$  g, mientras que en los animales con DPC el peso antes de la operación fue de  $343,3 \pm 67,5$  g y de  $303,3 \pm 42,0$  g al finalizar el estudio.

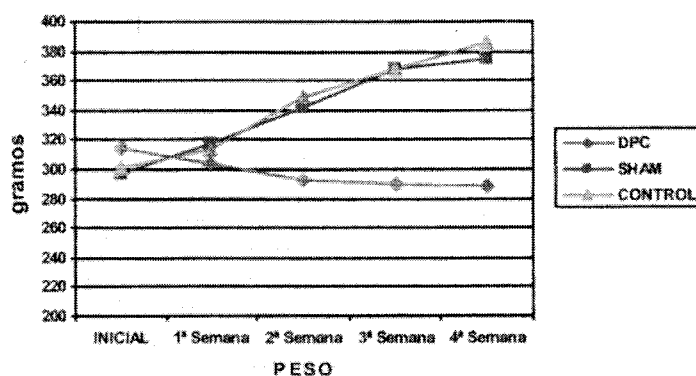


**Figura-R1. Peso de los animales en gramos, al iniciar y al finalizar el estudio.** En ratas control sin operar, ratas control operadas o *sham*, y ratas con DPC.

En la **Figura-R2** se muestran las variaciones de pesos de 24 animales (8 animales por grupo) semana a semana. En este caso, los resultados han sido: **a)** Animales control sin operar:

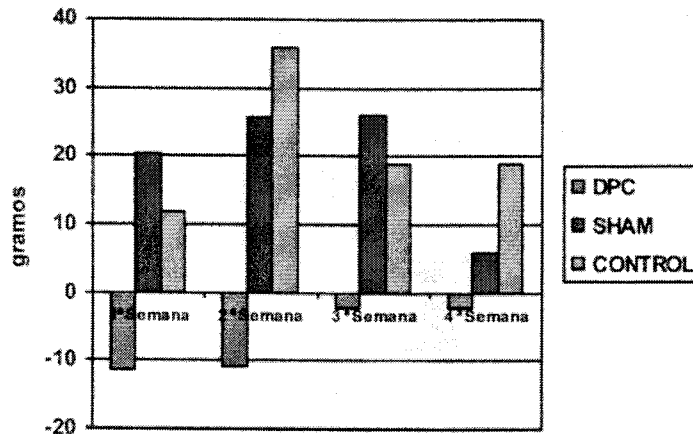
## Resultados

301,6±67,6 g al inicio del estudio, 313,4±72,8 g a la semana desde el comienzo del estudio, 349,2±58,7 g a las 2 semanas, 368,1±56,5 g a las tres semanas y 387,0±54,2 g tras la finalización del estudio. **b) Animales control operados o sham:** 297,1±52,9 g al inicio del estudio, 317,4±47,9 g a la semana de la intervención, 343,0±44,6 g a las 2 semanas, 369,0±53,5 g a las tres semanas y 374,8±42,0 g tras la finalización del estudio. **c) Animales con DPC:** 315,1±64,1 g al inicio del estudio, 303,7±54,4 g a la semana de la intervención, 293,1±51,1 g a las 2 semanas, 291,0±49,7 g a las tres semanas y 288,7±49,00 g tras la finalización del estudio.



**Figura-R2. Variación ponderal semana a semana en los tres grupos de estudio.** Valores de los pesos expresados en gramos.

En la **Figura-R3** se muestra el incremento del peso del animal (>0) o la pérdida de peso (<0) en los tres grupos, semana a semana, para un total de 24 ratas (8 animales por grupo).



**Figura-R3. Diferencia de peso en ratas control sin operar y operadas o *sham* y ratas con DPC, semana a semana. (La diferencia está expresada en gramos).**

En la **Figura-R4** se muestra el incremento (>0) o la pérdida de peso (<0) total, tras la cuatro semanas de estudio (diferencias entre el peso al inicio y al final del estudio), para los tres grupos y un total de 24 animales.

Estos resultados ponen claramente de manifiesto que mientras los animales controles sin operar y operados o *sham* muestran un incremento uniforme de peso, en el caso de los animales con DPC lo que se observa es una disminución uniforme del peso, si bien tras la segunda semana esta pérdida tiende a estabilizarse, manteniendo los animales su peso.



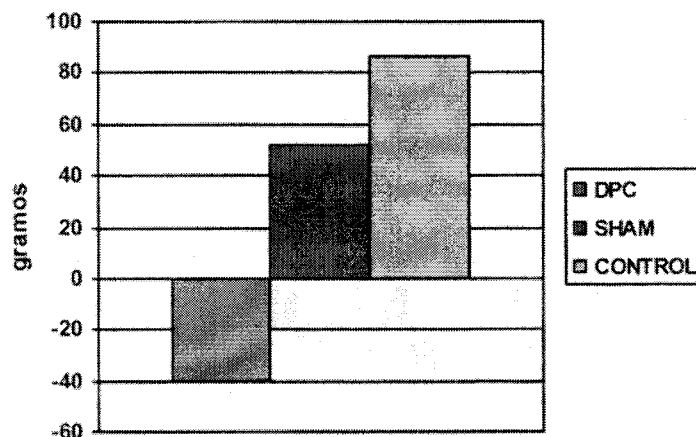


Figura-R4. Diferencia de peso total en ratas controles sin operar y operadas o *sham* y ratas con DPC. (La diferencia está expresada en gramos).

## 2. INFLUENCIA DE LA DERIVACION PORTO-CAVA EN LA PRODUCCION DE AMONIO

El amonio, como principal agente causante de la encefalopatía hepática, se ha medido tanto en sangre como en diferentes tejidos: intestino, riñón, músculo y cerebro.

### 2.1. Medida de amonio en sangre.

Como un control positivo, de que las ratas estudiadas están en una situación de encefalopatía hepática, se ha medido el nivel de amonio en sangre. La determinación de amonio se ha llevado a cabo tal y como se describe en el apartado 5.1 de Materiales y Métodos.

Los niveles de amonio se han medido en suero, obtenido con EDTA, en plasma y en suero desproteinizado por precipitación con TCA al 10%. En las **Tablas-R1, -R2 y -R3** se muestran los resultados obtenidos para la medida de estos niveles en 9 ratas control sin operar, 8 ratas control operadas o *sham* y 10 ratas con DPC.

| <b>Niveles de amonio en µg/dl</b> |                   |                   |                   |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Animal</b>                     | <b>Suero</b>      | <b>Plasma</b>     | <b>TCA 10%</b>    |
| C0                                | n.d.              | 83,0              | 78,7              |
| C1                                | 245,0             | 199,2             | 176,0             |
| C2                                | 227,1             | 173,5             | 158,2             |
| C3                                | 119,0             | 100,1             | 90,3              |
| C4                                | 219,4             | 190,3             | 148,3             |
| C5                                | 186,0             | 109,8             | 66,0              |
| C6                                | 151,2             | 111,2             | 62,3              |
| C7                                | 189,2             | 116,1             | 102,1             |
| C8                                | 257,0             | 108,1             | 110,0             |
| <b>Valor medio</b>                | <b>199,1±44,2</b> | <b>132,4±40,6</b> | <b>110,2±39,1</b> |

**Tabla-R1.** Niveles de amonio en sangre de ratas controles sin operar.

| <b>Niveles de amonio en µg/dl</b> |                   |                   |                   |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Animal</b>                     | <b>Suero</b>      | <b>Plasma</b>     | <b>TCA 10%</b>    |
| S1                                | 187,2             | 157,5             | 138,3             |
| S2                                | 277,1             | 183,0             | 148,0             |
| S3                                | n.d.              | 104,1             | 86,4              |
| S4                                | 178,0             | 138,4             | 110,0             |
| S5                                | 223,1             | 164,9             | 134,2             |
| S6                                | 216,3             | 162,2             | 128,9             |
| S7                                | 170,5             | 120,3             | 82,7              |
| S8                                | 180,2             | 124,1             | 102,3             |
| <b>Valor medio</b>                | <b>204,6±34,8</b> | <b>144,3±25,1</b> | <b>116,3±23,0</b> |

**Tabla-R2.** Niveles de amonio en sangre de ratas operadas, *sham*.

## Resultados

| Niveles de amonio en $\mu\text{g/dl}$ |                                   |                                   |                                  |
|---------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Animal                                | Suero                             | Plasma                            | TCA 10%                          |
| A1                                    | 850,1                             | 573,2                             | 460,9                            |
| A3                                    | 776,7                             | 480,9                             | 306,1                            |
| A5                                    | 814,1                             | 635,4                             | 520,5                            |
| A7                                    | 544,3                             | 407,3                             | 402,1                            |
| A9                                    | 397,5                             | 262,9                             | 240,1                            |
| A12                                   | 489,5                             | 301,2                             | 280,3                            |
| A14                                   | 453,0                             | 322,0                             | 304,4                            |
| A16                                   | 798,2                             | 560,2                             | 486,8                            |
| A17                                   | 787,1                             | 546,0                             | 440,3                            |
| A18                                   | 791,4                             | 608,2                             | 487,0                            |
| Valor medio                           | <b>670,2<math>\pm</math>167,1</b> | <b>469,6<math>\pm</math>130,0</b> | <b>392,8<math>\pm</math>96,1</b> |

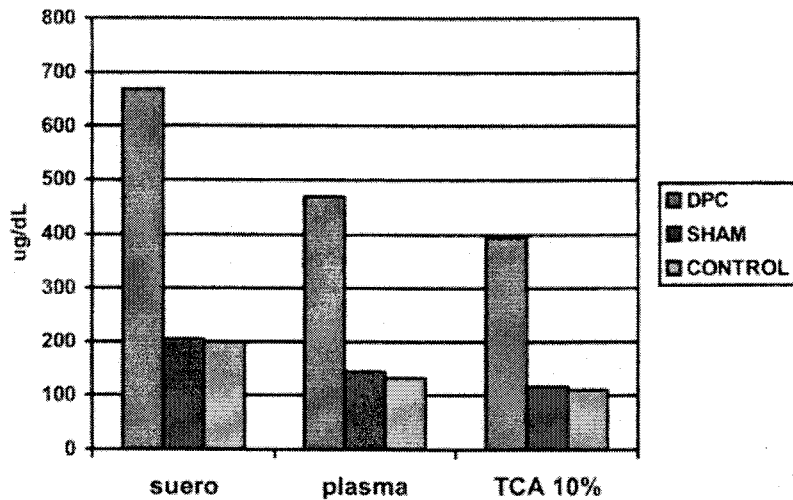
**Tabla-R3.** Niveles de amonio en sangre de ratas con DPC.

Los valores obtenidos en **suero** han sido: 199,1 $\pm$ 44,6  $\mu\text{g/dl}$  en el grupo de los controles no operados, 204,6 $\pm$ 34,8  $\mu\text{g/dl}$  en el grupo de las ratas controles operadas o *sham* y de 670,2 $\pm$ 167,1  $\mu\text{g/dl}$  en el grupo de ratas con DPC.

Los valores obtenidos en **plasma** han sido: 132,4 $\pm$ 40,6  $\mu\text{g/dl}$  en el grupo de controles no operados, 144,3 $\pm$ 25,1  $\mu\text{g/dl}$  en el grupo de las ratas controles operadas o *sham*, y de 469,6 $\pm$ 130,0  $\mu\text{g/dl}$  en el grupo de las ratas con DPC.

Los valores obtenidos en **sangre desproteïnizada con TCA al 10%** han sido: 110,2 $\pm$ 39,1  $\mu\text{g/dl}$  en el grupo de controles no operados, 116,3 $\pm$ 23,2  $\mu\text{g/dl}$  en el grupo de las ratas controles operadas o *sham* y 393,8 $\pm$ 96,1  $\mu\text{g/dl}$  en el grupo de ratas con DPC.

Los valores medios  $\pm$  DE de las diferentes concentraciones de amonio en sangre, determinado mediante los tres métodos indicados, se muestran en la **Figura-R5**.



**Figura-R5. Niveles de amonio en sangre.** Medidas realizadas en suero con EDTA, plasma y suero desproteinizado con TCA al 10%.

Como puede observarse, independientemente del método utilizado, las diferencias entre los valores obtenidos para ratas controles (controles no operados y operados o *sham*) y ratas con DPC son estadísticamente significativos, con un valor de  $p \leq 0.001$ , en ambos casos. Sin embargo, no existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores obtenidos para las ratas controles operadas o *sham* y las controles no operadas, lo que nos está indicando que la hiperamonemia es debido a la DPC (ratas con EH).

A partir de estos resultados, también, se puede observar que los tres métodos se correlacionaban estadísticamente mediante un análisis bivariados (Correlación de Pearson).

## **2.2. Medida de amonio en tejidos.**

Los niveles de amonio también se han medido en diferentes tejidos: intestino, riñón, hígado, músculo y cerebro.

En las **Tablas -R4, -R5, y -R6** se muestran los resultados obtenidos al medir los niveles de amonio en hígado, músculo, cerebro, riñón e intestino, en ratas controles sin operar y operadas o *sham* y ratas con DPC, respectivamente.

En la **Tabla-R7** se muestran de manera resumida los resultados anteriormente expuestos. Como puede observarse, prácticamente en todos los tejidos estudiados, salvo en el músculo, la concentración de amonio está más elevada en los animales con DPC que en los grupos controles (ratas sin operar y ratas operadas o *sham*).

En el **hígado** los niveles de amonio en ratas con DPC son de  $3,02 \pm 0,38$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido, frente a los  $2,02 \pm 0,30$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido y  $2,14 \pm 0,30$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido observados tanto en ratas sin operar como en ratas operadas o *sham*, lo cual podría interpretarse como una acumulación de este metabolito en este tejido debido a su mal funcionamiento.

| Amonio en $\mu\text{mol/g}$ de tejido |                 |                 |                 |                  |                 |                 |                 |                 |                 |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Animal                                | Higado          | Músculo         | Córtex          | Ganglios basales | Cerebelo        | Médula Renal    | Corteza Renal   | Ileon           | Duodeno         |
| S1                                    | 2,03            | 1,79            | 0,76            | 0,54             | 0,62            | 4,96            | 2,83            | 2,25            | 1,73            |
| S2                                    | 2,74            | 1,93            | 0,61            | 0,39             | 0,29            | 4,12            | 3,40            | 1,53            | 1,35            |
| S3                                    | 1,91            | 0,95            | 0,51            | 0,67             | 0,37            | 4,73            | 3,91            | 2,34            | 2,42            |
| S4                                    | 2,19            | 1,73            | 0,37            | 0,65             | 0,40            | 3,59            | 4,31            | 1,61            | 1,90            |
| S5                                    | 2,25            | 2,55            | 0,62            | 0,45             | 0,39            | 4,09            | 3,90            | 2,24            | 2,14            |
| S6                                    | 2,35            | 1,47            | 0,47            | 0,57             | 0,40            | 3,99            | 4,18            | 1,51            | 1,97            |
| S7                                    | 1,77            | 2,67            | 0,43            | 0,43             | 0,24            | 4,63            | 4,87            | 1,62            | 2,27            |
| S8                                    | 1,85            | 1,41            | 0,65            | 0,46             | 0,42            | 3,98            | 3,85            | 1,56            | 1,49            |
| Valor medio                           | 2,14 $\pm$ 0,30 | 1,81 $\pm$ 0,54 | 0,55 $\pm$ 0,12 | 0,52 $\pm$ 0,10  | 0,39 $\pm$ 0,10 | 4,26 $\pm$ 0,43 | 3,91 $\pm$ 0,57 | 1,83 $\pm$ 0,35 | 1,91 $\pm$ 0,35 |

**Tabla-R5.** Niveles de amonio en  $\mu\text{mol/g}$  de tejido en ratas controles operadas o *sham*.

| Amonio en $\mu\text{mol/g}$ de tejido |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |
|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Animal                                | Hígado                          | Músculo                         | Córtex                          | Ganglios basales                | Cerebelo                        | Médula Renal                    | Corteza Renal                   | Ileon                           | Duodeno                         |
| A1                                    | n.d.                            | 3,01                            | 1,77                            | 2,21                            | 2,81                            | 5,90                            | 7,14                            | 2,38                            | 4,26                            |
| A3                                    | 2,77                            | 1,41                            | 1,74                            | 1,34                            | ,99                             | 5,57                            | 7,26                            | 1,26                            | 2,08                            |
| A5                                    | 3,28                            | 1,07                            | 1,95                            | ,37                             | ,31                             | 5,32                            | 6,02                            | 2,23                            | 2,76                            |
| A7                                    | 2,79                            | 2,19                            | 1,47                            | 1,77                            | 1,32                            | 4,80                            | 5,36                            | 2,29                            | 4,58                            |
| A9                                    | 3,69                            | 2,46                            | 1,71                            | ,53                             | ,86                             | 5,01                            | 5,35                            | 1,22                            | 3,31                            |
| A12                                   | 2,58                            | 1,68                            | 2,51                            | 1,18                            | ,85                             | 4,50                            | 4,76                            | 1,16                            | 4,43                            |
| A14                                   | 2,72                            | 1,89                            | 1,76                            | 1,17                            | 1,16                            | 3,65                            | 3,61                            | 2,19                            | 4,15                            |
| A16                                   | 3,34                            | 2,08                            | 2,32                            | 1,52                            | 1,09                            | 5,16                            | 5,49                            | 2,24                            | 3,57                            |
| <b>Valor medio</b>                    | <b>3,02<math>\pm</math>0,38</b> | <b>1,97<math>\pm</math>0,57</b> | <b>1,90<math>\pm</math>0,32</b> | <b>1,26<math>\pm</math>0,57</b> | <b>1,17<math>\pm</math>0,68</b> | <b>4,99<math>\pm</math>0,65</b> | <b>5,62<math>\pm</math>1,12</b> | <b>1,87<math>\pm</math>0,51</b> | <b>3,64<math>\pm</math>0,83</b> |

Tabla-R6. Niveles de amonio en  $\mu\text{mol/g}$  de tejido en ratas con DPC.

| Amonio en $\mu\text{mol/g}$ de tejido |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |
|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Animal                                | Hígado                          | Músculo                         | Córtex                          | Ganglios basales                | Cerebelo                        | Médula Renal                    | Corteza Renal                   | Ileon                           | Duodeno                         |
| C1                                    | n.d.                            | n.d.                            | 0,58                            | 0,47                            | 0,45                            | 4,97                            | 4,06                            | 2,09                            | 2,59                            |
| C2                                    | 2,15                            | 1,87                            | 0,49                            | 0,51                            | 0,31                            | 5,16                            | 3,87                            | 1,31                            | 2,39                            |
| C3                                    | 1,94                            | 0,99                            | 0,57                            | 0,42                            | 0,31                            | 3,02                            | 4,02                            | 1,14                            | 2,13                            |
| C4                                    | 1,46                            | 1,90                            | 0,56                            | 0,59                            | 0,50                            | 3,51                            | 4,18                            | 2,17                            | 1,86                            |
| C5                                    | 2,05                            | 1,93                            | 0,41                            | 0,44                            | 0,44                            | 4,32                            | 4,26                            | 2,11                            | 1,06                            |
| C6                                    | 2,53                            | 1,37                            | 0,57                            | 0,48                            | 0,30                            | 4,99                            | 4,01                            | 1,15                            | 1,73                            |
| C7                                    | 2,16                            | 1,31                            | 0,38                            | 0,42                            | 0,35                            | 3,53                            | 3,34                            | 1,58                            | 1,90                            |
| C8                                    | 1,84                            | 1,75                            | 0,47                            | 0,31                            | 0,26                            | 5,09                            | 3,90                            | 1,47                            | 2,25                            |
| <b>Valor medio</b>                    | <b>2,02<math>\pm</math>0,30</b> | <b>1,59<math>\pm</math>0,33</b> | <b>0,50<math>\pm</math>0,07</b> | <b>0,45<math>\pm</math>0,07</b> | <b>0,36<math>\pm</math>0,08</b> | <b>4,32<math>\pm</math>0,80</b> | <b>3,95<math>\pm</math>0,26</b> | <b>1,63<math>\pm</math>0,41</b> | <b>1,99<math>\pm</math>0,44</b> |

Tabla-R4. Niveles de amonio en  $\mu\text{mol/g}$  de tejido en ratas controles no operadas.



## Resultados

|                 | Control sin operar | Control operado o Sham | Ratas con DPC |
|-----------------|--------------------|------------------------|---------------|
| Hígado          | 2,02±0,30          | 2,14±0,30              | 3,02±0,38     |
| Músculo         | 1,59±0,33          | 1,81±0,54              | 1,97±0,57     |
| Cerebro:        |                    |                        |               |
| Cortex          | 0,50±0,07          | 0,55±0,12              | 1,32±0,32*    |
| Ganglios basal. | 0,45±0,07          | 0,52±0,10              | 1,26±0,57     |
| Cerebelo        | 0,36±0,08          | 0,39±0,10              | 1,17±0,68     |
| Riñón:          |                    |                        |               |
| Médula          | 4,32±0,80          | 4,26±0,43              | 4,99±0,65     |
| Corteza         | 3,95±0,26          | 3,91±0,57              | 5,62±1,12     |
| Intestino:      |                    |                        |               |
| Ileon           | 1,63±0,41          | 1,83±0,35              | 1,87±0,51     |
| Duodeno         | 1,99±0,44          | 1,91±0,35              | 3,64±0,83     |

Tabla-R7. Tabla resumen de los niveles de amonio en diferentes tejidos.

En el **músculo** los niveles de amonio observados en los tres grupos de animales estudiados, controles sin operar y operados o *sham* y animales con DPC son muy parecidos: 1,59±0,33  $\mu$ moles/g de tejido, 1,81±0,54  $\mu$ moles/g de tejido y 1,97±0,57  $\mu$ moles/g de tejido, respectivamente. Valores para los cuales el valor de p no es estadísticamente significativo. Esto podría interpretarse como un indicio de un incremento de la

utilización del amonio a nivel muscular para hacer frente a los altos niveles de amonio plasmático (**Miyazaki y col., 2003**).

En el **cerebro**, con el fin de estudiar la sensibilidad al amonio de este tejido, se ha estudiado la concentración de amonio en tres áreas cerebrales distintas: córtex, ganglios basales y cerebelo.

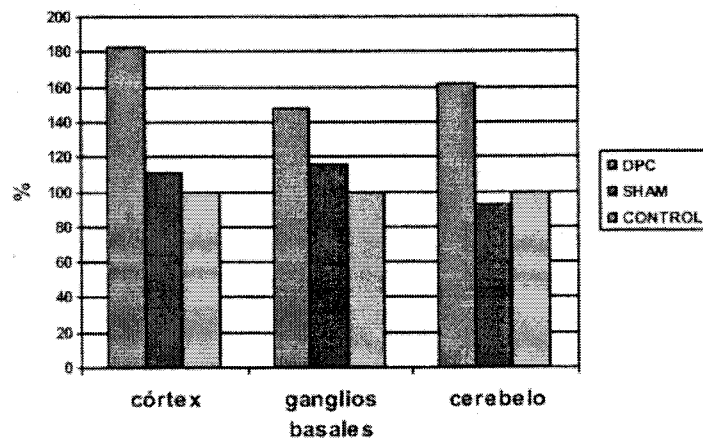
En el **córtex**, los niveles de amonio encontrados han sido:  $1,90 \pm 0,32$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas con DPC *versus*  $1,0 \pm 0,45$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas *sham* y  $0,9 \pm 0,22$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas sin operar. Valores para los cuales el valor de p es estadísticamente significativo ( $p < 0,05$  para las ratas sin operar frente a las ratas con DPC, y  $p < 0,05$  para las ratas *sham* frente a las ratas con DPC).

En los **ganglios basales** los niveles de amonio encontrados han sido:  $1,26 \pm 0,60$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas con DPC *versus*  $0,98 \pm 0,30$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas *sham* y  $0,85 \pm 0,24$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas sin operar. Valores para los cuales el valor de p no es estadísticamente significativo.

En el **cerebelo** los niveles de amonio encontrados han sido:  $1,17 \pm 0,72$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas con DPC *versus*  $0,67 \pm 0,33$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas *sham* y  $0,72 \pm 0,27$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas sin operar. Valores para los cuales el valor de p es estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

En la **Figura-R6** se muestra el incremento de la concentración de amonio expresado en porcentaje (considerando el 100% el valor correspondiente a los controles no operados), para las ratas con DPC frente a las ratas controles operadas o *sham* y controles sin operar, en las diferentes áreas cerebrales.

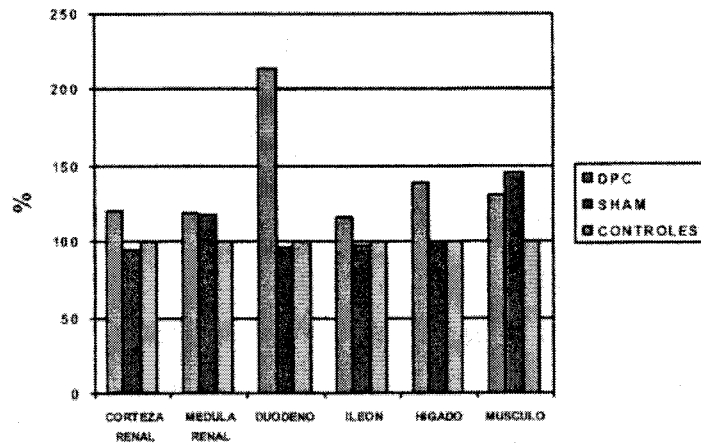


**Figura-R6.** Representación de valores medios, en tanto por ciento, de la cantidad de amonio presente en diferentes áreas del cerebro, considerando el 100% el valor correspondiente a los controles no operados.

Como puede observarse los niveles de amonio en el cerebro de las ratas con DPC son claramente mayores que en las ratas controles operadas o *sham* y controles sin operar. Esto es consecuencia de la mayor concentración plasmática de amonio en las ratas con DPC (encefalopatía hepática).

Por otra parte, hemos medido el amonio en **riñón**, tanto en corteza como en médula renales. Los valores obtenidos en corteza renal para ratas con DPC frente a los obtenidos en ratas *sham* y controles sin operar, han sido:  $5,62 \pm 1,12$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido, frente a  $3,91 \pm 0,57$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido, y  $3,95 \pm 0,26$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido, respectivamente. Las diferencias observadas entre los animales con DPC y los controles son estadísticamente significativos ( $p \leq 0,009$ ). Sin embargo, en la médula, no se observan diferencias estadísticamente significativas para la concentración de amonio en ratas con DPC respecto de las ratas controles (*sham* y controles sin operar):  $4,99 \pm 0,65$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido frente a  $4,26 \pm 0,23$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido y  $4,32 \pm 0,80$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido, respectivamente (ver **Figura-R7**).

En **intestino**, los niveles de amonio se han medido en ileon y duodeno. De los resultados expuestos se observa que en ileon no hay diferencia estadística entre los valores encontrados en las ratas controles sin operar y *sham* y las ratas con DPC. Sin embargo, si se observan diferencias estadísticamente significativas para los valores obtenidos en duodeno de ratas con DPC y los controles (*sham* y sin operar):  $3,64 \pm 0,83$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido frente a  $1,91 \pm 0,35$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido y  $1,99 \pm 0,44$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido, respectivamente (ver **Figura-R7**).



**Figura-R7. Comparación de los niveles de amonio en diferentes tejidos de ratas DPC frente a controles.** (Valores expresados como porcentajes respecto a los controles sin operar, a cuyo valor medio se le ha asignado el valor 100%).

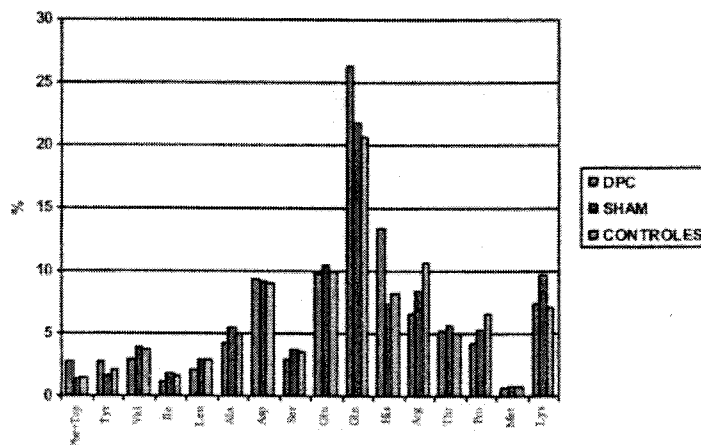
En la **Figura-R7** se muestran expresados en porcentaje (valor medio del control sin operar = 100%) los incrementos de amonio en los tejidos extra-cerebrales respecto a los controles.

### **3. INFLUENCIA DE LA DERIVACION PORTO-CAVA EN EL PERFIL DE AMINOACIDOS EN SANGRE**

Además de la hiperamonemia, los enfermos con EH se caracterizan por presentar un aminograma desequilibrado en el que la concentración de aminoácidos aromáticos (AAAs: Phe, Tyr, Trp) está significativamente elevada, mientras que la concentración de aminoácidos ramificados (AARs: Leu, Ile, Val) está significativamente disminuida (**Shawcross y Jalan, 2005**).

Por este motivo hemos medido los niveles de aminoácidos plasmáticos en nuestras ratas modelo, con el fin de ratificar que también cumple esta condición. En las **Tablas -R8, -R9 y -R10** se muestran los resultados obtenidos para ratas controles sin operar, operadas o *sham* y ratas con DPC.

En la **Figura-R8** se muestra de una manera gráfica el perfil de los diferentes aminoácidos, expresados en %.



**Figura-R8.** Perfil de aminoácidos en sangre de ratas con DPC frente controles *sham* y controles sin operar.

A partir de estos datos podemos sacar las siguientes conclusiones respecto del perfil aminoacídico: **i)** Salvo para los aminoácidos aspártico, glutámico, metionina, prolina y treonina, que no muestran diferencias significativas, y la Ser que presenta

| Muestra     | Phe+Trp | Tyr   | Val   | Ile   | Leu   | Ala   | Asp   | Ser   | Glu   | Gln   | His   | Arg   | Thr   | Pro   | Met   | Lys   | AAR/AAA |
|-------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|
| C1          | 1,45    | 1,45  | 3,93  | 1,73  | 2,97  | 4,20  | 8,42  | 3,83  | 12,03 | 26,52 | 5,83  | 7,90  | 4,79  | 4,20  | 0,88  | 8,55  | 2,98    |
| C2          | 1,93    | 2,31  | 4,97  | 1,76  | 3,55  | 5,52  | 8,80  | 4,98  | 7,84  | 21,62 | 8,07  | 9,60  | 5,25  | 10,77 | 1,13  | 2,64  | 2,42    |
| C3          | 1,42    | 2,33  | 3,32  | 1,42  | 2,38  | 4,10  | 8,29  | 2,72  | 9,37  | 17,11 | 8,31  | 14,47 | 5,38  | 5,11  | 0,31  | 7,71  | 1,90    |
| C4          | 1,39    | 2,29  | 3,32  | 1,39  | 2,33  | 3,52  | 11,58 | 4,42  | 12,22 | 21,15 | 8,07  | 7,27  | 4,79  | 7,76  | 0,90  | 8,32  | 1,91    |
| C5          | 1,43    | 2,60  | 3,75  | 2,28  | 3,61  | 6,24  | 9,04  | 2,89  | 8,81  | 20,44 | 7,47  | 10,18 | 4,90  | 7,07  | 1,13  | 7,89  | 2,40    |
| C6          | 1,22    | 1,92  | 2,98  | 1,36  | 2,18  | 6,08  | 8,29  | 2,72  | 9,37  | 17,11 | 11,14 | 14,47 | 5,38  | 5,11  | 0,31  | 7,71  | 2,08    |
| C7          | n.d.    | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.    |
| C8          | n.d.    | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.  | n.d.    |
| Valor medio | 1,47    | 2,15  | 3,71  | 1,66  | 2,84  | 4,94  | 9,07  | 3,59  | 9,94  | 20,66 | 8,15  | 10,65 | 5,08  | 6,67  | 0,78  | 7,13  | 2,28    |
| medio       | ±0,21   | ±0,37 | ±0,64 | ±0,32 | ±0,58 | ±1,05 | ±1,15 | ±0,88 | ±1,63 | ±3,18 | ±1,57 | ±2,87 | ±0,26 | ±2,20 | ±0,34 | ±2,03 | ±0,37   |

Tabla-R8. Perfil de los diferentes aminoácidos en sangre en animales control sin operar. Los resultados de las medidas de los aminoácidos están expresados en %.

| Muestra            | Phe+Trp      | Tyr          | Val          | Ile          | Leu          | Ala          | Asp          | Ser          | Glu          | Gln          | His          | Arg          | Thr          | Pro          | Met          | Lys          | AAR/AAA      |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| S1                 | 1,21         | 1,99         | 3,59         | 1,62         | 2,88         | 4,67         | 8,71         | 3,22         | 9,46         | 21,43        | 6,84         | 6,78         | 5,84         | 13,31        | 0,61         | 8,87         | 2,53         |
| S2                 | 1,46         | 1,45         | 4,03         | 1,78         | 3,08         | 5,25         | 8,25         | 3,79         | 11,70        | 26,00        | 5,83         | 7,75         | 4,63         | 4,19         | 0,84         | 8,22         | 3,06         |
| S3                 | 1,49         | 1,75         | 3,50         | 1,57         | 2,64         | 5,06         | 9,45         | 2,67         | 13,14        | 22,73        | 8,05         | 7,02         | 4,46         | 5,73         | 1,16         | 9,17         | 2,38         |
| S4                 | 1,29         | 1,70         | 3,80         | 1,69         | 2,89         | 5,65         | 8,55         | 3,80         | 8,99         | 21,12        | 7,43         | 11,84        | 6,66         | 4,66         | 0,94         | 9,00         | 2,80         |
| S5                 | 1,24         | 1,89         | 3,84         | 1,54         | 2,56         | 5,84         | 9,21         | 3,88         | 10,57        | 18,89        | 8,17         | 7,87         | 6,71         | 6,54         | 0,61         | 10,69        | 2,54         |
| S6                 | 1,39         | 1,74         | 4,97         | 2,14         | 3,48         | 6,24         | 8,67         | 4,06         | 9,95         | 19,66        | 8,45         | 9,94         | 5,79         | 2,11         | 0,75         | 10,65        | 3,38         |
| S7                 | 1,47         | 1,51         | 3,86         | 1,72         | 3,07         | 6,08         | 10,71        | 4,25         | 10,11        | 24,97        | 7,43         | 7,58         | 4,64         | 1,73         | 1,00         | 9,89         | 2,90         |
| S8                 | 1,43         | 1,53         | 3,98         | 1,75         | 2,98         | 5,52         | 10,19        | 3,81         | 10,56        | 19,82        | 7,39         | 7,89         | 6,25         | 4,79         | 1,09         | 11,01        | 2,94         |
| <b>Valor medio</b> | <b>1,37</b>  | <b>1,69</b>  | <b>3,95</b>  | <b>1,73</b>  | <b>2,95</b>  | <b>5,54</b>  | <b>9,22</b>  | <b>3,68</b>  | <b>10,56</b> | <b>21,83</b> | <b>7,45</b>  | <b>8,33</b>  | <b>5,62</b>  | <b>5,38</b>  | <b>0,87</b>  | <b>9,69</b>  | <b>2,82</b>  |
| <b>medio</b>       | <b>±0,10</b> | <b>±0,18</b> | <b>±0,42</b> | <b>±0,17</b> | <b>±0,27</b> | <b>±0,49</b> | <b>±0,80</b> | <b>±0,47</b> | <b>±1,23</b> | <b>±2,40</b> | <b>±0,78</b> | <b>±1,59</b> | <b>±0,87</b> | <b>±3,37</b> | <b>±0,19</b> | <b>±0,95</b> | <b>±0,31</b> |

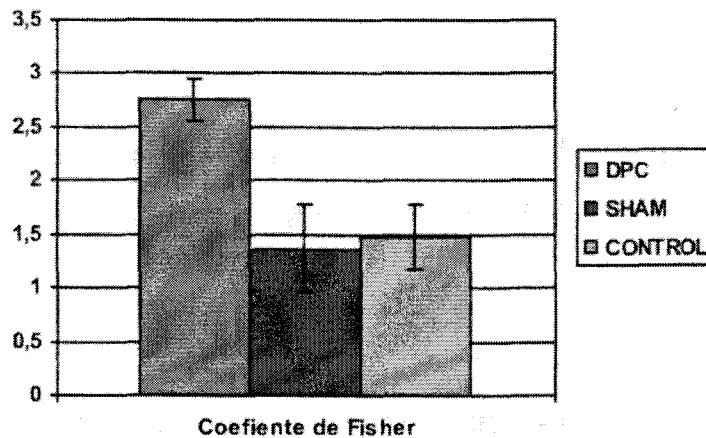
**Tabla-R9. Perfil de los diferentes aminoácidos en sangre en animales control operados o sham.** Los resultados de las medidas de los aminoácidos están expresados en %.



| Muestra     | Phe+Trp      | Tyr          | Val          | Ile          | Leu          | Ala          | Asp          | Ser          | Glu          | Gln          | His          | Arg          | Thr          | Pro          | Met          | Lys          | AAR/AAA      |
|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| A1          | n.d.         | n.d.         | n.d.         | n.d.         | n.d.         | n.d.         | n.d.         | n.d.         | n.d.         | n.d.         | n.d.         | n.d.         | n.d.         | n.d.         | n.d.         | n.d.         | n.d.         |
| A3          | 1,76         | 2,08         | 2,37         | 0,96         | 1,80         | 3,52         | 8,23         | 1,98         | 9,94         | 29,17        | 12,44        | 5,84         | 6,38         | 4,30         | 0,46         | 8,76         | 1,34         |
| A5          | 2,34         | 2,10         | 2,78         | 1,27         | 2,27         | 4,20         | 8,96         | 2,98         | 11,37        | 23,50        | 14,38        | 7,61         | 4,29         | 3,69         | 0,96         | 7,30         | 1,42         |
| A7          | 2,50         | 2,14         | 1,91         | 0,73         | 1,45         | 3,93         | 10,26        | 3,30         | 9,60         | 29,09        | 11,13        | 7,05         | 3,28         | 4,98         | 0,10         | 7,47         | 0,88         |
| A9          | 3,67         | 3,12         | 3,86         | 1,49         | 2,77         | 4,17         | 11,73        | 3,09         | 9,48         | 26,75        | 10,30        | 5,62         | 5,38         | 3,49         | 0,81         | 6,75         | 1,20         |
| A12         | 3,06         | 3,41         | 3,13         | 1,37         | 2,62         | 3,28         | 9,04         | 3,18         | 9,90         | 27,80        | 11,88        | 7,46         | 5,39         | 2,30         | 0,68         | 7,95         | 1,10         |
| A14         | 3,06         | 3,13         | 3,40         | 1,37         | 2,31         | 5,39         | 9,09         | 2,50         | 9,25         | 24,65        | 11,23        | 6,96         | 5,32         | 7,06         | 0,99         | 7,23         | 1,14         |
| A16         | 2,91         | 3,61         | 2,52         | 1,06         | 1,93         | 4,61         | 7,81         | 2,84         | 8,75         | 22,81        | 22,81        | 5,59         | 5,64         | 4,09         | 0,74         | 6,08         | 0,84         |
| Valor medio | <b>2,76</b>  | <b>2,80</b>  | <b>2,85</b>  | <b>1,18</b>  | <b>2,16</b>  | <b>4,16</b>  | <b>9,31</b>  | <b>2,84</b>  | <b>9,76</b>  | <b>26,25</b> | <b>13,45</b> | <b>6,59</b>  | <b>5,10</b>  | <b>4,27</b>  | <b>0,68</b>  | <b>7,36</b>  | <b>1,13</b>  |
|             | <b>±0,57</b> | <b>±0,62</b> | <b>±0,61</b> | <b>±0,25</b> | <b>±0,43</b> | <b>±0,65</b> | <b>±1,22</b> | <b>±0,43</b> | <b>±0,76</b> | <b>±2,42</b> | <b>±4,00</b> | <b>±0,81</b> | <b>±0,93</b> | <b>±1,37</b> | <b>±2,29</b> | <b>±0,79</b> | <b>±0,20</b> |

**Tabla-R10. Perfil de los diferentes aminoácidos en sangre en ratas con DPC. Los resultados de las medidas de los aminoácidos están expresados en %.**

un valor de  $p = 0,05$ , para todos los demás aminoácidos se observa una diferencia clara ( $p \leq 0,001$ ) entre los niveles encontrados en ratas con DPC y las ratas controles operadas o *sham* y sin operar. **ii)** La razón de Fisher [cociente entre los aminoácidos ramificados (AARs) y los aminoácidos aromáticos (AAAs)],  $1,13 \pm 0,20$  en ratas con DPC frente a  $2,82 \pm 0,31$  y  $2,28 \pm 0,37$  en ratas controles sin operar y operadas o *sham*, muestra una diferencia claramente significativa ( $p < 0,001$ ), (ver **Figura-R9**); consecuencia del alto nivel de AAAs encontrados en las ratas con DPC respecto de los niveles encontrados en las ratas controles (*sham* y sin operar), con un valor de  $p \leq 0,001$  en ambos casos.



**Figura-R9. Representación de la Razón de Fisher.** Relación entre aminoácidos aromáticos y aminoácidos ramificados entre animales DPC y controles.

**4. INFLUENCIA DE LA DERIVACION PORTO-CAVA EN LOS NIVELES DE OXIDO NITRICO EN SANGRE**

En la **Tabla-R11** se muestran los resultados de la medida de los niveles de óxido nítrico (NO) en sangre para animales controles (sin operar y *sham*) y animales con DPC, obtenidos como se describe en el apartado 5.2 de Materiales y Métodos. Los valores están expresados en  $\mu\text{mol/l}$ .

| Animal             | [NO]               | Animal             | [NO]               | Animal             | [NO]                |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| C1                 | 92,50              | S1                 | 119,21             | A1                 | 150,77              |
| C2                 | 82,11              | S2                 | 76,34              | A3                 | 236,00              |
| C3                 | 84,11              | S3                 | n.d.               | A5                 | 106,62              |
| C4                 | 110,48             | S4                 | 75,86              | A7                 | 188,20              |
| C5                 | 76,82              | S5                 | 84,51              | A9                 | 100,00              |
| C6                 | 55,20              | S6                 | 110,48             | A12                | 267,20              |
| C7                 | 39,80              | S7                 | 94,80              | A14                | n.d.                |
| C8                 | 90,00              | S8                 | 100,50             | A16                | 165,50              |
| <b>Valor medio</b> | <b>78,87±20,72</b> | <b>Valor medio</b> | <b>94,52±15,48</b> | <b>Valor medio</b> | <b>173,47±57,76</b> |

**Tabla-R11. Valores de NO en sangre.** En ratas control (sin operar y *sham*) y con DPC; expresados en  $\mu\text{mol/l}$ .

n.d.: valor no determinado.

En la **Figura-R10** se muestran los valores medios  $\pm$  DS para la concentración de NO en sangre en los tres grupos de animales estudiados. Las diferencias fueron estadísticamente significativas:  $p < 0,05$ .

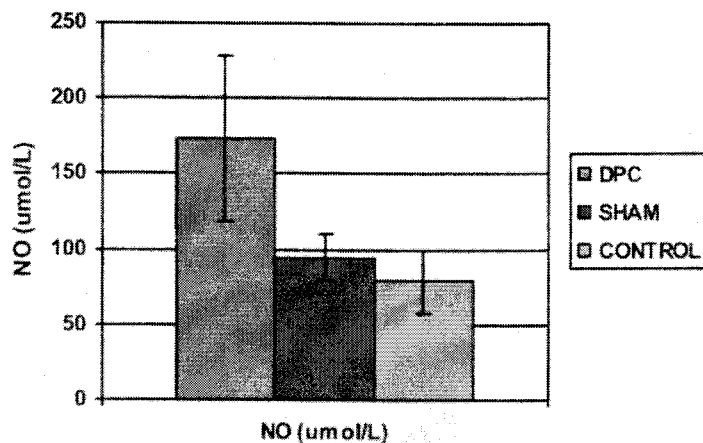


Figura-R10. Niveles de NO en sangre.

## 5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON IGF-1 DE RATAS CON DPC

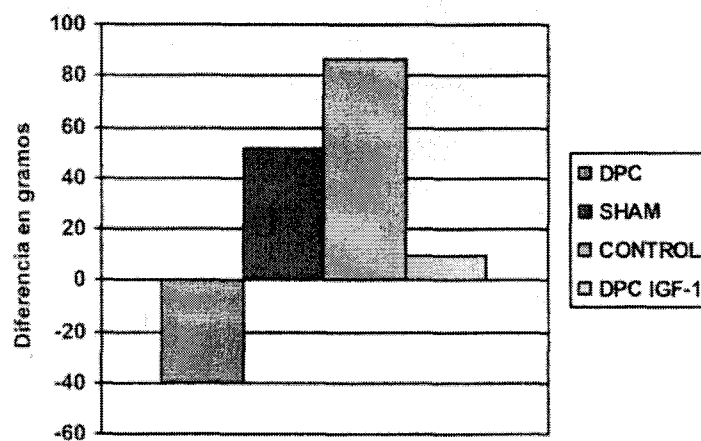
### 5.1. Efecto del tratamiento con IGF-1 sobre el peso de los animales con DPC

Se han estudiado un total de 36 ratas: 20 ratas controles (10 sin operar, y 10 *sham*) y 16 ratas con DPC: 8 se han tratado con IGF-1 y 8 no se han tratado. Del análisis de la evolución del peso se observa que las ratas tratadas con IGF-1 ganan peso ( $9,9 \pm 0,8$  gramos; valor  $> 0$ ), mientras que las ratas no tratadas pierden peso ( $40,0 \pm 1,2$  gramos: valor  $< 0$ ). Además, respecto al aspecto externo (pelaje) y salubridad, los animales tratados,

## Resultados

frente a los animales sin tratar, muestran un mejor aspecto externo y más saludable.

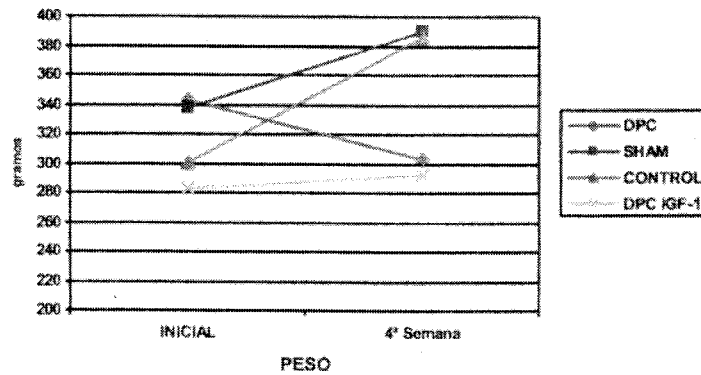
En la **Figura-R11** se muestran los incrementos de los pesos para todos los grupos estudiados: ratas controles (sin operar, y *sham*), ratas con DPC, tratadas y sin tratar.



**Figura-R11.** Estudio de ganancia (>0) y pérdida (<0) de peso para ratas con DPC tratadas con IGF-1, ratas con DPC tratadas con placebo y animales controles sin operar y operados o *sham*.

En la **Figura-R12** se muestra la variación del peso de los animales desde el inicio hasta el final del experimento. Como se puede observar, tanto en la **Figura-R11** como en la **-R12**, en el caso de las ratas con DPC, no tratadas con IGF-1, el peso disminuye desde un valor inicial de  $315,12 \pm 64,11$  g a un valor final de  $295,73 \pm 48,2$  g, mientras que en el grupo de las ratas con DPC y tratadas con IGF-1, el peso inicial aumenta

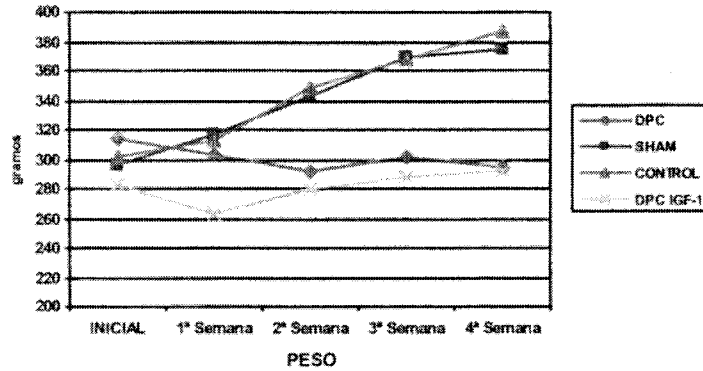
ligeramente desde  $283,06 \pm 64,33$  g hasta  $293,05 \pm 51,12$  g. Aunque este incremento de peso es mucho menor que el observado en los grupos controles (sin operar y operado o *sham*), presenta la peculiaridad de que el tratamiento con IGF-1 revierte el proceso de pérdida de peso, e incluso hace que el peso aumente. Lo cual significa un cambio cualitativamente importante en el metabolismo de los animales.



**Figura-R12.** Estudio ponderal total al inicio y final del tratamiento para ratas tratadas con DPC tratadas con IGF-1, ratas con DPC tratadas con placebo y animales controles sin operar y operadas o *sham*.

En la **Figura-R13** se muestra la evolución del peso de las ratas con DPC tratadas con IGF-1 frente al de los demás grupos, a lo largo de las cuatro semanas de estudio.

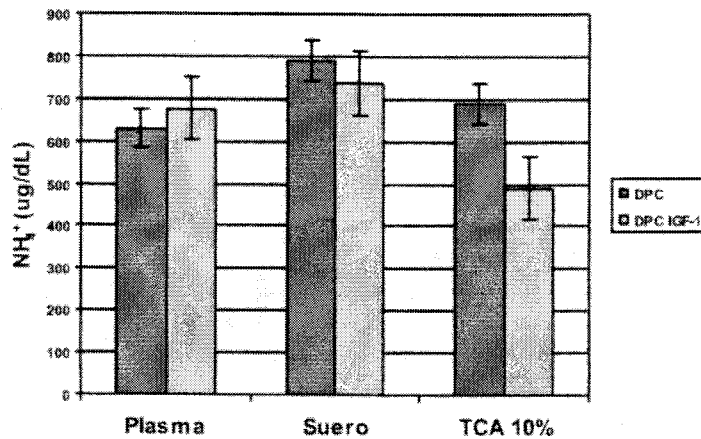
## Resultados



**Figura-R13.** Estudio ponderal a lo largo de las cuatro semanas de estudio, semana a semana, entre ratas tratadas con IGF-1, ratas DPC con placebo y animales controles de operación o *sham* inyectados con placebo y controles inyectados también con placebo.

### 5.2. Efecto del tratamiento con IGF-1 sobre la producción de amonio en ratas con DPC

Los valores medios de amonio en sangre de los animales con DPC, tratados y sin tratar con IGF-1, se muestran en la **Figura-R14**. Mientras que los valores de amonio en plasma y suero, para las ratas con DPC tratadas con IGF-1 y sin tratar, no presentan diferencias estadísticamente significativas, cuando la valoración se hace en sobrenadante procedente de la precipitación con TCA al 10%, las diferencias si son estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ), mostrando un valor claramente mas bajo en el grupo de ratas tratadas.



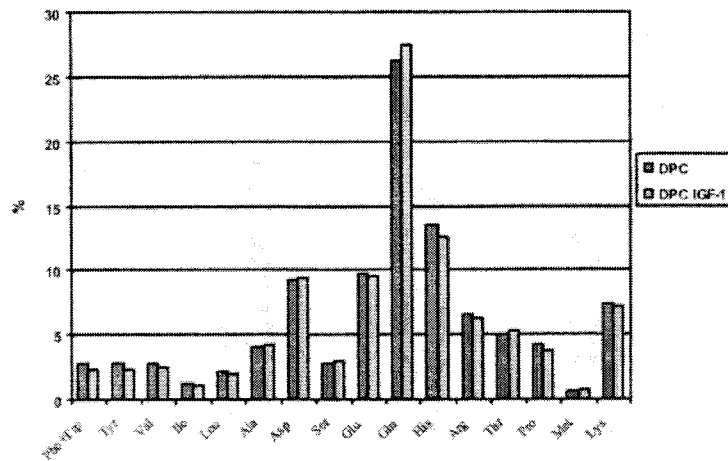
**Figura-R14.** Niveles de amonio en sangre en ratas DPC tratadas con IGF-1 y sin tratar.

Los valores de amonio en los diferentes tejidos de ratas tratadas con IGF-1 y ratas sin tratar se muestran en la **Tabla-R12**. Como puede observarse de estos valores, no hay diferencias estadísticamente significativas entre el valor del amonio en los diferentes tejidos. Si bien, los valores medios en córtex, hígado, íleon y duodeno son sistemáticamente menores en las ratas tratadas que en las ratas sin tratar.

### 5. 3. Efecto del tratamiento con IGF-1 en el perfil de aminoácidos en sangre

En la **Tabla-R13** y **Figura-R15** se muestran los valores de aminoácidos plasmáticos en ratas con DPC, tratadas con IGF-1 y sin tratar.



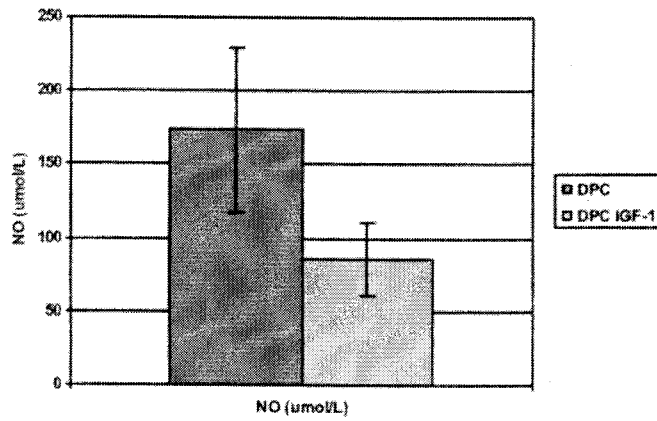


**Figura-R15.** Niveles sanguíneos de aminoácidos en animales DPC tratados con IGF-1 frente animales sin tratar

#### 5.4. Efecto del tratamiento con IGF-1 sobre los niveles de óxido nítrico en sangre

En la **Figura-R16** se muestran los resultados obtenidos para los niveles de NO en sangre de ratas con DPC tratadas con IGF-1, comparados con los niveles en ratas con DPC sin tratamiento. Los niveles de NO para las ratas con DPC tratadas fueron de  $85,66 \pm 24,55 \mu\text{mol/l}$  frente a  $173,47 \pm 57,76 \mu\text{mol/l}$  en ratas con DPC no tratadas.

A partir de estos resultados podemos observar que los valores de NO presentan una tendencia clara al decrecimiento en las ratas tratadas, respecto de las ratas sin tratar. Estos valores son estadísticamente significativos con un valor de  $p \leq 0,05$ .



**Figura-R16.** Niveles de NO en animales con DPC tratados con IGF-1 vs animales con DPC sin tratar.

| <b>Amonio en <math>\mu\text{mol/g}</math> de tejido en ratas DPC tratadas con IGF-1</b> |                                 |                                |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>Animal</b>                                                                           | <b>Hígado</b>                   | <b>Músculo</b>                 | <b>Córtex</b>                   | <b>Ganglios basales</b>         | <b>Cerebelo</b>                 | <b>Médula Renal</b>             | <b>Corteza Renal</b>            | <b>Ileon</b>                    | <b>Duodeno</b>                  |
| A2                                                                                      | 3,18                            | 4,07                           | 2,50                            | 2,14                            | 1,69                            | 9,07                            | 8,61                            | 4,84                            | 4,88                            |
| A4                                                                                      | 2,02                            | 0,96                           | 1,46                            | 1,44                            | 1,03                            | 9,83                            | 4,43                            | 1,36                            | 2,23                            |
| A6                                                                                      | 1,82                            | 3,07                           | 2,02                            | 2,06                            | 1,24                            | 5,99                            | 7,54                            | 3,55                            | 1,64                            |
| A8                                                                                      | 3,05                            | 2,85                           | 1,55                            | 2,02                            | 1,88                            | 7,99                            | 4,95                            | 2,38                            | 2,03                            |
| A10                                                                                     | 2,86                            | 1,48                           | 1,75                            | 1,77                            | 1,31                            | 6,12                            | 4,29                            | 1,02                            | 1,62                            |
| A11                                                                                     | 2,05                            | 1,42                           | 1,13                            | 1,34                            | 1,07                            | 4,35                            | 3,54                            | 1,70                            | 2,17                            |
| A13                                                                                     | 1,17                            | 1,44                           | 1,29                            | 1,44                            | 1,28                            | 4,06                            | 4,16                            | 2,24                            | 1,81                            |
| A15                                                                                     | 2,06                            | 0,81                           | 1,53                            | 1,38                            | 1,00                            | 4,28                            | 4,37                            | 1,34                            | 2,22                            |
| <b>Valor medio</b>                                                                      | <b>2,27<math>\pm</math>0,69</b> | <b>2,03<math>\pm</math>1,4</b> | <b>1,65<math>\pm</math>0,43</b> | <b>1,69<math>\pm</math>0,34</b> | <b>1,31<math>\pm</math>0,31</b> | <b>6,46<math>\pm</math>2,26</b> | <b>5,23<math>\pm</math>1,81</b> | <b>2,30<math>\pm</math>1,29</b> | <b>2,32<math>\pm</math>1,29</b> |

**Tabla-R12.** Niveles de amonio en los diferentes tejidos de ratas DPC tratadas con IGF-1.

|             | Phe + Trp   | Tyr         | Val         | Ile               | Leu         | Ala         | Asp         | Ser         | Glu         | Gln          | His          | Arg         | Thr         | Pro         | Met          | Lys         | AAR/AAA     |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| A2          | 1,8         | 2,0         | 2,2         | 0,91              | 1,6         | 4,1         | 7,6         | 2,1         | 7,7         | 28,2         | 15,9         | 7,1         | 5,4         | 3,8         | 0,9          | 8,1         | n.d.        |
| A4          | 2,1         | 2,0         | 2,5         | 1,25              | 2,1         | 3,5         | 9,9         | 3,1         | 9,6         | 27,1         | 15,4         | 5,8         | 3,3         | 5,2         | 0,9          | 5,5         | n.d.        |
| A6          | 2,4         | 2,3         | 2,5         | 1,06              | 1,9         | 3,9         | 9,6         | 2,7         | 10,0        | 26,3         | 12,2         | 6,8         | 6,5         | 3,9         | 0,1          | 7,2         | 1,1         |
| A8          | 2,5         | 2,3         | 2,6         | 1,10              | 1,9         | 3,4         | 10,3        | 2,6         | 9,9         | 27,9         | 13,0         | 7,4         | 4,2         | 1,8         | 0,8          | 7,0         | 1,1         |
| A10         | 2,8         | 2,6         | 3,1         | 1,30              | 2,2         | 4,6         | 10,2        | 3,1         | 10,8        | 31,0         | 9,2          | 0,1         | 6,6         | 3,3         | 1,1          | 7,2         | 1,2         |
| A11         | 2,2         | 2,3         | 2,4         | 1,18              | 2,1         | 4,8         | 8,6         | 4,2         | 9,4         | 25,7         | 14,6         | 6,1         | 4,3         | 3,0         | 0,8          | 7,7         | 1,2         |
| A13         | 2,4         | 2,7         | 2,5         | 1,10              | 2,0         | 4,9         | 8,1         | 2,4         | 9,1         | 26,2         | 9,5          | 9,7         | 6,3         | 4,4         | 1,1          | 6,8         | n.d.        |
| A15         | 2,6         | 2,5         | 2,1         | 0,84              | 1,5         | 4,1         | 10,3        | 2,9         | 10,0        | 26,6         | 10,3         | 6,6         | 6,3         | 4,3         | 0,4          | 8,0         | 0,8         |
| Valor medio | 2,4<br>±0,2 | 2,3<br>±0,2 | 2,5<br>±0,2 | 1,09<br>±0,1<br>5 | 1,9<br>±0,2 | 4,2<br>±0,5 | 9,3<br>±1,0 | 2,9<br>±0,5 | 9,6<br>±0,8 | 27,4<br>±1,5 | 12,5<br>±2,4 | 6,2<br>±2,5 | 5,4<br>±1,1 | 3,7<br>±0,9 | 0,80<br>±0,3 | 7,2<br>±0,7 | 1,1<br>±0,1 |

**Tabla-R13.** Perfil aminoacídico de animales con DPC tratados con IGF-1 durante tres semanas.

## **6. HIPERAMONIEMIA Y ACTIVIDAD GLUTAMINASA EN DIFERENTES TEJIDOS EXTRAHEPATICOS**

Con el fin de estudiar el papel de esta enzima en la producción de amonio se ha procedido a medir la actividad glutaminasa en el intestino y el riñón.

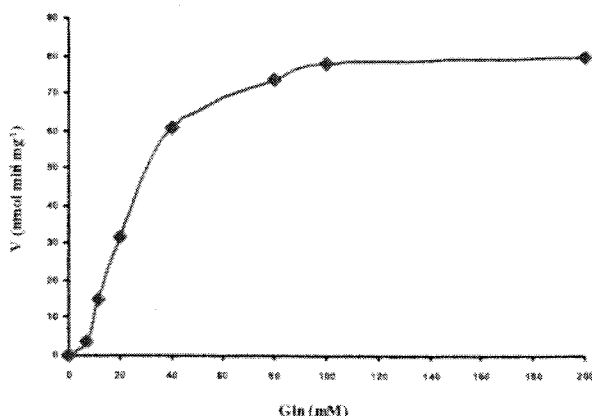
### **6.1. Caracterización cinética de la glutaminasa de tipo-K**

Las medidas de actividad de la glutaminasa se han llevado a cabo mediante dos métodos: **a) Método de Lund**, o método acoplado (Lund, 1988) y **b) Método de Heini**, o método directo (Heini y col., 1987).

#### **a) Método de Lund (medida por acoplamiento enzimático)**

En la **Figura-R17** se muestra la curva  $v \rightarrow [\text{Gln}]$  para la glutaminasa de intestino en las condiciones descritas para el Método de Lund en el apartado 5.3.1. de Materiales y Métodos.

La representación  $v \rightarrow [\text{Gln}]$  (**Figura-R17**) corresponde básicamente a una cinética de tipo michaeliano; si bien, a concentraciones de sustratos bajas, ( $< 5\text{mM}$ ), el comportamiento muestra ciertos rasgos compatibles con un comportamiento sigmoidal o cooperativo (Ramos-Guerrero, 2004). Estos datos muestran que a partir de una concentración de sustrato  $100\text{ mM}$  estamos a velocidad máxima y que un aumento de la concentración de Gln no se ve reflejado en una mayor velocidad de reacción. Por ello se ha elegido  $200\text{ mM}$  como concentración de Gln para los ensayos de actividad por este método.



**Figura-R17. Representación gráfica de la velocidad frente a la concentración de Gln.** Condiciones descritas para el Método de Lund.

La representación de los resultados anteriores mediante el método de Lineweaver-Burk, o de dobles recíprocos ( $1/v$  frente a  $1/[S]$ ), se muestran en la **Figura-R18**. Esto nos permite calcular los parámetros cinéticos de esta enzima:  $K_m$ , frente a la Gln, 5.2 mM, y  $V_{max}$ ,  $83 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína.

Dado que la representación de los datos presentan una cierta desviación de la linealidad, los parámetros cinéticos se han evaluado, además, aplicando el método de la representación lineal directa o representación de Eisenthal y Cornish-Bowden. Según este método los parámetros cinéticos obtenidos son:  $K_m$  3,95 mM y  $V_{max}$   $81,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína, valores totalmente semejante a los obtenidos con el método de dobles inversos.

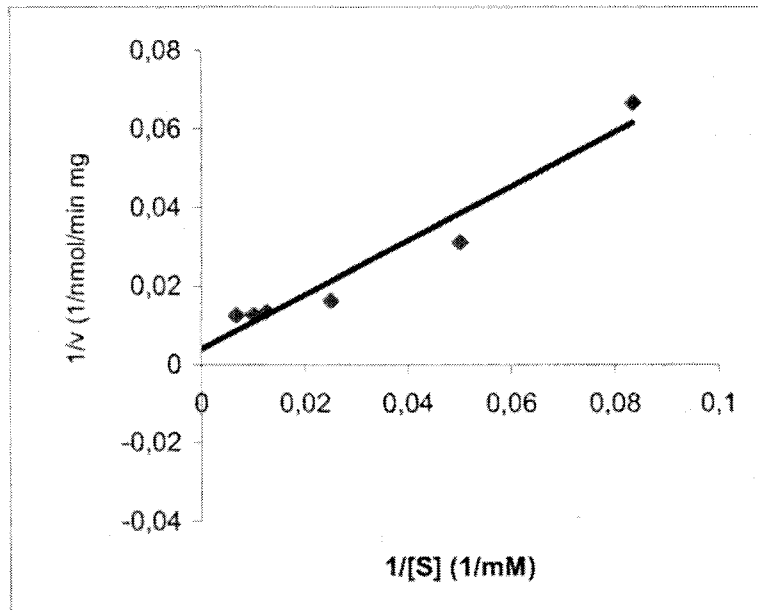


Figura-R18. Representación gráfica según el método de Lineweaver-Burk o de dobles recíprocos ( $1/v$  frente a  $1/[S]$ )

En la **Tabla-R14** se muestran los valores obtenidos mediante los dos métodos así como los correspondientes valores medios.

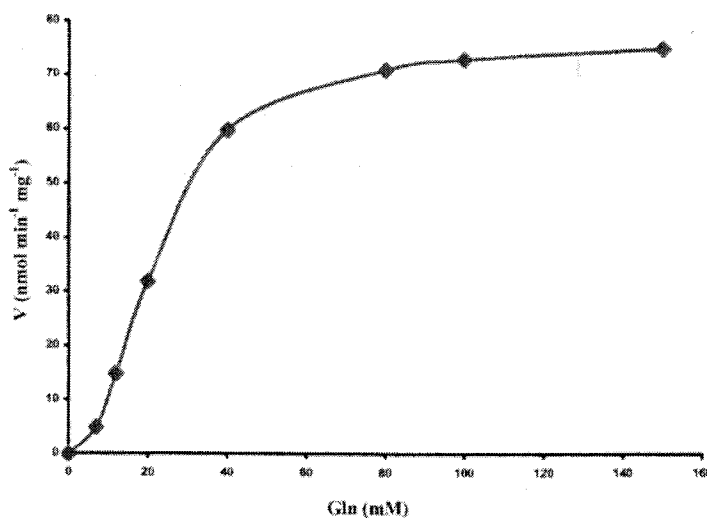
|                  | <b>Vmax (nmol min<sup>-1</sup><br/>mg<sup>-1</sup> prot)</b> | <b>Km (mM)</b>   |
|------------------|--------------------------------------------------------------|------------------|
| Lineweaver-Burke | 83,00                                                        | 5,20             |
| Lineal directa   | 81,10                                                        | 3,95             |
| Valores medios   | <b>82,05±0,95</b>                                            | <b>4,57±0,62</b> |

Tabla-R14. Parámetros cinéticos obtenidos por el Método de Lund.

**b) Método de Heini (medida directa de producto)**

Para la determinación de los parámetros cinéticos mediante este método se ha procedido de igual forma que en el método de Lund; pero, en lugar de seguir la reacción mediante el consumo de NADH en una reacción acoplada (glutamato deshidrogenada), se ha medido directamente uno de los productos de la reacción, el amonio.

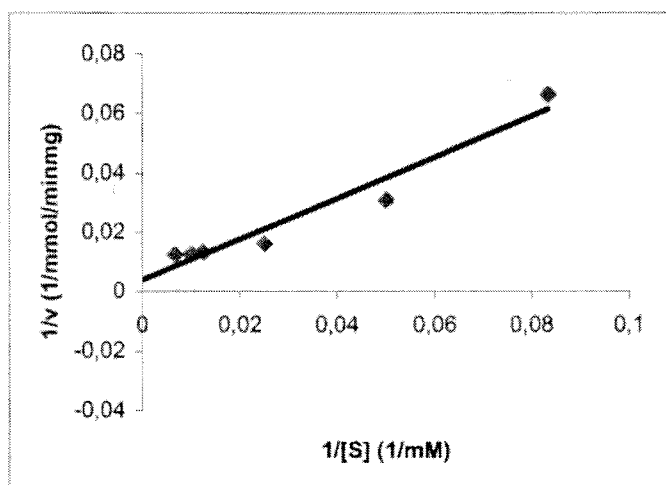
En las Figuras-R19 y -R20 se muestran las representaciones  $v \rightarrow [Gln]$  y la de dobles inversos ( $1/v \rightarrow 1/[Gln]$ ) para los datos obtenidos con el método de Heini. Como puede observarse ambos métodos proporcionan prácticamente resultados equivalentes.



**Figura-R19. Representación gráfica de la velocidad frente a la concentración de Gln. Condiciones descritas para el Método de Heini.**



Teniendo en cuenta que ambos métodos proporcionan resultados totalmente equivalentes, decidimos utilizar el método de Heini en el resto del estudio, debido al mayor control del método y eliminación de posibles errores en la determinación, por ejemplo, el establecimiento del color exacto durante la neutralización; así como por su facilidad, comodidad y posibilidad de automatización.



**Figura-R20.** Representación gráfica según el método de Lineweaver-Burke o de dobles recíprocos ( $1/v$  frente a  $1/[S]$ ) para el Método de Heini.

|                  | Vmax (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína) | Km (mM)          |
|------------------|---------------------------------------------------------|------------------|
| Lineweaver-Burke | 85,50                                                   | 5,32             |
| Lineal directa   | 82,00                                                   | 4,02             |
| Valores medios   | <b>83,75±1,75</b>                                       | <b>4,67±0,65</b> |

**Tabla-R15.** Parámetros cinéticos obtenidos por el Método de Heini.

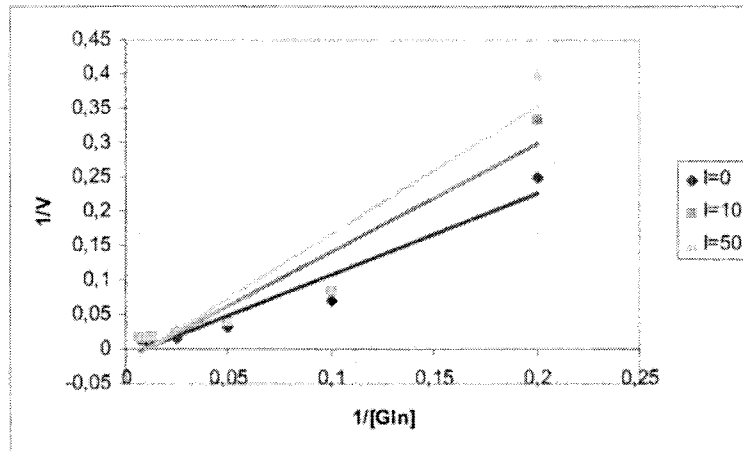
## 6.2. Inhibición de la actividad glutaminasa "in vitro"

La inhibición de glutaminasa "in vitro" se ha estudiado para los siguientes productos: histidina, glutamato, lactitol, neomicina y flumazenilo; productos utilizados en la práctica clínica con resultados muy dispares.

En las siguientes figuras se muestran la inhibición de la glutaminasa por estos productos analizada mediante la representación de dobles inversos o de Lineweaver-Burk.

### a) Inhibición por Histidina

En la **Figura-R21** se muestran la representación de dobles inversos:  $1/v \rightarrow 1/[Gln]$  para los datos obtenidos en el estudio de la inhibición de la GAP a dos concentraciones de histidina: 10 mM y 50 mM.



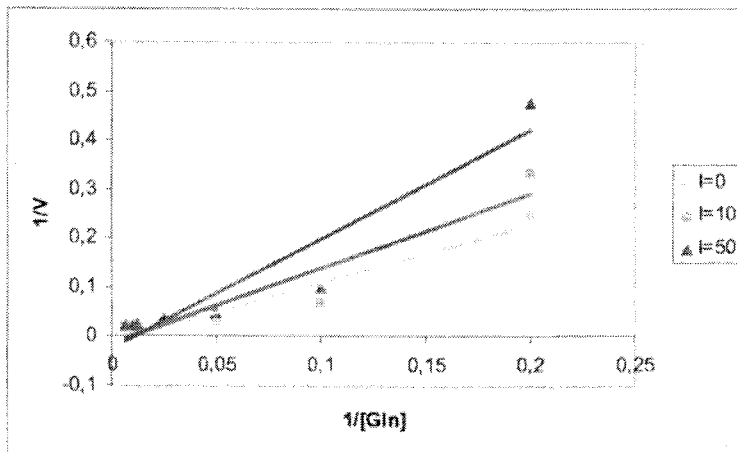
**Figura-R21.** Efecto inhibitorio de la histidina sobre la actividad de la GAP renal

Estos resultados muestran que la inhibición parece ser de tipo no-competitivo mixto ( $K_{i(10)} \neq K_{i(100)}$ ), ya que las rectas no se cortan sobre el eje de abscisas.

Del análisis de los datos anteriores, y teniendo en cuenta el tipo de inhibición, el valor de  $IC_{50}$  para este inhibidor es muy similar a los valores de  $K_i$  obtenidos para las distintas concentraciones de inhibidor: 55 - 140 mM.

### **b) Inhibición por Glutamato**

En la **Figura-R22** se muestran la representación de dobles inversos:  $1/v \rightarrow 1/[Gln]$  para los datos obtenidos en el estudio de la inhibición de la GAP a dos concentraciones de glutamato: 10 mM y 50 mM.



**Figura-R22.** Efecto inhibitorio del glutamato sobre la actividad de la GAP renal

Estos resultados muestran que la inhibición parece ser de tipo no-competitivo mixto ( $K_{i(10)} \neq K_{i(100)}$ ), ya que las rectas no se cortan sobre el eje de abscisas.

Análogamente al caso anterior, del análisis de los datos y teniendo en cuenta el tipo de inhibición, el valor de  $IC_{50}$  para este inhibidor es muy similar a los valores de  $K_i$  obtenidos para las distintas concentraciones de inhibidor: 26 -130 mM.

### c) Inhibición por Lactitol

En la **Figura-R23** se muestran la representación de dobles inversos:  $1/v \rightarrow 1/[Gln]$  para los datos obtenidos en el estudio de la inhibición de la GAP a las concentraciones de lactitol: 10 y 50 mM.

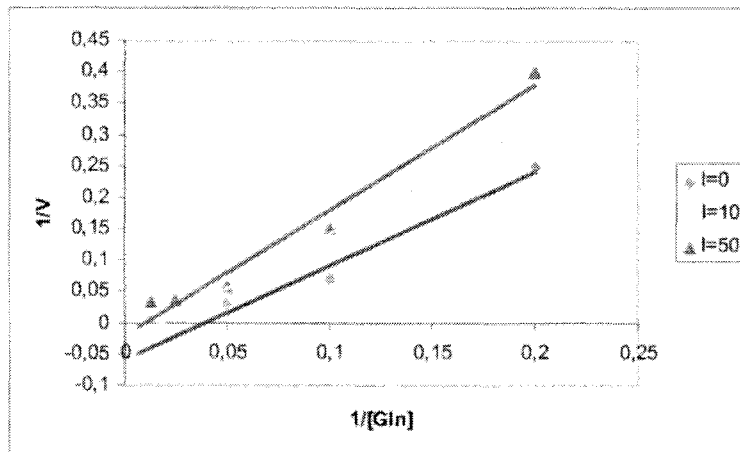


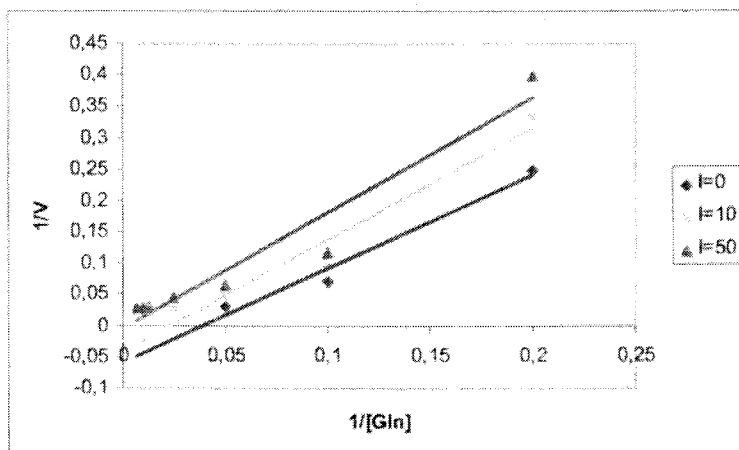
Figura-R23. Efecto inhibitor de la lactitol sobre la actividad de la GAP renal

Estos resultados muestran que la inhibición parece ser de tipo incompetitivo mixto ( $K_{i(10)} \neq K_{i(100)}$ ), ya que las rectas no son totalmente paralelas, si bien mostrando una tendencia clara a ello.

Del análisis de los datos, y teniendo en cuenta el tipo de inhibición, el valor de  $IC_{50}$  para este inhibidor depende de la concentración de inhibidor y de la concentración de sustrato. Los valores de  $K_i$  obtenidos para las distintas concentraciones de inhibidor y a una concentración de glutamina de 20 mM son: 11,1 mM y 125,0 mM.

#### d) Inhibición por Neomicina

En la Figura-R24 se muestran la representación de dobles inversos:  $1/v \rightarrow 1/[Gln]$  para los datos obtenidos en el estudio de la inhibición de la GAP a dos concentraciones de histidina: 25 mM y 100 mM



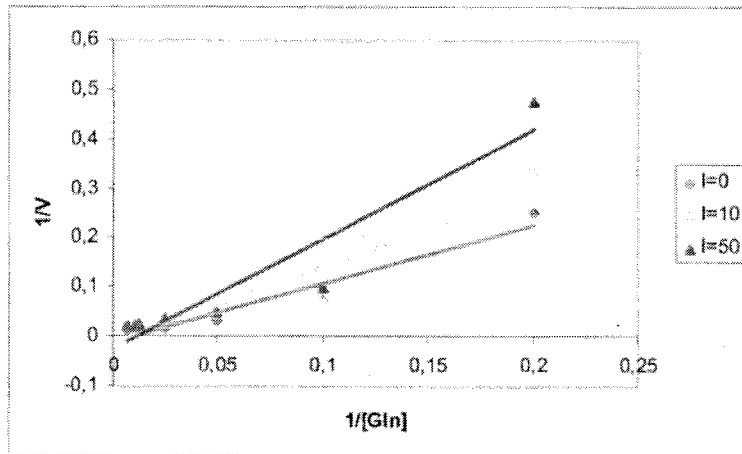
**Figura-R24.** Efecto inhibitorio de la neomicina sobre la actividad de la enzima GAP renal

Para la neomicina los resultados también muestran que la inhibición parece ser de tipo incompetitivo mixto ( $K_{i(10)} \neq K_{i(100)}$ ), ya que las rectas no son totalmente paralelas, si bien muestran una tendencia a ello.

Del análisis de los datos, y teniendo en cuenta el tipo de inhibición, el valor de  $IC_{50}$  para este inhibidor depende de la concentración de inhibidor y de la concentración de sustrato. Los valores de  $K_i$  obtenidos para las distintas concentraciones de neomicina, y a una concentración de glutamina de 20 mM, son: 1,05 mM y 14,5 mM.

#### **e) Inhibición por Flumazenilo**

En la **Figura-R25** se muestran la representación de dobles inversos:  $1/v \rightarrow 1/[Gln]$  para los datos obtenidos en el estudio de la inhibición de la GAP a dos concentraciones de flumazenilo: 1 mM y 10 mM.



**Figura-R25.** Representación gráfica del efecto inhibitorio del flumazenilo sobre la actividad de la enzima GAP renal

Estos resultados muestran que la inhibición parece ser de tipo no-competitivo mixto ( $K_{i(10)} \neq K_{i(100)}$ ), ya que las rectas no se cortan sobre el eje de abscisas.

Análogamente a los casos anteriores, del análisis de los datos, y teniendo en cuenta el tipo de inhibición, el valor de  $IC_{50}$  para este inhibidor es muy similar a los valores de  $K_i$  obtenidos para las distintas concentraciones de inhibidor: 0,38 – 3,81 mM.

### 6.3. Actividad glutaminasa en intestino

La actividad glutaminasa en el intestino se ha medido fundamentalmente en duodeno, ya que en ileon y yeyuno ésta es significativamente menor (James y col., 1988). La actividad glutaminasa se ha determinado en un grupo de 8 ratas controles sin operar, 8 ratas controles *sham* y 8 ratas con DPC. En este caso la actividad se ha medido con ambos métodos, Lund y Heini, ya que este material ha sido el que se ha utilizado para

realizar el estudio comparativo entre ambos métodos. Si bien, como ya hemos indicado, el método de Heini ha sido el elegido para la determinación de las actividades en los demás tejidos.

**i) Actividad GAP intestinal (Método de Lund)**

Los resultados obtenidos con el método de Lund se muestran en la **Tabla-R16**. Estos resultados ponen claramente de manifiesto que la actividad glutaminasa está claramente incrementada en los animales con DPC ( $0,363 \pm 0,048$  UI/mg proteína) frente a la actividad en animales controles operados ( $0,165 \pm 0,076$  UI/mg proteína). Diferencia estadísticamente significativa,  $p < 0,001$ .

| <b>Actividad Glutaminasa en Duodeno<br/>(UI/mg prot)</b> |                    |                    |                    |
|----------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <b>ANIMAL</b>                                            | <b>GAP</b>         | <b>ANIMAL</b>      | <b>GAP</b>         |
| S9                                                       | 0,078              | A23                | 0,342              |
| S10                                                      | 0,139              | A24                | 0,445              |
| S11                                                      | 0,172              | A25                | 0,366              |
| S12                                                      | 0,248              | A26                | 0,308              |
| S13                                                      | 0,252              | A27                | 0,343              |
| S14                                                      | 0,275              | A28                | 0,299              |
| S15                                                      | 0,090              | A29                | n.d.               |
| S16                                                      | 0,085              | A30                | 0,382              |
| -                                                        | -                  | A31                | 0,421              |
| <b>Valor medio</b>                                       | <b>0,165±0,076</b> | <b>Valor medio</b> | <b>0,363±0,048</b> |

**Tabla-R16.** Actividad GAP intestinal en controles operados o *sham* y ratas con DPC medidos por el método de Lund.

**ii) Actividad GAP intestinal (Método de Heini)**

Los valores individuales y valor medio se muestran en la **Tabla-R17**. La diferencia entre los valores obtenidos en los



## Resultados

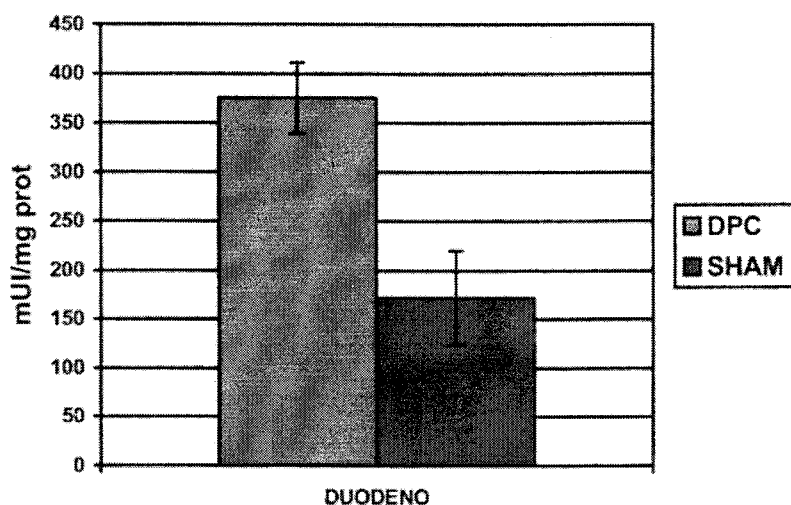
---

controles operados o *sham* y en animales con DPC muestran en este caso también una diferencia estadísticamente significativa,  $p < 0,006$ .

| Actividad Glutaminasa en Duodeno (UI/mg prot) |                    |             |                    |
|-----------------------------------------------|--------------------|-------------|--------------------|
| ANIMAL                                        | GAP                | ANIMAL      | GAP                |
| S9                                            | 0,257              | A17         | 0,417              |
| S10                                           | 0,168              | A18         | 0,368              |
| S11                                           | 0,152              | A19         | 0,315              |
| S12                                           | 0,146              | A20         | 0,375              |
| S13                                           | 0,139              | A21         | 0,372              |
| -                                             | -                  | A22         | 0,405              |
| Valor medio                                   | <b>0,172±0,048</b> | Valor medio | <b>0,375±0,036</b> |

**Tabla-R17.** Actividad GAP intestinal en controles operados o *sham* y ratas con DPC medidos por el método de Heini.

A partir de estos valores se observa que la actividad GAP es unas tres veces mayor en el intestino de las ratas con DPC que en las ratas controles operadas o *sham*. En la **Figura-R26** se muestra la actividad glutaminasa (expresada en mUI/mg proteína) en duodeno, en ratas con DPC frente a controles operados o *sham*.



**Figura-R26.** Actividad glutaminasa intestinal expresada en mUI/mg de proteína en animales con DPC frente controles operados o *sham*.

#### 6.4. Actividad glutaminasa en riñón.

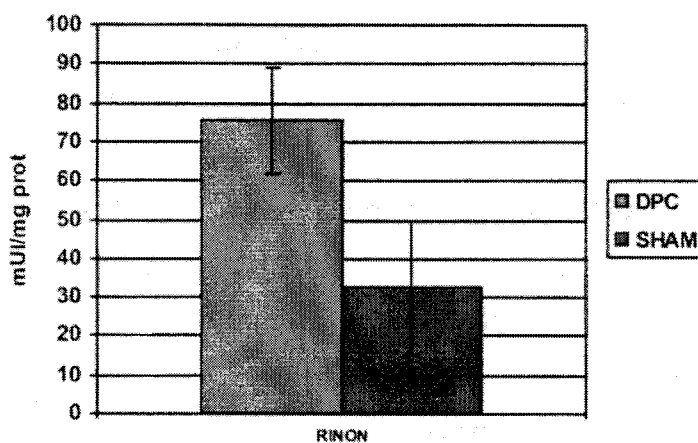
La actividad glutaminasa en riñón se ha medido, mediante el método de Heini, en riñón completo, médula y corteza renal. En la **Tabla-R18** se muestran los resultados obtenidos para las diferentes actividades GAP en riñón completo, obtenidos en 7 ratas con DPC y 7 ratas controles operadas *sham*.

En riñón completo, la actividad glutaminasa media para ratas con DPC y controles operados o *sham* han sido:  $76 \pm 13$  mUI/mg proteína, y  $32 \pm 10$  mUI/mg de proteína, respectivamente, con un valor de  $p \leq 0.001$ .

| Actividad Glutaminasa (mUI/ mg prot) |              |                    |              |
|--------------------------------------|--------------|--------------------|--------------|
| ANIMAL                               | GAP          | ANIMAL             | GAP          |
| S9                                   | 20           | A17                | 80           |
| S10                                  | 45           | A18                | 94           |
| S11                                  | 23           | A19                | 65           |
| S12                                  | 47           | A20                | 83           |
| S13                                  | 38           | A21                | 55           |
| S14                                  | 29           | A22                | 74           |
| S15                                  | 22           | A23                | 81           |
| <b>Valor medio</b>                   | <b>32±10</b> | <b>Valor medio</b> | <b>76±12</b> |

**Tabla-R18.** Actividad glutaminasa en riñón completo de ratas con DPC y controles operados *sham*.

En la **Figura-R27** se muestran de forma gráfica estos valores.



**Figura-R27.** Actividad glutaminasa en riñón en ratas con DPC y controles operados o *sham*.

En las **Tablas-R19, -R20 y -R21** se muestran las actividades en corteza y médula renal de animales controles sin operar y operados *sham*, y animales con DPC, respectivamente.

| <b>Actividad Glutaminasa (mUI/mg prot)</b> |                      |                     |
|--------------------------------------------|----------------------|---------------------|
| <b>ANIMAL</b>                              | <b>CORTEZA RENAL</b> | <b>MEDULA RENAL</b> |
| C1                                         | 56                   | 114                 |
| C2                                         | 45                   | 152                 |
| C3                                         | 76                   | 92                  |
| C4                                         | 44                   | 83                  |
| C5                                         | 42                   | 149                 |
| C6                                         | 86                   | 197                 |
| C7                                         | 53                   | 106                 |
| C8                                         | 60                   | 92                  |
| <b>Valor medio</b>                         | <b>58±15</b>         | <b>123±37</b>       |

**Tabla-R19.** Actividad glutaminasa en corteza y médula renal en ratas controles sin operar.

| <b>Actividad Glutaminasa (mUI/mg prot)</b> |                      |                     |
|--------------------------------------------|----------------------|---------------------|
| <b>ANIMAL</b>                              | <b>CORTEZA RENAL</b> | <b>MEDULA RENAL</b> |
| S1                                         | 60                   | 88                  |
| S2                                         | 51                   | 127                 |
| S3                                         | 56                   | 98                  |
| S4                                         | 57                   | 96                  |
| S5                                         | 67                   | 142                 |
| S6                                         | 92                   | 119                 |
| S7                                         | 47                   | 116                 |
| S8                                         | 54                   | 109                 |
| <b>Valor medio</b>                         | <b>60±13</b>         | <b>112±17</b>       |

**Tabla-R20.** Actividad glutaminasa en corteza y médula renal en ratas controles operadas *sham*.

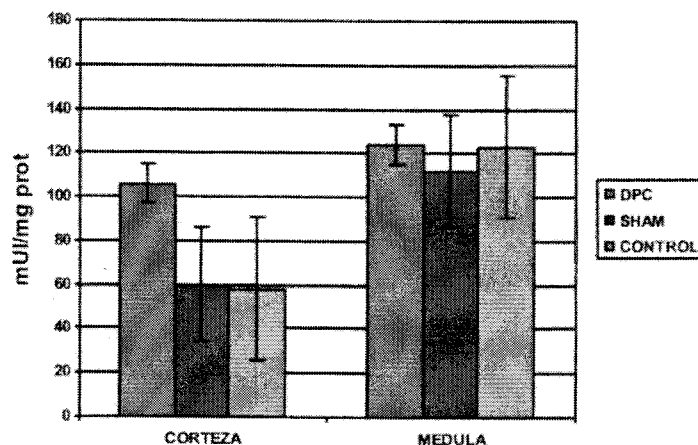
| <b>Actividad Glutaminasa (mUI/ mg prot)</b> |                      |                     |
|---------------------------------------------|----------------------|---------------------|
| <b>ANIMAL</b>                               | <b>CORTEZA RENAL</b> | <b>MEDULA RENAL</b> |
| A1                                          | 109                  | 109                 |
| A3                                          | 114                  | 118                 |
| A5                                          | 101                  | 125                 |
| A7                                          | 94                   | 89                  |
| A9                                          | 130                  | 196                 |
| A12                                         | 89                   | 100                 |
| A14                                         | 103                  | 175                 |
| A16                                         | 109                  | 78                  |
| <b>Valor medio</b>                          | <b>106±12</b>        | <b>124±39</b>       |

**Tabla-R21.** Actividad glutaminasa en corteza y médula renal de ratas con DPC.

En médula renal la actividad glutaminasa media en ratas con DPC es de  $124\pm 39$  mUI/mg proteína y en ratas controles operados o *sham* y sin operar:  $112\pm 17$  mUI/mg proteína, y  $123\pm 37$  mUI/mg de proteína, respectivamente, con un valor de p estadísticamente no significativo.

En corteza renal la actividad glutaminasa media en ratas con DPC es de  $106\pm 12$  mUI/mg proteína y en ratas controles operados o *sham* y sin operar:  $60\pm 13$  mUI/mg proteína, y  $58\pm 15$  mUI/mg de proteína, respectivamente, con un valor de  $p \leq 0,01$ , estadísticamente significativo.

En la **Figura-R28** se muestran gráficamente los anteriores resultados.



**Figura-R28.** Actividad glutaminasa en corteza y médula renales.

Como puede deducirse de los anteriores resultados la actividad glutaminasa en riñón completo es dos veces mayor en los animales con DPC que en los animales controles operados o *sham*. En corteza renal también observamos un incremento claro de esta actividad, sin embargo en médula renal los resultados obtenidos no muestran diferencias estadísticamente significativas.

#### 6.5. Actividad glutaminasa en astrocitos de diferentes áreas cerebrales

En las **Tablas-R22, -R23, -R24** se muestran los resultados obtenidos para la actividad glutaminasa en tres zonas

Resultados

diferentes del cerebro: córtex, ganglios basales y cerebelo para animales controles sin operar.

| <b>Actividad Glutaminasa (mUI/mg prot)</b> |               |                     |               |
|--------------------------------------------|---------------|---------------------|---------------|
| ANIMAL                                     | CORTEX        | GANGLIOS<br>BASALES | CEREBELO      |
| C1                                         | 449           | 565                 | 275           |
| C2                                         | 317           | 484                 | 224           |
| C3                                         | 434           | 577                 | 229           |
| C4                                         | 329           | 525                 | 316           |
| C5                                         | 357           | 594                 | 225           |
| C6                                         | 467           | 627                 | 351           |
| C7                                         | 579           | 639                 | 338           |
| C8                                         | 439           | 767                 | 388           |
| Valor medio                                | <b>421±80</b> | <b>597±80</b>       | <b>293±60</b> |

**Tabla-R22.** Actividad glutaminasa en diferentes áreas del cerebro en animales controles sin operar.

| <b>Actividad Glutaminasa (mUI/mg prot)</b> |               |                     |               |
|--------------------------------------------|---------------|---------------------|---------------|
| ANIMAL                                     | CORTEX        | GANGLIOS<br>BASALES | CEREBELO      |
| S1                                         | 319           | 450                 | 230           |
| S2                                         | 445           | 639                 | 242           |
| S3                                         | 486           | 447                 | 239           |
| S4                                         | 324           | 457                 | 312           |
| S5                                         | 379           | 424                 | 234           |
| S6                                         | 429           | 716                 | 389           |
| S7                                         | 327           | 715                 | 275           |
| S8                                         | 412           | 622                 | 373           |
| MEDIA                                      | <b>390±59</b> | <b>559±118</b>      | <b>287±60</b> |

**Tabla-R23.** Actividad glutaminasa en diferentes áreas del cerebro en ratas controles operadas o *sham*.

| Actividad Glutaminasa en Cerebro (mUI/mg prot) |                |                  |               |
|------------------------------------------------|----------------|------------------|---------------|
| ANIMAL                                         | CORTEX         | GANGLIOS BASALES | CEREBELO      |
| A1                                             | 456            | 695              | 228           |
| A3                                             | 560            | 848              | 296           |
| A5                                             | 681            | 612              | 324           |
| A7                                             | 856            | 674              | 318           |
| A9                                             | 555            | 708              | 295           |
| A12                                            | 587            | 795              | 260           |
| A14                                            | 738            | 738              | 396           |
| A16                                            | 739            | 894              | 492           |
| MEDIA                                          | <b>646±121</b> | <b>745±88</b>    | <b>326±78</b> |

**Tabla-R24.** Actividad glutaminasa en diferentes áreas cerebrales en ratas con DPC.

Como se observa, de los resultados expuestos en las anteriores tablas, la actividad glutaminasa en el córtex son:  $646 \pm 121$  mUI/mg de proteína en ratas con DPC, y  $390 \pm 59$  mUI/mg de proteína en ratas control operadas o *sham* y  $421 \pm 80$  en ratas controles sin operar ( $p \leq 0.001$ ). Estos resultados se muestran gráficamente en la **Figura-R29**.

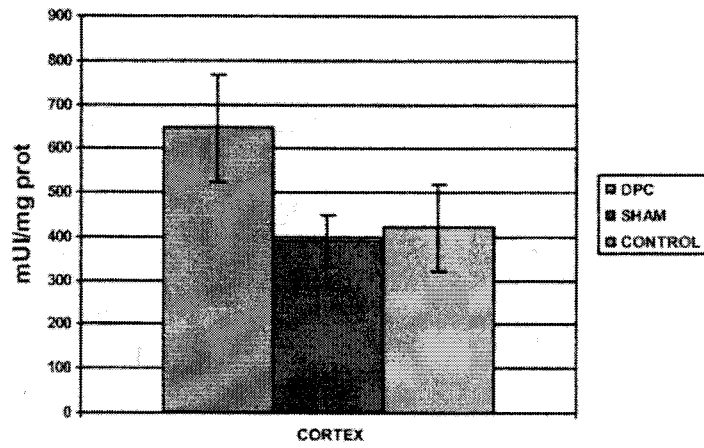
La actividad glutaminasa en ganglios basales ha sido de  $745 \pm 88$  mU/ mg de proteína en ratas con DPC frente a  $559 \pm 118$  mU/ mg de proteína en ratas controles operadas o *sham*, y  $597 \pm 80$  mUI/mg de proteína en controles sin operar, con un valor de  $p \leq 0,05$ . En la **Figura-R30** se muestran gráficamente estos resultados.



## Resultados

---

La actividad GAP en cerebelo ha sido de  $326 \pm 78$  mUI/mg de proteína en ratas con DPC frente a  $293 \pm 60$  mU/mg de proteína en ratas controles sin operar, y  $287 \pm 60$  mUI/mg de proteína en controles operados o *sham*, con un valor de  $p \leq$



0,05. En la **Figura-R31** se muestran gráficamente estos resultados.

**Figura-R29.** Actividad glutaminasa en córtex cerebral en ratas con DPC y ratas controles operadas o *sham* y controles sin operar.

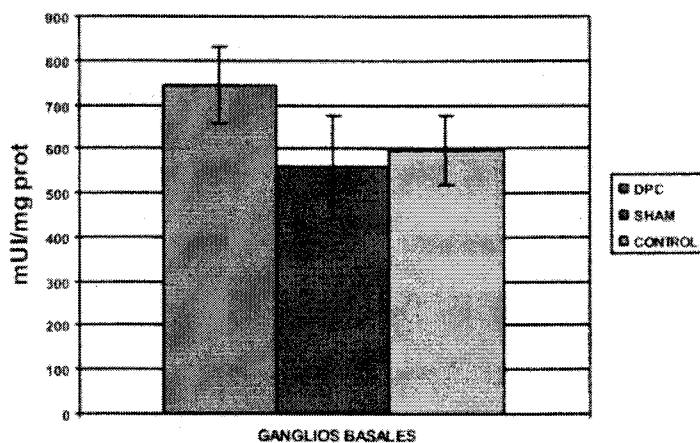


Figura-R30. Actividad glutaminasa en ganglios basales en ratas con DPC y ratas controles operadas o *sham* y sin operar.

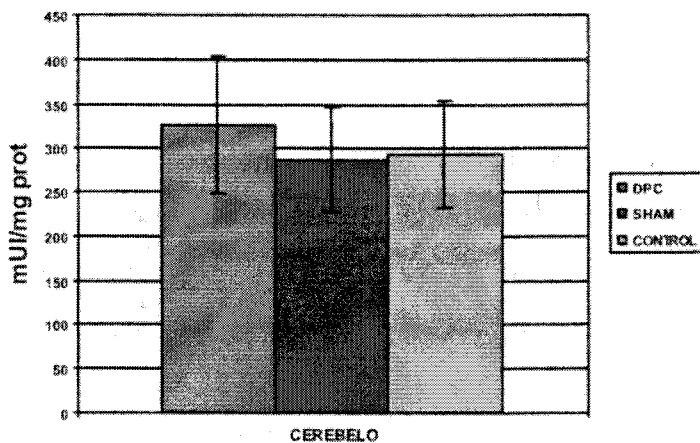


Figura-R31. Actividad glutaminasa en cerebelo en ratas con DPC y ratas controles operadas o *sham* y sin operar.

## **7. INFLUENCIA DE LA HIPERAMONIEMIA EN LA EXPRESION DE GLUTAMINASA EN DIFERENTES TEJIDOS EXTRAHEPATICOS**

En primer lugar, hemos procedido a la obtención de anticuerpos específicos contra dicha enzima.

### **7.1 Obtención de anticuerpos anti-GAP**

La estrategia seguida ha sido la de obtener los anticuerpos contra un péptido específico de la enzima, previa selección y síntesis del mismo (péptido sintético), en lugar de obtener los anticuerpos contra la enzima completa. Técnica que ha sido utilizada con éxito para un número importante de proteínas.

#### **7.1.1. Selección de un péptido inmunogénico.**

Una vez conocida la secuencia aminoacídica del gen de la GAP (Swiss-Prot: <http://us.expasy.org/sprot/>) (ver **Figura-R32**), se han seleccionado aquellas regiones con mayor probabilidad de dar respuesta inmunogénica positiva. Una vez seleccionada, hemos mandado sintetizar los correspondientes péptidos (ver Material y Métodos 7.1.2.), que una vez unidos a la proteína KLH, se han utilizado para inmunizar los conejos. Los anticuerpos obtenidos son anticuerpos policlonales, no contra la proteína completa sino, contra un péptido determinado de la molécula.

```

MMRLRSGMRLRDLRLRSPAGVSATLRRRAQPLVTL
CRRPRGGGRPAAGPAAAARLHPWWGGGGWPAEP
LARGLSSSPSEILQELGKGSTHPQPGVSPPAAPAAP
GPKDGPGETDAFGNSEGKELVASGENKIKQGLLPS
LEDLLFYTIAEGQEKIPVHKFITALKSTGLRTSDPR
LKECMDMLRRLTLQTTSDGVMLDKDLFKKCVQSNL
VLLTQAFRRKFVIPDFMSFTSHIDELYESAKKQSG
GKVADYIPLAKFSPDLWGVSVCTVDGQRHSTGD
TKVPFCLQSCVKPLKYAIAVNDLGTEYVHRYVGK
EPSGLRFNKLFLNEDDKPHNPMVNAGAIVVTSLIK
QGVNNAEKFDYVMQFLNKMAGNEYVGFSNATFQ
SERESGDRNFAIGYYLKEKKCFPEGTDMVGILDFY
FQLCSIEVTCESASVMAATLANGGFCPITGERVLS
EAVRNTLSLMHSCGMYDFSGQFAFHVGLPAKSGV
AGGILLVVPNVMGMMCWSPPLDKMGNSVKGIHF
CHDLVSLCNFHNVDNLRHFACKLDPRREGGDQRV
KSVINLLFAAYTGDVSALRRFALSAMDMEQRDYDS
RTALHVAEEGHVEVVKFLLEACKVNPFPKDRWN
NTPMDEALHFGHHDVFKILQEYQVQYTPQGSDSN
GKENQTVHKNLDGLL

```

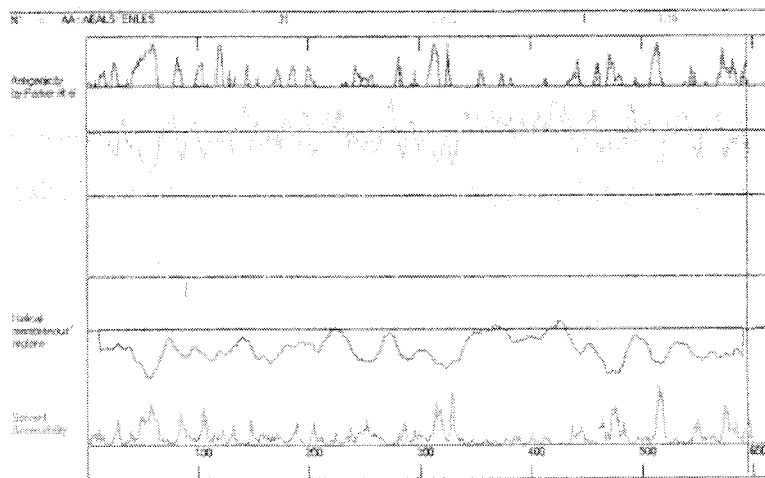
**Figura-R32.** Secuencia aminoacídica de la enzima GAP

Las herramientas bioinformáticas que hemos utilizado ha sido el programa ANTHEPROT, obtenido de la red en la dirección <http://antheprot-pbil.ibcp.fr/>

En la siguiente **Figura-R33** se muestra el análisis de la secuencia del gen de la GAP para una serie de parámetros, tales como: la antigenicidad de acuerdo con los algoritmos desarrollados por Parker y colaboradores, la hidrofobicidad, de acuerdo con el algoritmo de Kyte y Von Heijne, la estructura

## Resultados

secundaria de acuerdo a un algoritmo resultado de la combinación de los siguientes cinco métodos: el método de de GORI, de Gibralt el método de doble predicción (DPM), método Homología y el método predictor y las regiones helicoidales transmembranales de acuerdo con los algoritmos de Eisemmberg.



**Figura-R34. Análisis de la secuencia de la GAP** según su antigenicidad, hidrofobicidad, hidrofiliadad, estructura secundaria y regiones helicoidales transmembranales, mediante el programa ANTHEPROT

De acuerdo con estos datos hemos seleccionado la secuencia: <sup>590</sup>-Y-Q-V-Q-Y-T-P-Q-G-D-S-D-<sup>604</sup>, de 12 aminoácidos altamente inmunogénica, que se localiza entre los aminoácidos 590 al 604 y que se corresponde con la secuencia aminoacídica del extremo C-terminal de la proteína expresada.

-Tyr-Gln-Val-Gln-Tyr-Thr-Pro-Gln-Gly-Asp-Ser-  
Asp  
-Y-Q-V-Q-Y-T-P-Q-G-D-S-D

Además, esta secuencia, es una secuencia altamente hidrofílica, lo que la hace más accesible al solvente y por tanto más inmunogénica.

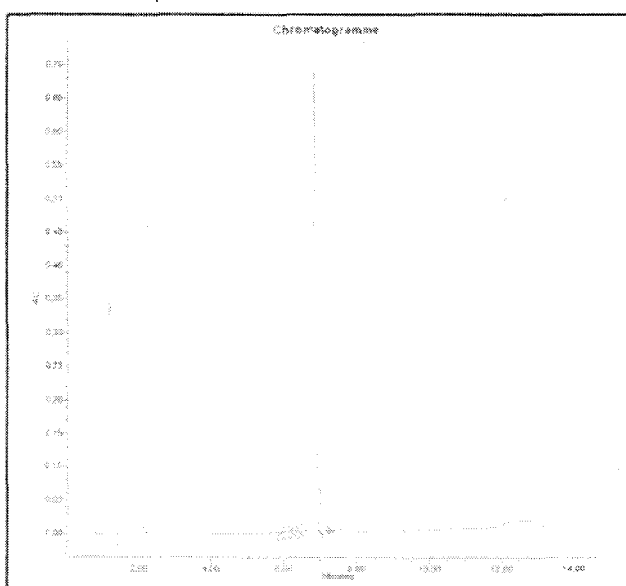
Mediante el programa BLAST (<http://pbil.ibcp.fr/NPSA>) se ha comprobado que la secuencia elegida es específica de la proteína GAP lo cual favorece la elección del péptido; ya que de no ser así, se expresaría además en otras proteínas y los anticuerpos sintetizados a partir del péptido se unirían tanto a la GAP como a proteínas distintas falseando con ello los resultados.

#### 7.1.2. Síntesis del péptido

Este péptido lo hemos mandado a sintetizar a Neosystem Laboratoire (Francia). Para que el péptido, una vez sintetizado, pueda unirse a la proteína KLH, se le ha añadido un resto de cisteína (C) en el extremo N-terminal y, para asegurar la secuencia del posible epítipo, se ha duplicado el último resto aminoacídico del péptido añadiendo, por lo tanto, al extremo C-terminal un resto de aspártico.

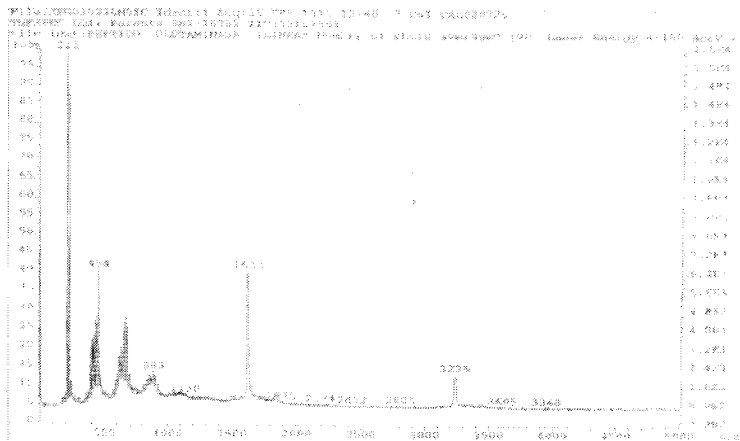
**C-Y-Q-V-Q-Y-T-P-Q-G-D-S-D-D**

El péptido así obtenido, de 14 aminoácidos, es de una alta pureza, como se observa a partir del cromatograma obtenido por cromatografía de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).



**Figura-R35.** Cromatograma RP-HPLC del péptido sintético (14 AAs)

Para corroborar la pureza del péptido y comprobar su identificación, se ha procedido a su análisis por espectrometría de masas, mediante la técnica de ionización blanda: ionización desorción asistida por láser (MALDI, utilizando las siglas inglesas de Matriz-Assited-Laser-Desoption-Ionization), y detectando los iones en un detector de tiempo de vuelo (TOF, Time-of-Fligh, utilizando las siglas inglesas). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura-R36**.



**Figura-R36.** Espectro de masas del péptido sintético de 14 AAs, obtenido por espectrometría de masas (MADI-TOF)

Como se observa en el espectro de masas (**Figura-R36**), se obtienen dos picos, uno a una relación  $m/z = 1619,65$  que se corresponde con el ión  $MH^+$ , y por tanto a una masa molecular de 1618,65 igual a la masa molecular teórica del péptido sintético de 14 aminoácidos (C-Y-Q-V-Q-Y-T-P-Q-G-D-S-D-D), y otro a una relación  $m/z = 3220,18$ , que se corresponde con el ión  $2MH^+$  y por tanto con una masa molecular doble de la del primero, 3318.18, y que representa la masa de un dímero del péptido. Este resultado es totalmente lógico, ya que en disolución y en ausencia de sustancias reductoras, al tener el péptido en su extremo N-terminal una Cys libre, la formación de un puente disulfuro (-S-S-) es totalmente posible. Los picos que aparecen a bajo peso molecular corresponden a la matriz utilizada para facilitar la volatilización del péptido (ácido sinapínico).



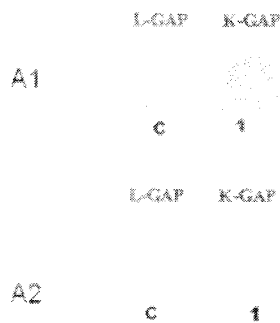
### **7.1.3. Inmunización y purificación de los anticuerpos**

Una vez obtenido el péptido puro, se ha procedido a la inmunización de los conejos tal y como se describe en el correspondiente apartado (Materiales y Métodos 7.1.3.). De manera resumida: Se ha realizado una primera inmunización con el péptido mezclado con coadyuvante completo de Freund y a los 20 días una segunda inmunización con el péptido mezclado con coadyuvante incompleto de Freund. Al cabo del periodo de inmunización, (20 días tras la segunda inmunización), se procedió al sangrado completo de los conejos y se obtuvo el correspondiente suero, del cual se han aislado las inmunoglobulinas, por precipitación con sulfato amónico al 40%.

### **7.1.4. Titulación de anticuerpos (Dot-Blot)**

Previamente a su utilización, se ha procedido a la confirmación de la presencia de anticuerpos anti K-GAP en el aislado de inmunoglobulinas mediante la técnica del dot-blot, utilizando para ello 2 µl de los péptidos sintetizados como antígenos, correspondientes a las isoformas K-GAP y L-GAP, utilizando una dilución de 1:1000.

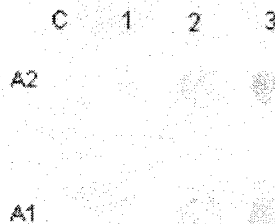
Los resultados obtenidos para los anticuerpos contra la K-GAP, obtenidos en dos conejos diferentes (A1 y A2), se muestran en la **Figura 37**.



**Figura-R37.** Especificidad de los anticuerpos anti-K-GAP

De estos resultados puede observarse la presencia de anticuerpos anti-K-GAP, y que los anticuerpos obtenidos contra el péptido correspondiente a los 14 aminoácidos extremo C-terminal de la isoforma K-GAP son específicos, ya que no reconocen al péptido de 14 aminoácidos correspondientes al extremo C-terminal de la isoforma L-GAP.

Se ha procedido a estudiar la sensibilidad del anticuerpo a la dilución 1:1000. En la **Figura-R38** se muestran los resultados obtenidos tras el estudio por dot-blot, para la sensibilidad de los sueros obtenidos en dos conejos diferentes A1 y A2.



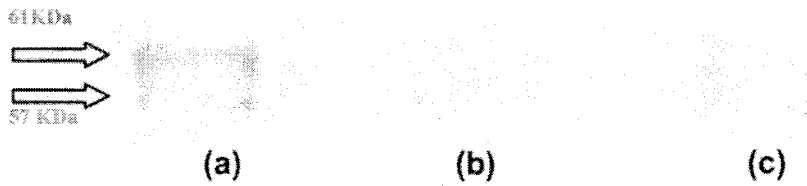
**Figura-R38.** Análisis por Dot blot de la sensibilidad del anticuerpo

En la **Figura-R38** (A1 y A2) se muestran los resultados obtenidos utilizando como antígeno el péptido sintético **C-Y-Q-V-Q-Y-T-P-Q-G-D-S-D-D** en cantidades distintas: 1) 1 µg; 2) 0,1 µg y 3) 0,01 µg, y los antisueros de cada uno de los conejos inmunizados con dicho péptido. Como control, c, se ha utilizado un péptido de 14-aminoácidos correspondiente a la L-GAP. Estos resultados ponen claramente de manifiesto que el antisuero diluido 1:1000 es capaz de detectar el antígeno, y probablemente la K-GAP, hasta niveles de 0,01µg, independientemente del suero que utilizemos, el del conejo A1 o el del A2. Estos anticuerpos detectan claramente 0,01 µg, pero incluso es posible detectar cantidades de 0,001 µg (resultados no mostrados).

## **7.2. Cuantificación de la expresión de la enzima glutaminasa en intestino y riñón en ratas con DPC**

Una vez determinada la dilución de trabajo, y la sensibilidad de los anticuerpos anti-GAP, se ha procedido a su uso para detectar la GAP en extractos mitocondriales de enterocitos, riñón y diferentes áreas cerebrales de ratas control y con DPC, una vez separadas las proteínas por electroforesis PAGE-SDS y posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa.

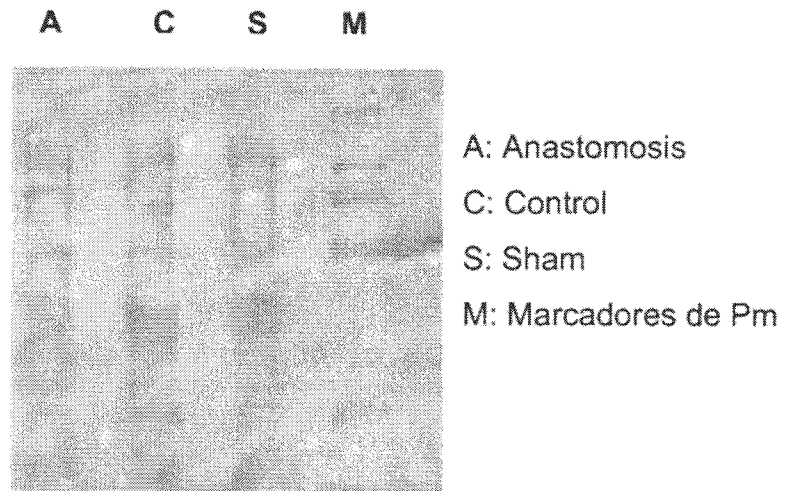
En la **Figura-R39** se muestran el Western-blot de intestino de ratas controles y ratas con DPC, utilizando la misma cantidad de proteína mitocondrial en cada ensayo.



**Figura-R39.** Expresión de glutaminasa en intestino de ratas: (a) animales con DPC, (b) control sin operar, y (c) control operado o *sham*.

Como se observa en esta figura, en los animales con DPC hay una clara sobreexpresión de la GAP de enterocito y una leve sobreexpresión en ratas *sham* y respecto a la de los controles sin operar.

A partir de estos resultados podemos destacar que se observan dos bandas, correspondientes a las dos subunidades de la enzima, una de 61 kDa y otra de 57 kDa.



**Figura-R40.** Tinción con Rojo Ponceau de una membrana de nitrocelulosa (Wester-blot).

Para confirmar que las proteínas se han transferido de manera eficiente a la membrana, ésta se ha teñido previamente, la inmunodetección, con rojo Ponceau (**Figura-R40**). Sin embargo para cuantificar las proteínas, sobre la membrana, éstas se han teñido con azul de Coomassie (**Figura-R41**).

Estos resultados ponen claramente de manifiesto, tanto por inmunoespecificidad (Western-blot), como por cuantificación directa de proteína en gel de electroforesis PAGE-SDS (tinción con azul de Coomassie), la sobreexpresión de la GAP en enterocitos de ratas con DPC.

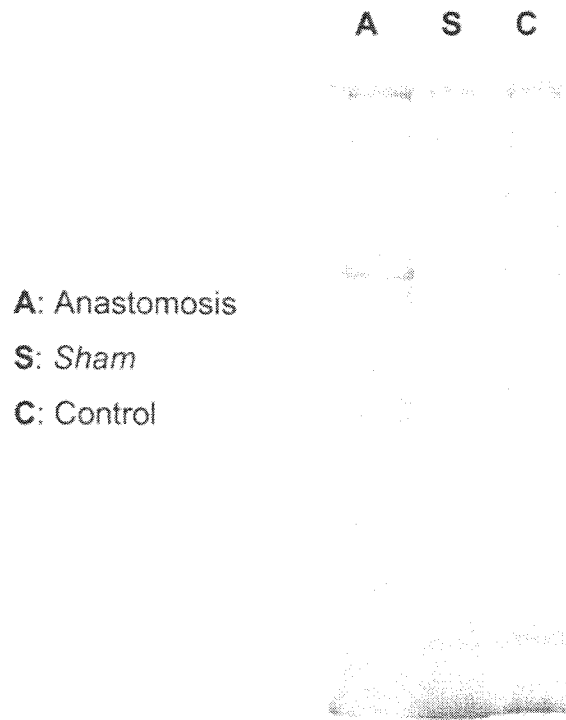
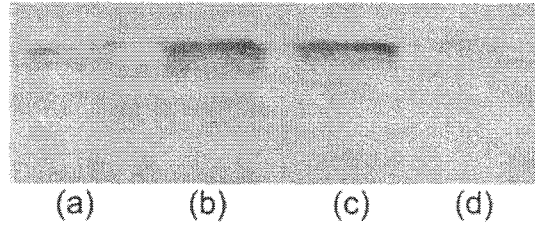


Figura-R41. Gel PAGE-SDS teñido con azul de Coomasie.

De manera análoga se ha realizado el análisis de la expresión de la GAP en riñón. En la **Figura-R42** se muestran los resultados obtenidos para el Western-blot de las proteínas de riñón de ratas control sin operar y operadas o *sham* y ratas con DPC (en médula y corteza). Como se puede observar a partir de estos resultados la expresión de la GAP en riñón, tanto en corteza como en médula, también está claramente sobreexpresada, respecto de los niveles encontrados en los controles sin operar y los operados o *sham*.



**Figura-R42.** Expresión de glutaminasa en riñón de animales: (a) control operado o *sham*, (b) con DPC (c) con DPC; (d) control sin operar.

### 7.3. Cuantificación de la expresión de la enzima glutaminasa en cerebro.

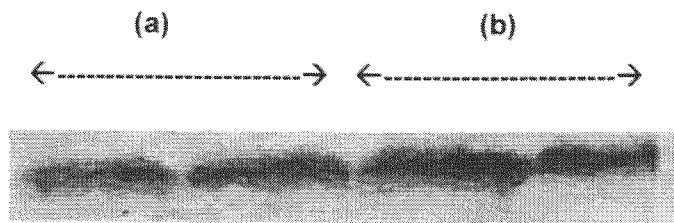
En el cerebro, análogamente a los casos anteriores, la expresión de la glutaminasa se ha estudiado en tres áreas diferentes: cortex, ganglios basales y cerebelo. En las **Figuras-R43, -R44 y -R45** se muestran la expresión de la GAP en las diferentes áreas del cerebro: cortex, ganglios basales y cerebelo, respectivamente.



**Figura-R43.** Expresión de glutaminasa en córtex cerebral de ratas: (a) controles operados o *sham*, (b) con DPC.



**Figura-R44.** Expresión de glutaminasa en ganglios basales de ratas: (a) controles operados o *sham*, (b) con DPC.



**Figura-R45.** Expresión de glutaminasa en cerebelo de ratas: (a) controles operados o *sham*, (b) con DPC.

Estos resultados muestran claramente una sobreexpresión de la enzima GAP en córtex, mientras que en ganglios basales y cerebelo no se observan diferencias estadísticamente significativas.

## 8. INFLUENCIA DE LA HIPERAMONIEMIA EN LA OXIDACIÓN PROTEICA EN DIFERENTES ÁREAS CEREBRALES

En este estudio nos hemos centrado en la evaluación de grupos carbonilos como índice de daño oxidativo.

### 8.1 Cuantificación de grupos carbonilos

La cuantificación de grupos carbonilos se ha llevado a cabo, mediante el método de la dinitro-fenil-hidrazina (DNPH), en tres áreas distintas del cerebro: cerebelo, cortex y ganglios basales, de dos maneras: i) cuantificación de grupos carbonilos totales, realizados en extractos de proteínas mitocondriales de acuerdo con el método de Levine (Levine y col., 1994) y ii) cuantificación de grupos carbonilos sobre proteínas separadas



por PAGE-SDS y posterior transferencia a membrana de nitrocelulosa de acuerdo con el procedimiento descrito por Bautista y colaboradores (**Bautista y col., 1998**).

En el primer procedimiento se cuantifican todos los grupos carbonilos presentes en la muestra y nos da una idea global del nivel de oxidación. En la **Tabla-R25** se muestran los resultados obtenidos.

|                             | <b>Controles<br/>sin operar</b><br>( $\mu$ moles/mg) | <b>Controles<br/>operados o<br/>sham</b><br>( $\mu$ moles/mg) | <b>Con DPV</b><br>( $\mu$ moles/mg) |
|-----------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Cortex</b>               | 8,1 $\pm$ 0,9                                        | 7,6 $\pm$ 1,1                                                 | 17,84 $\pm$ 1,3                     |
| <b>Cerebelo</b>             | 12,7 $\pm$ 1,9                                       | 13,1 $\pm$ 3,4                                                | 16,2 $\pm$ 3,9                      |
| <b>Ganglios<br/>basales</b> | 9,3 $\pm$ 1,0                                        | 10 $\pm$ 1,4                                                  | 20,26 $\pm$ 2,4                     |

**Tabla-R25.** Cuantificación de grupos carbonilos mediante el método de la DNPH en cortex, cerebelo y ganglios basales de ratas controles sin operar, operadas o *sham* y con DPC.

En el segundo procedimiento se analiza el grado de oxidación individualmente para cada proteína presente en el extracto. Este último procedimiento también nos permite obtener una idea del grado de oxidación total, integrando el valor individual de cada una de las proteínas; pero menos exacto que el obtenido en el análisis directo.

Los resultados obtenidos mediante el segundo procedimiento se muestran en las Figuras-R46 y -R47.

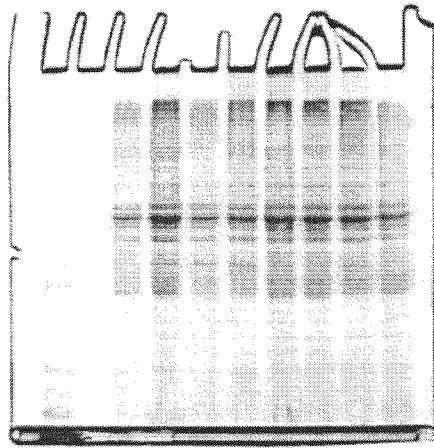


Figura-R46. Gel PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie.

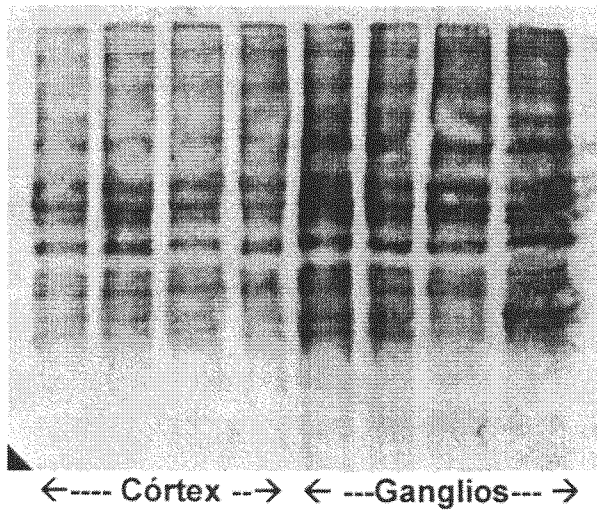


Figura-R47. Medida de oxidación de grupos carbonilo por Western-blot en córtex y ganglios basales.

Como puede observarse de estos resultados, mientras que para la cuantificación total de proteínas (tinción con azul de Coomassie) no se observa diferencias (se ha cargado la misma

## Resultados

---

cantidad de proteína en cada carril), para la cuantificación de grupos carbonilos si se observa una diferencia clara, las proteínas en los ganglios basales son más sensibles a la oxidación que las proteínas del córtex. Lo que está totalmente de acuerdo con los resultados obtenidos mediante la valoración de grupos carbonilos totales (**Tabla-R25**).

Los valores de grupos carbonilos, expresados en unidades de densidad óptica, obtenidos mediante este procedimiento se muestran en la **Tabla-R26**

| <b>Cerebelo</b>         | <b>Valor medio</b> |
|-------------------------|--------------------|
| DPC                     | 221,8±94,8         |
| <i>Sham</i>             | 179,8±25,7         |
| <b>Córtex</b>           |                    |
| DPC                     | 178,4±13,6*        |
| <i>Sham</i>             | 76,7 ± 16.3*       |
| <b>Ganglios Basales</b> |                    |
| DPC                     | 242,6±18,5*        |
| <i>Sham</i>             | 104.3±22,2*        |

**Tabla-R26.** Cuantificación de grupos carbonilo por inmunodetección, medidos en unidades de densidad óptica.

De los resultados expuestos en la **Tablas-R25** y **-R26** se observa, también, que mientras que en cerebelo no hay diferencias estadísticamente significativas, respecto de los niveles de oxidación, cuantificados como grupos carbonilos,

entre los animales controles y con DPC, éstas si existen de manera clara en córtex y ganglios basales.

## **8.2. Identificación de proteínas sensibles a la oxidación**

El estudio de la oxidación de proteínas mediante electroforesis (PAGE-SDS), Western-blot e inmunodetección mediante anticuerpos anti-DNPH no sólo nos permite semicuantificar el grado de oxidación, sino que también nos permite individualmente identificar la sensibilidad o resistencia de cada proteína a la oxidación.

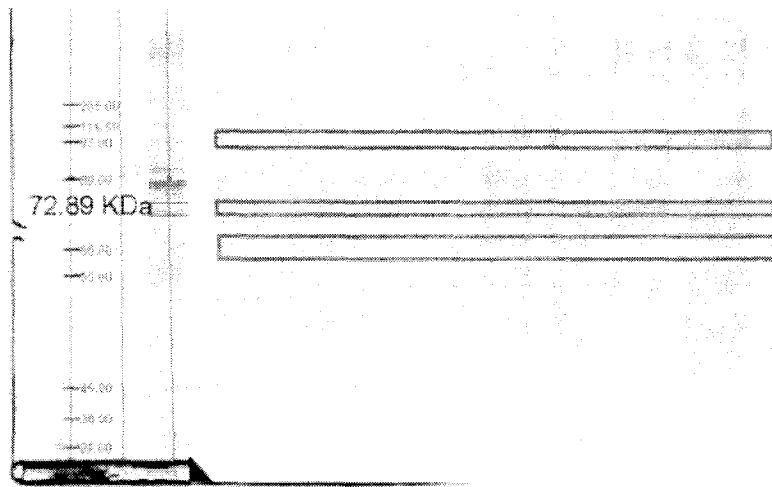
Del análisis de la **Figuras-R46** y **-R47** concluimos que las proteínas de las bandas correspondientes a 97, 73 y 68 kDa eran candidatos idóneos para analizar, debido a su alta sensibilidad a la oxidación sobre todo en ganglios basales. En la **Figura-R48** se muestra, esquemáticamente, el resultado de este análisis.

De todas ellas hemos elegido la banda de 73 kDa, que se cortó del gel, y se procedió a su digestión "*in gel*" (Materiales y Métodos 6.3.2.), se eluyeron los péptidos y se inyectaron en el HPLC acoplado al espectrómetro de masas.

Una vez analizados los pesos moleculares de los péptidos trípticos obtenidos en la digestión, mediante las distintas bases de datos, se ha identificado como componente mayoritario de la banda, con una probabilidad del 87%, el Factor Inducible por Hipoxia 3- $\alpha$  (HIF 3- $\alpha$ ).

**Resultados**

---



**Figura-R48.** PAGE-SDS, en el que se recortan las bandas para proceder a la digestión con tripsina y posterior análisis en el LC/MS/MS.

## ***V. DISCUSSION***

**1. MODELOS ANIMALES**

• **Elección del modelo**

El modelo ideal de EH debería reproducir la mayoría de los hallazgos clínicos típicos de este síndrome en humanos (**Tabla-D1**). Estos síntomas ocurren principalmente en pacientes con enfermedad hepática crónica, no siempre precipitada por factores definidos, y no siempre reversible con la corrección de los factores precipitantes. En la práctica clínica se intentan corregir estas alteraciones mediante el uso de productos/fármacos tales como la neomicina, o la lactulosa, o administrando dietas bajas en proteínas; todo ello encaminado a reducir los niveles plasmáticos de amonio. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante estos abordajes, no han proporcionado resultados claramente mejores que los obtenidos con placebo (**Uribe y col., 1987**), y se han visto asociadas a un metabolismo alterado del nitrógeno y de los aminoácidos.

|                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------|
| - Ocurre principalmente en paciente con enfermedad hepática crónica         |
| - Frecuentemente precipitada por factores definidos                         |
| - Frecuentemente reversible con la corrección de los factores precipitantes |
| - Reversible con neomicina, lactulosa o dieta baja en proteínas             |
| - Asociada a un metabolismo del nitrógeno y de los aminoácidos alterado     |
| - Amplio espectro de severidad                                              |

**Tabla-D1.** Principales signos clínicos de la Encefalopatía Hepática que debiera reproducir un modelo animal

Teniendo en cuenta que la mayoría de pacientes con EH padecen además enfermedades hepáticas crónicas, el modelo ideal sería aquel o aquellos que incluyesen esta circunstancia.

Cuando se especula con el modelo ideal de hiperamoniemia, lo primero que hemos de decidir es el nivel de hiperamoniemia que precisamos reproducir. Las necesidades de un modelo que explore los efectos de la hiperamoniemia severa por déficit enzimáticos en el ciclo de la urea son muy distintas de las de otro para el estudio de la hiperamoniemia, habitualmente más moderada, asociada con la hepatopatía crónica. Independientemente de esto, los estudios sobre los efectos de la hiperamoniemia en animales son relevantes sólo si el grado y duración de ésta son similares a la de los pacientes. Para nosotros este principio es fundamental y es en el que nos hemos basado. Sin embargo a veces no se cumple este principio por los investigadores, ya que la mayoría focalizan su interés en un exclusivo incremento del amonio en la sangre, como causa de la EH. El requisito previo de todos los estudios que deseen realizarse en este campo debería ser que el modelo animal empleado reproduzca los cambios de comportamiento que se observan en la EH humana. Al igual que en la EH en humanos, el diagnóstico es incierto hasta que otras causas de encefalopatía son excluidas, y se aprecia una respuesta empírica al tratamiento apropiado para la EH.



- **Recomendaciones para la estandarización de los modelos de hepatopatía crónica (Mullen y McCullough, 1989)**

En los modelos de cirrosis inducida por CCl<sub>4</sub> se sugiere que todos los grupos utilicen el mismo protocolo de administración del tóxico. En general, se recomienda también que se utilicen animales de edad, sexo, peso y tamaño similares. También deben estandarizarse las normas de estancia en animalarios y de alimentación.

En las ratas con DPC lo ideal sería que todos los investigadores pudiesen obtener sus animales de un mismo centro suministrador, que sería quien realizase la técnica de anastomosis, para evitar la variabilidad entre distintas técnicas quirúrgicas. En USA se pueden obtener estos animales de los laboratorios Zivic Miller, en Zelienople (PA), que los comercializan. Una alternativa sería entrenar a todos los investigadores que vayan a realizar la técnica de DPC en una misma institución en la que se realice una técnica estándar.

En la **Tabla-D2** se indican las características de la EH crónica recurrente que deberían reproducir los modelos animales según Chamuleau (**Chamuleau, 1996**).

Cualquier manipulación para mejorar estos modelos debería realizarse, sólo, según estrictos protocolos, con idea de que puedan ser reproducidos en el futuro por otros grupos. A

## Discusión

---

pesar de que estas ideas puedan parecer extremas, sólo con el cumplimiento estricto de estas normas se conseguirá que todos los investigadores estudien el mismo modelo experimental.

Ciertas medidas deberían ser dispuestas para asegurar que la estandarización da lugar a modelos animales idénticos (Tabla-D3).

|                                                                                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| - Hepatopatía crónica con <i>shunt</i> portosistémico                                                                                                        |
| - Amplio rango de EH, desde subclínica a coma                                                                                                                |
| - Precipitada por aumento en ingesta protéica, hemorragia digestiva, etc                                                                                     |
| - Mejoría con restricción protéica y lactulosa                                                                                                               |
| - Cambios en astrocitos del tipo Alzheimer II                                                                                                                |
| - Descenso en concentración cerebral de fosocolina y mioinositol                                                                                             |
| - Incremento de la intensidad en fase T1 del <i>globus pallidus</i> en RNM cerebral                                                                          |
| - Hiperamonemia plasmática                                                                                                                                   |
| - Alteración del perfil aminoacídico: incremento de la concentración de aminoácidos aromáticos y disminución de la concentración de aminoácidos ramificados. |

**Tabla-D2.** Características de la EH crónica recurrente que deberían reproducir los modelos animales (Chamuleau, 1996).

| Tests estáticos                                    | Tests dinámicos                                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Peso corporal                                      | Curvas de crecimiento y dieta estandarizada                                                                                                                                                                                                 |
| Peso de distintos órganos: hígado, bazo, testículo | Respuesta a cambios dietéticos:<br>- Crecimiento, eficiencia alimenticia, ingesta actual<br>- Cambios neurocomportamentales<br>- Balance de nitrógeno, cambios en aminoácidos plasmáticos<br>- Medidas secuenciales de composición corporal |
| Histología hepática                                |                                                                                                                                                                                                                                             |
| Contenido de colágeno hepático                     |                                                                                                                                                                                                                                             |
| Tests hepáticos y gonadales normalizados           |                                                                                                                                                                                                                                             |
| Grado de hiperamonemia                             |                                                                                                                                                                                                                                             |
| Masa corporal magra/agua corporal total            |                                                                                                                                                                                                                                             |
| Perfil hormonal: insulina y glucagón               |                                                                                                                                                                                                                                             |
| Aminoácidos plasmáticos                            | Rangos de síntesis de urea en respuesta a la administración de aminoácidos                                                                                                                                                                  |
|                                                    | Hipoalbuminemia                                                                                                                                                                                                                             |
|                                                    | Síndrome nefrótico                                                                                                                                                                                                                          |

**Tabla-D3.** Métodos teóricos para confirmar la estandarización de modelos animales entre diferentes laboratorios.

En nuestro caso todos los animales proceden del mismo animalario, el Animalario de la Universidad de Sevilla en Espartinas (Sevilla), y todos los animales han sido operados por el mismo cirujano, el Dr. Daniel Díaz Gómez, en el quirófano del estabulario del Hospital Virgen del Rocío (Sevilla).

- ***Anastomosis porto-cava experimental***

En 1983 Numata describió una modificación de la técnica que la simplifica en gran medida, la hace más fácil y reproducible y contribuye a minimizar el tiempo operatorio. La técnica se basa en una anastomosis microquirúrgica veno-venosa látero-lateral entre la porta y la cava de la rata, que permite un mayor calibre de *shunt* que la anastomosis término-lateral de Lee (Lee, 1961) y Bismuth (Bismuth y col., 1963), con una tasa de estenosis a largo plazo teóricamente menor. Permite además su utilización bien como anastomosis látero-lateral, en función de que la dejemos tal y como quede tras la realización del shunt quirúrgico, o bien término-lateral, si es que ligamos y seccionamos la vena porta en sentido proximal inmediatamente después de realizar la anastomosis, lo que permitiría aplicarla a estudios experimentales diferentes en función de los intereses.

Todo modelo animal debe reproducir los síntomas de la enfermedad que quiere "modelar", lo cual es harto difícil en el caso de las enfermedades humanas y más en un síndrome como la EH en el que se asocian sintomatología neurológica y

corporal. En nuestro caso, en el modelo de derivación porto-cava (DPC), al no poder contemplar todos los parámetros y/o síntomas tenidos en cuenta en humano hemos seleccionada los siguientes: hiperamonemia, alteración del perfil aminoacídico (alta razón de Fischer), respuesta positiva a la prueba de sobrecarga de glutamina oral, alteración generalizada del comportamiento (menor movilidad).

Todos los animales utilizados en este estudio han sido sometidos a una derivación porto-cava y se han examinado de acuerdo con los criterios anteriormente indicados: alteración clara del comportamiento y alteraciones de los parámetros bioquímicos, fundamentalmente los relacionados con los niveles de amonio plasmático y del patrón aminoacídico, y respuesta positiva a la sobrecarga de glutamina oral, como reflejo de modelo de EH adecuado.

## **2. EFECTO DE LA DERIVACIÓN PORTO-CAVA SOBRE EL PESO, EL AMONIO Y EL PERFIL DE AMINOÁCIDOS**

El primer objetivo del presente estudio ha sido asegurarnos que el modelo utilizado, a pesar de la abundante información en la bibliografía, bajo nuestras manos, realmente reflejaba los principales parámetros o características bioquímicas de la encefalopatía hepática: *i)* hiperamonemia; *ii)* alteración de los aminoácidos plasmáticos, fundamentalmente elevada concentración de aminoácidos aromáticos (AAAs) y

reducida concentración de aminoácidos ramificados (AARs); es decir, animales con una alta relación de Fischer ([AAAs]/[AARs]), y *iii*) respuesta positiva a la sobrecarga de glutamina oral. Este último punto no lo discutiremos aquí ya que ha sido ampliamente discutido en la Tesis de la Dra. Ramos Guerrero (**Ramos Guerrero, 2004**). Los animales que no han cumplido estas características han sido rechazados.

La evolución del peso se ha estudiado como parámetro relacionado con la alteración del comportamiento, ya que, en aquellos animales en los se observa una pérdida sistemática de peso, estado hipercatabólico, en el que predominan los procesos catabólicos sobre los anabólicos, generalmente se observa una alteración del comportamiento debido al desarrollo de la enfermedad. En nuestro caso, de la encefalopatía hepática, reflejado en un peor aspecto físico de los animales y una menor salubridad.

Como se puede observar de los resultados expuestos en las **Figuras-R1, -R2, -R3 y -R4**, los animales controles sin operar muestran un incremento de peso uniforme a lo largo de las 4 semanas del estudio; mientras que, en los animales controles operados o *sham* durante la primera semana post-operación el incremento en el peso corporal es menos pronunciado, probablemente como consecuencia del trauma causado por la operación. Sin embargo, tras la segunda semana y hasta el final del estudio, el incremento de peso es uniforme, semejante al observado para los animales controles sin operar,

alcanzándose al final pesos totalmente equivalentes. En el caso de los animales con DPC, sin embargo, la pérdida de peso es constante a lo largo de las cuatro semanas, si bien al final del ensayo parece moderarse esta tendencia, manteniéndose la pérdida de peso a un nivel significativamente menor.

- **Medida de amonio en sangre**

Como un control positivo de que las ratas estudiadas están en una situación de encefalopatía hepática, se ha medido en todos los animales estudiados, los niveles de amonio plasmático. La concentración de amonio se han determinado tal y como se describe en Materiales y Métodos, apartado 5.1.1., en suero, plasma y sobrenadante obtenido por precipitación con TCA al 10%.

Como puede observarse, de los datos resumidos en la **Tabla-D4**, independientemente del método utilizado, las diferencias entre los valores obtenidos para las ratas controles (controles no operados y operados o *sham*) y las ratas con DPC son estadísticamente significativos, con un valor de  $p \leq 0.001$ . Sin embargo, no existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores obtenidos para las ratas controles operadas o *sham* y las controles no operadas, lo que nos está indicando que la hiperamonemia es debido a la DPC (ratas con EH).

## Discusión

---

| Niveles de amonio en $\mu\text{g}/\text{dl}$ |                   |                  |                  |
|----------------------------------------------|-------------------|------------------|------------------|
|                                              | Suero             | Plasma           | TCA 10%          |
| Control sin operar                           | 191,1 $\pm$ 44,2  | 132,4 $\pm$ 40,6 | 110,2 $\pm$ 39,1 |
| Control operado o sham                       | 204,6 $\pm$ 34,8  | 144,3 $\pm$ 25,1 | 116,3 $\pm$ 23,0 |
| Ratas con DPC                                | 607,2 $\pm$ 167,1 | 469,6 $\pm$ 130, | 392,8 $\pm$ 96,1 |

**Tabla-D4.** Niveles de amonio en sangre de ratas controles sin operar, operadas o *sham* y con DPC.

Estos resultados también ponen de manifiesto que los valores más altos se obtienen cuando se mide el contenido de amonio en suero, probablemente debido a la menor manipulación de la muestra. Los valores más bajos se obtienen en el sobrenadante procedente de la desproteinización con TCA.

Esta discrepancia de valores, según el método utilizado, explica, en parte, los distintos valores encontrados en la literatura, y se hace necesario el establecimiento de una metodología fija. Nosotros creemos que la medida en suero mediante el método de la glutamato deshidrogenasa es el más adecuado por, los altos valores obtenidos, la poca manipulación de la muestra y la reproducibilidad del método (menor desviación estándar porcentual). Aunque, si bien, como veremos más adelante, para medir la cantidad de amonio en los tejidos necesitamos realizar una precipitación de las proteínas con



TCA, lo que probablemente nos dará resultados más bajos que los reales.

- **Medida de amonio en tejidos.**

Los niveles de amonio también se han medido en diferentes tejidos: intestino, riñón, hígado, músculo y cerebro, como reflejo de tejidos productores, transformador, consumidor y diana vulnerable o sensible al amonio, respectivamente (**ver Tabla-D5**).

En el **hígado** los niveles de amonio observados en ratas con DPC son claramente mayores que en ratas sin operar y en ratas operadas o *sham*, lo cual podría interpretarse como una acumulación de este metabolito en este tejido, debido a su mal funcionamiento. Estos valores son estadísticamente significativos,  $p < 0.05$ .

En el **músculo**, prácticamente, no observamos diferencias para los niveles de amonio entre los tres grupos de animales estudiados, controles sin operar y operados o *sham* y animales con DPC. Esto podría interpretarse como un indicio de un incremento de la utilización del amonio a nivel muscular para hacer frente a los altos niveles de amonio plasmático (**Romero y col., 2004b**), ya que el aporte plasmático de amonio a este tejido está claramente incrementado.

|                   | Control sin operar | Control operado o Sham | Ratas con DPC |
|-------------------|--------------------|------------------------|---------------|
| Hígado            | 2,02±0,30          | 2,14±0,30              | 3,02±0,38     |
| Músculo           | 1,59±0,33          | 1,81±0,54              | 1,97±0,57     |
| <b>Cerebro:</b>   |                    |                        |               |
| Cortex            | 0,50±0,07          | 0,55±0,12              | 1,90±0,32*    |
| Ganglios bas.     | 0,45±0,07          | 0,52±0,10              | 1,26±0,57*    |
| Cerebelo          | 0,36±0,08          | 0,39±0,10              | 1,17±0,68*    |
| <b>Riñón:</b>     |                    |                        |               |
| Médula            | 4,32±0,80          | 4,26±0,43              | 4,99±0,65     |
| Corteza           | 3,95±0,26          | 3,91±0,57              | 5,62±1,12     |
| <b>Intestino:</b> |                    |                        |               |
| Ileon             | 1,63±0,41          | 1,83±0,35              | 1,87±0,51     |
| Duodeno           | 1,99±0,44          | 1,91±0,35              | 3,64±0,83     |

**Tabla-D5.** Niveles de amonio en diferentes tejidos.

En el **cerebro**, con el fin de estudiar la sensibilidad al amonio de este tejido, se ha estudiado la concentración de amonio en tres áreas cerebrales distintas: córtex, ganglios basales y cerebelo. En el **córtex**, los niveles de amonio encontrados han sido:  $1,90 \pm 0,32 \mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas con DPC *versus*  $0,55 \pm 0,12 \mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas *sham* y  $0,50 \pm 0,07 \mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas sin operar. Para estos valores el valor de *p* es estadísticamente significativo ( $p < 0.05$  para las ratas sin operar y operadas o *sham* frente a las ratas

con DPC). Estos valores son del mismo orden que los encontrados por otros (Erceg y col., 2006). En los **ganglios basales** los niveles de amonio encontrados han sido:  $1,26 \pm 0,57$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas con DPC *versus*  $0,52 \pm 0,10$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas *sham* y  $0,45 \pm 0,07$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas sin operar. Valores para los cuales el valor de p también es estadísticamente significativo,  $p < 0,05$ . En el **cerebelo** los niveles de amonio encontrados han sido:  $1,17 \pm 0,68$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas con DPC *versus*  $0,39 \pm 0,10$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas *sham* y  $0,36 \pm 0,08$   $\mu\text{moles/g}$  de tejido en ratas sin operar. Valores para los cuales el valor de p también es estadísticamente significativo,  $p < 0,05$ .

Como podemos observar de estos datos, el amonio está incrementado en las tres áreas del cerebro estudiadas. Esto está de acuerdo con la hipótesis de que la hiperamonemia cerebral sea el elemento disparador en el inicio y desarrollo de la patología de la encefalopatía hepática. Por ejemplo, a través de la vía glutamate-NO-cGMP (Felipo y Butterworth, 2002).

Actualmente la hiperamonemia se considera como el principal factor responsable de las alteraciones neurológicas observadas en la EH. Sin embargo, aun no se conoce con certeza los mecanismos moleculares a través de los cuales la hiperamonemia y el fallo hepático conducen a estas alteraciones neurológicas y a la disminución de las funciones intelectuales.

Aunque el mecanismo molecular aun no está bien establecido, cada vez hay más datos experimentales que apuntan hacia la posible intervención del glutamato y del óxido nítrico (**Felipo y Butterworth, 2002**). Los receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA) están implicados en ciertos tipos de aprendizaje, por lo que se piensa que podrían jugar un papel importante en los problemas neurológicos intelectuales observados en la EH. La activación de los receptores NMDA por glutamato incrementa los niveles de  $Ca^{2+}$  en las neuronas postsinápticas. El  $Ca^{2+}$  se une a la calmodulina y activa a la óxido-nítrico sintetasa cerebral (NOS), que activa a la guanilato ciclasa, incrementándose la producción de guanidin-monofosfato-cíclico (cGMP), y parte de este cGMP es liberado al espacio extracelular sináptico. La activación de esta vía glutamato-NO-cGMP parece estar implicada en el desarrollo de ciertos tipos de aprendizajes, ya que, estudios recientes indican que la guanilato ciclasa y el cGMP son elementos importantes en los procesos de aprendizaje y memoria (**Bernabeu y col., 1996; 1997; Yamada y col., 1996**).

¿De dónde proviene este glutamato, elemento primero en la activación de la vía? A esta pregunta intentaremos darle una respuesta más adelante, una vez que hayamos discutido, brevemente, el perfil aminoacídico plasmático y la actividad glutaminasa en los diferentes tejidos.

A partir de los datos obtenidos para los niveles aminoacídicos plasmáticos, en ratas controles sin operar y operadas o *sham* y ratas con DPC (ver **Tabla-R8, -R9, -R10 y**

**Figura-R9**), podemos sacar las siguientes conclusiones respecto del perfil aminoacídico: i) Salvo para los aminoácidos aspártico, metionina, prolina y treonina, que no muestran diferencias significativas, y la Ser que presenta un valor de  $p = 0,05$ , para todos los demás aminoácidos, especialmente para los aminoácidos aromáticos (AAAs: Tyr, Phe y Trp) y aminoácidos ramificados (AARs: Leu, Ile y Val), se observa una diferencia clara ( $p \leq 0,001$ ) entre los niveles encontrados en ratas con DPC y las ratas controles sin operar y operadas o *sham*. ii) El coeficiente de Fisher [cociente entre los aminoácidos ramificados (AARs) y los aminoácidos aromáticos (AAAs)], muestra una diferencia claramente significativa ( $p < 0.001$ ), (**Figura-R9**), como consecuencia de la elevada concentración de AAAs y de la baja concentración de AARs encontradas en las ratas con DPC respecto de los niveles encontrados en las ratas controles (*sham* y sin operar).

En este hecho se basa la teoría de los falsos neurotransmisores, que propone la formación de estas sustancias, metabólicamente anormales, como una de las posibles causas de la fisiopatología de la EH. El metabolismo anómalo de los AAAs, al no funcionar adecuadamente el hígado, podría conducir a la generación de falsos neurotransmisores como la octopamina, la beta-feniletilamina, etc., que reemplazan a los verdaderos (dopamina, etc). Incluso la síntesis de los verdaderos transmisores está reducida por inhibición enzimática de la tirosín-3-hidroxilasa (**Butterworth, 1992**).

En este hecho se fundamentan también los abordajes nutricionales de la EH basados en el uso de preparados proteicos (generalmente aminoácidos, y más reciente péptidos) (**Bautista y col., 2000**) ricos en AARs y con una baja concentración de AAAs, es decir, con una razón de Fisher muy baja, con el fin de favorecer el paso al cerebro, a través de la barrera hematoencefálica, de los AARs frente a los AAAs, ya que ambos tipos de aminoácidos comparten el mismo tipo de transportador (**Butterworth, 1992**).

A partir de los datos mostrados en la **Figura-R11 y -R12** se observa que, en el caso de las ratas con DPC no tratadas con IGF-1, el peso disminuye de manera continua (- 40,2 g), mientras que en el grupo de las ratas con DPC y tratadas con IGF-1, el peso aumenta ligeramente (+ 10,0 g). Si bien, este incremento de peso es mucho menor que el observado en los grupos controles (sin operar y operado o *sham*), presenta la peculiaridad de que el tratamiento con IGF-1 revierte el proceso de pérdida de peso, e incluso hace que el peso aumente. Lo cual significa un cambio cualitativamente importante en el metabolismo de los animales, probablemente haciendo predominar los procesos anabólicos sobre los catabólicos, predominantes en los animales con DPC.

Del análisis de la evolución de los pesos semana a semana (**Figura-R13**) se puede observar que en las ratas con DPC y tratadas con IGF-1, éstos, a lo largo de la primera semana siguen un patrón totalmente parecido al de las ratas con

DPC pero sin tratamiento (disminución de peso). Sin embargo, a partir de la segunda semana el patrón cambia, observándose un claro y paulatino incremento del peso. Si bien, como ya hemos indicado, este incremento es mucho menos pronunciado que en el caso de los animales controles (sin operar y *sham*).

En cuanto al efecto del tratamiento con IGF-1 sobre la producción de amonio en ratas con DPC, los valores de amonio en sangre son prácticamente iguales en los animales tratados con IGF-1 y en los no tratados, no mostrando una diferencia estadísticamente significativa, sobre todo cuando éstos se miden en plasma o en suero; aunque, en el caso de realizarse la medida utilizando el procedimiento de precipitación con TCA la diferencia observada si es estadísticamente significativa ( $p \leq 0.001$ ).

Independientemente de esto, lo que sí cabe resaltar es que, en todos los casos, los valores de amonio en sangre obtenidos para los animales tratados con IGF-1, siempre han sido menores que en el grupo de animales no tratados. Lo cual está totalmente de acuerdo con los resultados obtenidos para la evolución del peso, que en el caso del grupo tratado con IGF-1 revierte el proceso de pérdida de peso haciéndolo aumentar. Esto podría explicarse por un efecto positivo del IGF-1 sobre la síntesis de proteínas musculares, lo que conllevaría un aumento de la utilización del amonio plasmático y por tanto a una disminución de la concentración plasmática de éste, aunque esta disminución no sea estadísticamente significativa.

De los valores de amonio en los diferentes tejidos de ratas tratadas con IGF-1 y ratas sin tratar (**Tabla-R12**) puede observarse que entre estos valores no se observan diferencias estadísticamente significativas. Si bien, los valores medios en córtex, hígado, íleon y duodeno son sistemáticamente menores en las ratas tratadas que en ratas sin tratar. Esto podría interpretarse como una consecuencia de la disminución del amonio plasmático en las ratas tratadas, bien por un mayor uso en estos tejidos o bien debido al mayor uso a nivel de músculo. Sin embargo, a nivel muscular, prácticamente, los valores son iguales en un caso y en otro, lo que podría interpretarse como consecuencia de un mayor flujo del amonio plasmático hacia el músculo y que la velocidad de uso (más lenta que en los controles) no es suficiente para disminuir significativamente los niveles de amonio.

### **3. FLUJO DE AMONIO ENTRE ÓRGANOS. ACTIVIDAD GLUTAMINASA**

Los elevados niveles de amonio en el plasma de las ratas con DPC, de acuerdo con investigaciones recientes, como las realizadas en nuestro grupo (**Romero-Gómez y col., 2002; 2004; 2006**), pueden atribuirse, además de al *by-pass* del hígado, a un incremento de la actividad glutaminasa en otros tejidos extrahepáticos como el intestino y el riñón (amonio esplénico).



Con el fin de estudiar el papel de esta enzima en la producción de amonio se ha procedido a medir la actividad glutaminasa en el intestino, y el riñón. Y con el fin de estudiar su papel en el órgano diana del amonio, se ha procedido a medir la actividad de esta enzima también en diversas áreas cerebrales, sobre todo debido a su relación con la producción de glutamato extracelular.

Previamente a la determinación de la actividad de esta enzima en diferentes tejidos, hemos procedido a determinar los parámetros cinéticos de la enzima de tipo-K (riñón) en ausencia y presencia de varios potenciales inhibidores.

- ***Caracterización cinética de la glutaminasa de tipo-K***

Las medidas de actividad de la glutaminasa se han llevado a cabo mediante dos métodos: **a)** Método de Lund, o método acoplado (Lund, 1988) y **b)** Método de Heini, o método directo (Heini y col., 1987). En el primer método la actividad se mide gracias a la producción de NADH en una reacción acoplada (glutamato deshidrogenada), mientras que en el segundo método la actividad se mide por cuantificación directa de uno de los productos de reacción, el amonio.

Como se observa en las **Figura-R17** y **-R19**, la utilización de la Gln por la GAP de intestino de rata muestra una curva de saturación típica de una cinética michaeliana. Si bien, a concentraciones de sustratos bajas (< 5mM) el comportamiento se desvía ligeramente de un comportamiento hiperbólico puro,

## Discusión

---

mostrando ciertos rasgos compatibles con un comportamiento sigmoideal o cooperativo (**Ramos-Guerrero, 2004**).

Estos datos muestran que a partir de 100 mM estamos a velocidad máxima y que un aumento de la concentración de Gln no se ve reflejado en una mayor velocidad de reacción. Por ello se ha elegido 200 mM como concentración de Gln para los ensayos de actividad por este método.

Así pues, resumiendo, el análisis simple de la curva  $v \rightarrow [Gln]$  indica que los puntos se pueden ajustar, en una primera aproximación, a una cinética michaeliana. Si bien un análisis más detenido, sobre todo a bajas concentraciones, parece indicar que esta enzima, a bajas concentraciones, podría tener un comportamiento alostérico más que michaeliano como últimamente se ha indicado para la isoenzima de riñón (Stevensen, comunicación personal).

La representación de los resultados anteriores mediante el método de Lineweaver-Burk o de dobles recíprocos ( $1/v$  frente a  $1/[S]$ ), (**Figura-R18 y -R20**), nos permite calcular los parámetros cinéticos de la enzima a partir de los cortes en el eje de ordenadas ( $V_{max}$ ) y en el eje de abscisas ( $K_m$ ). Dado que la representación de los datos presentan una cierta desviación de la linealidad, los parámetros cinéticos se han evaluado, además, aplicando el método de la representación lineal directa o representación de Eisenthal y Cornish-Bowden (**Nuñez de Castro, 2000**).

En la **Tabla-D6** se muestran los valores obtenidos mediante los dos métodos, así como los correspondientes valores medios.

|                                                                   | Heini      | Lund       |
|-------------------------------------------------------------------|------------|------------|
| <b>Vmax</b> (nmol min <sup>-1</sup><br>mg <sup>-1</sup> proteína) | 83,75±2,47 | 82,05±0,95 |
| <b>Km</b> (mM)                                                    | 4,67±0,65  | 4,57±0,92  |

**Tabla-D6.** Parámetros cinéticos de la GAP tipo K.

Teniendo en cuenta que ambos métodos proporcionan resultados totalmente equivalentes, decidimos utilizar el método de Heini en el resto del estudio, debido al mayor control del método y eliminación de posibles errores en la determinación, por ejemplo, el establecimiento del color exacto durante la neutralización; así como por su facilidad, comodidad y posibilidad de automatización.

- ***Inhibición de la actividad glutaminasa "in vitro"***

La inhibición de glutaminasa "*in vitro*" se ha estudiado para los siguientes productos: histidina, glutamato, lactitol, neomicina y flumazenilo. Productos utilizados en la práctica clínica con resultados muy dispares. Los datos obtenidos se resumen en la **Tabla-D6**.

De los resultados obtenidos no se puede concluir una inhibición efectiva para ninguno de ellos ya que los efectos

## Discusión

inhibidores empiezan a manifestarse a concentraciones elevadas de inhibidor (altos valores de  $IC_{50}$ , del orden de mM).

|                    | <b>Tipo</b>          | <b><math>IC_{50}</math></b> |
|--------------------|----------------------|-----------------------------|
| <b>Histidina</b>   | No-competitiva mixta | 55-140 mM                   |
| <b>Glutámato</b>   | No-competitiva mixta | 26-130 mM                   |
| <b>Lactitol</b>    | Incompetitiva mixta  | 11-125 mM                   |
| <b>Neomicina</b>   | Incompetitiva mixta  | 1,05-14,5 mM                |
| <b>Flumazenilo</b> | No-competitiva mixta | 0,38-3,8 mM                 |

**Tabla-D7.** Tipo de inhibición y rango de valores de  $IC_{50}$  para los inhibidores de la GAP: Histidina, Glutamato, Lactitol, Neomicina y Flumazenilo.

En cuanto al tipo de inhibición, la histidina, el glutamato y el flumazenilo presentan una inhibición de tipo no-competitiva mixta, ya que las rectas cortan el eje de ordenadas en distintos puntos y tiende a cortarse dentro del primer cuadrante, no sobre el eje de abscisas, como cabría esperar para una inhibición no competitiva pura en una representación de dobles inversos. Mientras que el lactitol y la neomicina parecen ser inhibidores incompetitivos o incompetitivos (en una representación de dobles inversos las rectas son prácticamente paralelas).

No obstante algunos de ellos, como por ejemplo la neomicina y el flumazecino, podrían utilizarse como productos

de partida para diseñar nuevos inhibidores, derivados de ellos, ya que presentan los valores de IC<sub>50</sub> más bajos, e incluso el flumazenilo del orden  $\mu$ molar (380  $\mu$ M), valor no obstante relativamente alto para un inhibidor eficiente (**Núñez de Castro, 2000**).

- ***Actividad glutaminasa en intestino***

La actividad glutaminasa en el intestino se ha medido fundamentalmente en duodeno ya que en ileon y yeyuno ésta es significativamente menor (**James y col., 1988**). En este caso la actividad se ha medido con ambos métodos, Lund y Heini, ya que este material ha sido el que se ha utilizado para realizar el estudio comparativo entre ambos métodos. Si bien, como ya hemos indicado, el método de Heini ha sido el elegido para la determinación de las actividades en los demás tejidos, dada su mayor sencillez, mínima posibilidad de errores, debido a su menor manipulación, y a su mayor facilidad para semi- y/o automatizar.

Los resultados obtenidos con el método de Lund y Heini, respectivamente, se muestran en la **Tabla-D8**. Estos resultados ponen de manifiesto que la actividad glutaminasa en duodeno está claramente incrementada en los animales con DPC, y que estas diferencias son estadísticamente significativa  $p < 0,001$ , independientemente del método utilizado.

Como podemos observar, la actividad glutaminasa determinada mediante los dos métodos, expresadas como

## Discusión

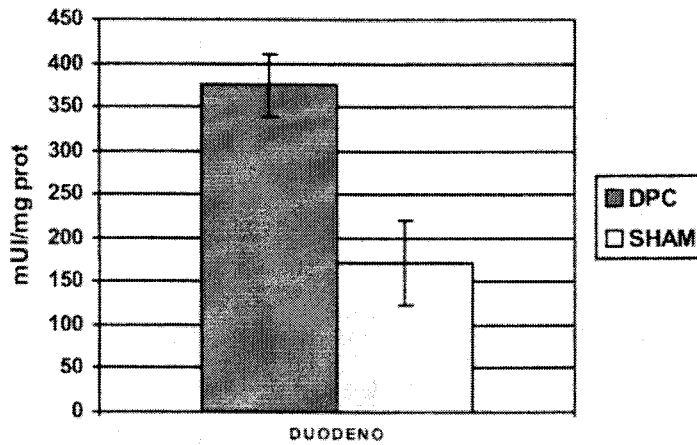
---

UI/mg proteína, son prácticamente iguales. La actividad GAP intestinal media en ratas controles operados *sham* y ratas con DPC, medida mediante el método de Lund, es de  $165\pm 76$  mU/mg proteína y  $363\pm 48$  U/mg proteína, respectivamente; mientras que la actividad GAP intestinal media en ratas controles operados *sham* y ratas con DPC, medida mediante el método de Heini, es de  $172\pm 48$  U/mg proteína y  $375\pm 36$  U/mg proteína, respectivamente.

|                 | Controles operados o <i>sham</i> (mU/mg proteína) | Ratas con DPC (mU/mg proteína) |
|-----------------|---------------------------------------------------|--------------------------------|
| Método de Lund  | $165\pm 76$                                       | $363\pm 48$                    |
| Método de Heini | $172\pm 48$                                       | $375\pm 36$                    |

**Tabla-D8.** Actividad GAP intestinal en controles operados o *sham* y ratas con DPC medidos por el método de Lund y Heini, respectivamente.

A partir de estos valores también se observa que la actividad GAP es unas tres veces mayor en el intestino (duodeno) de las ratas con DPC que en las ratas controles operadas o *sham*, resultados totalmente de acuerdo con los resultados previamente encontrados en nuestro laboratorio (Romero y col., 2004).



**Figura-D1.** Actividad glutaminasa intestinal expresada en mUI/mg de proteína en animales con DPC frente controles operados o *sham*.

- **Actividad glutaminasa en riñón**

La actividad glutaminasa en riñón, se ha medido mediante el método de Heini, en riñón completo, médula y corteza renal. En la **Tabla-D9** se muestran los resultados obtenidos para las diferentes actividades GAP en riñón completo, corteza y médula renal.

## Discusión

---

|         | Controles sin operar | Controles operados o sham | Ratas con DPC |
|---------|----------------------|---------------------------|---------------|
| Riñón   | -                    | 32±10                     | 76±12         |
| Corteza | 58±15                | 60±13                     | 106±12        |
| Médula  | 123±37               | 112±17                    | 124±39        |

**Tabla-D9.** Actividad glutaminasa en riñón completo, corteza y médula renal de ratas controles sin operar y operadas y ratas con DPC. Medidas en mUI/mg prot.

Como puede observarse de estos datos, tanto en riñón completo como en corteza, la actividad glutaminasa en las ratas con DPC es estadísticamente mayor que en los controles sin operar y operados o *sham*, con un valor de  $p \leq 0.001$ . Sin embargo, en médula renal no se observan diferencias estadísticamente significativas.

Como puede deducirse de los anteriores resultados la actividad glutaminasa en riñón completo es dos veces mayor en los animales con DPC que en los animales controles operados o *sham*. En corteza renal también observamos un incremento claro de esta actividad, sin embargo en médula renal los resultados obtenidos no muestran diferencias estadísticamente significativas.



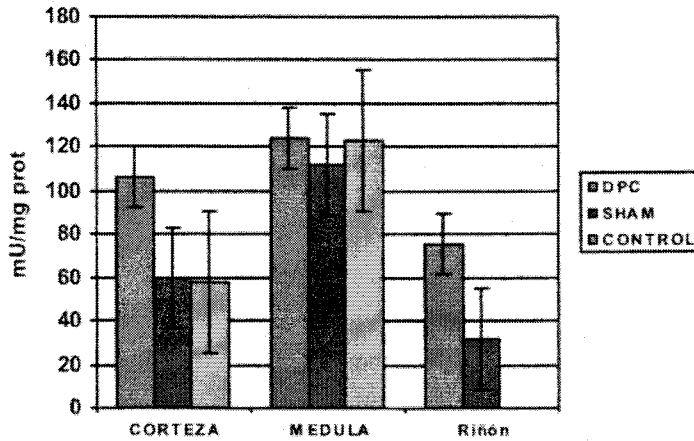


Figura-D2. Actividad glutaminasa en corteza y médula renales, así como en riñón completo.

- **Actividad glutaminasa en cerebro**

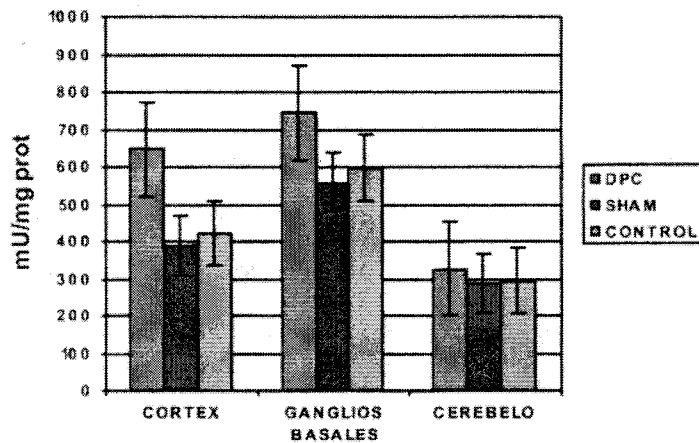
En la **Tabla-D10** se muestran los resultados obtenidos para la actividad glutaminasa en tres zonas diferentes del cerebro: córtex, ganglios basales y cerebelo para animales controles sin operar y operados o *sham* y ratas con DPC.

Como se observa de los resultados expuestos en la anterior tabla, la actividad glutaminasa en el córtex de animales controles sin operar y operados o *sham* y animales con DPC son estadísticamente significativas, con un valor de  $p \leq 0.001$ . Estando claramente incrementada la actividad en los animales con DPC. Estos resultados se muestran gráficamente en la **Figura-D3**.

**Discusión**

|                  | Controles sin operar | Controles operados o sham | Ratas con DPC |
|------------------|----------------------|---------------------------|---------------|
| Córtex           | 421±80               | 390±59                    | 646±121       |
| Ganglios basales | 597±80               | 559±11                    | 745±88        |
| Cerebelo         | 293±60               | 287±60                    | 326±78        |

**Tabla-D10.** Actividad glutaminasa en diferentes áreas cerebrales en ratas controles sin operar y operadas o *sham* y ratas con DPC. Actividades medidas en mU/mg proteína.



**Figura-D3.** Actividad glutaminasa en diferentes áreas del cerebro.

La actividad glutaminasa en ganglios basales, igualmente está incrementada (745±88 mU/ mg de proteína) en ratas con DPC frente a los valores encontrados en ratas controles operadas o *sham* y controles sin operar (559±118 mU/ mg de proteína y 597±80 mU/mg de proteína, respectivamente), con

un valor de  $p \leq 0,05$ . En la **Figura-D3** se muestran gráficamente estos resultados.

Sin embargo estas diferencias no se han observado en cerebelo, donde la actividad GAP encontrada ha sido bastante parecida en los tres casos:  $326 \pm 78$  mUI/mg de proteína en ratas con DPC frente a  $293 \pm 60$  mU/mg de proteína en ratas controles sin operar, y  $287 \pm 60$  mUI/mg de proteína en controles operados o *sham*, con un valor de  $p \leq 0,05$ . En la **Figura-D3** se muestran gráficamente estos resultados.

- ***Papel de la glutaminasa en los tejidos extrahepáticos***

Con el fin de detectar específicamente la presencia de la enzima GAP y para investigar la posibilidad de una sobre-expresión de la enzima en los diferentes tejidos de los animales con DPC respecto a controles, en primer lugar, hemos procedido a la obtención de anticuerpos específicos contra dicha enzima. Para ello, en lugar de purificar la enzima directamente a partir de homogenados tisulares, se ha recurrido a una estrategia alternativa basada en la obtención de un péptido sintético a partir de la secuencia del gen de la glutaminasa humana (Patarroyo y col., 1987). Técnica que ha sido utilizada con éxito para un número importante de proteínas (Gutiérrez y col., 1997).

La estrategia seguida, ha sido la siguiente: *i*) Selección de un péptido inmunogénico. Para ello, el primer paso fue conocer la secuencia aminoacídica del gen de la GAP lo cual es posible

## Discusión

---

a partir de cualquiera de las bases de datos disponibles en la red. Concretamente nosotros hemos utilizado la base de datos Swiss-Prot (<http://us.expasy.org/sprot/>). La secuencia obtenida se muestra en la **Figura-R25** (ver pg. 179). A partir de esta secuencia, y mediante el software adecuado, hemos seleccionado las regiones con mayor probabilidad de dar respuesta inmunogénica positiva. Una vez seleccionadas las regiones, se ha mandado sintetizar los correspondientes péptidos, que unidos a la proteína KLH, se han utilizado para inmunizar los conejos. Es decir, los anticuerpos que hemos obtenido son anticuerpos policlonales no contra la proteína completa sino contra un péptido determinado de la molécula.

La herramienta bioinformática que hemos utilizado ha sido el programa ANTHEPROT, obtenido de la red en la dirección <http://antheprot-pbil.ibcp.fr/>. El análisis de la secuencia del gen de la GAP, mediante esta herramienta, se ha llevado a cabo para una serie de parámetros, tales como: la antigenicidad de acuerdo con los algoritmos desarrollados por Parker y colaboradores, la hidrofobicidad, de acuerdo con el algoritmo de Kyte y Von Heijne, la estructura secundaria de acuerdo a un algoritmo resultado de la combinación de los siguientes cinco métodos: el método de GORI, el método de Gibralt, el método de doble predicción (DPM), el método de Homología y el método predictor, y las regiones helicoidales transmembranales se han determinado de acuerdo con los algoritmos de Eisenberg. De acuerdo con los datos obtenidos hemos seleccionado una secuencia de 12 aminoácidos altamente

inmunogénica de la GAP, que se localiza entre los aminoácido 590 al 604 y que presenta la secuencia: <sup>590</sup>-Y-Q-V-Q-Y-T-P-Q-G-D-S-D-<sup>604</sup>, y que se corresponde con la secuencia aminoacídica del extremo C-terminal de la proteína expresada:

|                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>-Tyr-Gln-Val-Gln-Tyr-Thr-Pro-Gln-Gly-Asp-Ser-<br/>Asp-<br/><br/>-Y-Q-V-Q-Y-T-P-Q-G-D-S-D</p> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|

Además, esta secuencia es una secuencia altamente hidrofílica, lo que la hace más accesible al solvente y por tanto más inmunogénica (Niman y col., 1983).

Con ayuda del programa BLAST (Altschul y col., 1997) (<http://pbil.ibcp.fr/NPSA>) hemos comprobado que la secuencia elegida es específica de la proteína GAP, lo cual favorece la elección del péptido; ya que, de no ser así, se expresaría además en otras proteínas y los anticuerpos sintetizados a partir del péptido se unirían tanto a la GAP como a proteínas distintas, falseando con ello los resultados.

Ahora bien, el péptido mandado a sintetizar no ha sido exactamente éste, sino que ha habido que hacerle algunas modificaciones. Para que el péptido, una vez sintetizado, pueda unirse a la proteína KLH, se le ha añadido un resto de cisteína (C) en el extremo N-terminal, y para asegurar la secuencia del posible epítipo se ha duplicado el último resto aminoacídico del

## Discusión

---

péptido, añadiendo por lo tanto, al extremo C-terminal un resto de aspartico (D).

### C-Y-Q-V-Q-Y-T-P-Q-G-D-S-D-D

Para corroborar la pureza del péptido y comprobar su identificación, se ha procedido a su análisis por espectrometría de masas, mediante la técnica de ionización blanda: ionización desorción asistida por láser (MALDI, *Matriz-Assited-Laser-Desorption-Ionization*), y detectando los iones en un detector de tiempo de vuelo (TOF, *Time-of-Fligh*). En el espectro de masas (**Figura-R35**, ver pág. 182), se obtienen dos picos, uno a una relación  $m/z = 1619,65$  que se corresponde con el ión  $MH^+$  y por tanto a una masa molecular de 1618,65 igual a la masa molecular teórica del péptido sintético de 14 aminoácidos (C-Y-Q-V-Q-Y-T-P-Q-G-D-S-D-D), y otro a una relación  $m/z = 3220,18$  que se corresponde con el ión  $2MH^+$  y por tanto con una masa molecular doble de la del primero, 3318.18, y que representa la masa de un dímero del péptido. Este resultado es totalmente lógico, ya que en disolución y en ausencia de sustancias reductoras, al tener el péptido en su extremo N-terminal una Cys libre la formación de un puente disulfuro (-S-S-) es totalmente posible. Los picos que aparecen a bajo peso molecular corresponden a la matriz utilizada para facilitar la volatilización del péptido (ácido sinapínico).

La inmunización en conejos, la obtención de sueros y purificación de inmunoglobulinas anti-péptido-GAP, se ha llevado a cabo por los métodos estándares puestos a punto en nuestro

laboratorio. Estos anticuerpos son los que se han utilizado tanto para detectar GAP como para semicuantificarla en los diferentes tejidos estudiados.

De los resultados obtenidos puede observarse la presencia de anticuerpos anti-GAP tipo-K, y que los anticuerpos obtenidos contra el péptido correspondiente a los 14 aminoácidos del extremo C-terminal de la isoforma K-GAP son específicos, ya que no reconocen al péptido de 14 aminoácidos correspondientes al extremo C-terminal de la isoforma L-GAP. En cuanto a la sensibilidad de los anticuerpos, estos pueden utilizarse hasta una dilución 1:1000, detectándose el péptido hasta concentraciones de 0,01  $\mu\text{g}$ ; pero incluso es posible detectar cantidades de 0,001  $\mu\text{g}$  (utilizando quimioluminiscencia). Una vez determinada la dilución de trabajo, y la sensibilidad de los anticuerpos anti-GAP, se procedió a su uso para detectar la GAP en extractos mitocondriales de enterocitos, riñón y diferentes áreas cerebrales de ratas controles y con DPC, una vez separadas las proteínas por electroforesis PAGE-SDS y posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa.

Así en enterocitos se ha observado que en los animales con DPC hay una clara sobreexpresión de la GAP y que esta sobreexpresión se observa a nivel de las dos bandas, correspondientes a las dos subunidades de la enzima, una de 61 kDa y otra de 57 kDa.

De manera análoga, del estudio de la expresión de la GAP en riñón, se observa que la expresión de la GAP en riñón, tanto en corteza como en médula, también está claramente sobreexpresada, respecto de los niveles encontrados en los controles sin operar y los operados o *sham*.

En el cerebro la expresión de la glutaminasa se ha estudiado en tres áreas diferentes: córtex, ganglios basales y cerebelo, y los resultados obtenidos muestran claramente una sobreexpresión de la enzima GAP en córtex. También existe una sobreexpresión en ganglios basales, mientras que en cerebelo no se observan diferencias claras de sobreexpresión.

#### **4. OXIDACIÓN PROTEICA**

Cada vez está más clara la inducción de estrés oxidativo por concentraciones altas de amonio (**Hazel y Butterworth, 1999**). Entre los biomarcadores de estrés oxidativo más importantes están la oxidación de grupos sulfhidrilos, la nitración de tirosinas y la oxidación de restos aminoacídicos (principalmente de arginina, lisina e histidina) para formar derivados carbonílicos (grupos carbonilos). Generalmente estas modificaciones post-traduccionales conducen a la inactivación de la actividad enzimática, en el caso de enzimas, o a la pérdida de función en los demás casos. Es por ello que la evaluación del nivel de daño oxidativo es de gran importancia, ya que puede ser una señal del deterioro funcional observado en el cerebro durante el desarrollo de la EH. En este estudio nos hemos



centrado en la evaluación de grupos carbonilos como índice de daño oxidativo, en tres áreas distintas del cerebro: cerebelo, cortex y ganglios basales.

La cuantificación de grupos carbonilos se ha llevado a cabo mediante el método de la dinitro-fenil-hidrazina (DNPH), en tres áreas distintas del cerebro: cerebelo, córtex y ganglios basales, de dos maneras: **i)** cuantificación de grupos carbonilos totales, realizados en extractos de proteínas mitocondriales y **ii)** cuantificación de grupos carbonilos sobre proteínas separadas por PAGE-SDS y posterior transferencia a membrana de nitrocelulosa. En el primer procedimiento se cuantifican todos los grupos carbonilos presentes en la muestra y nos da una idea global del nivel de oxidación. Mientras que, en el segundo procedimiento se analiza el grado de oxidación individualmente para cada proteína presente en el extracto, ya que la susceptibilidad de daño oxidativo no tiene porque ser igual para todas las proteínas presentes, existiendo proteínas más y menos resistentes a la oxidación. Este último también nos permite obtener una idea del grado de oxidación total, integrando el valor individual de cada una de las proteínas; pero menos exacto que el obtenido en el análisis directo.

Del análisis de los resultados obtenidos en este estudio podemos ver que, mientras que para la cuantificación total de proteínas (tinción con azul de Coomassie) no se observan diferencias (se ha cargado la misma cantidad de proteína en cada carril), para la cuantificación de grupos carbonilos si se

observan unas diferencias claras. Las proteínas en los ganglios basales son más sensibles a la oxidación que las proteínas del córtex, lo que está totalmente de acuerdo con los resultados obtenidos mediante la valoración de grupos carbonilos totales (ver **Tabla-R25**, pág. 192). De los resultados expuestos en las **Tablas-R25 -R26** se observa, también, que mientras que en cerebelo no hay diferencias estadísticamente significativas, respecto de los niveles de oxidación, cuantificados como grupos carbonilos, entre los animales controles y con DPC éstas si existen de manera clara en córtex y ganglios basales.

El estudio de la oxidación de proteínas mediante electroforesis (PAGE-SDS), Western-blot e inmunodetección mediante anticuerpos anti-DNPH no sólo nos permite semicuantificar el grado de oxidación sino que también nos permite individualmente identificar la sensibilidad o resistencia de cada proteína a la oxidación. Del análisis de la **Figuras-R38** y **-R39** concluimos que las proteínas de las bandas correspondientes a 97, 73 y 68 kDa eran candidatos idóneos para analizar debido a su alta sensibilidad a la oxidación sobre todo en ganglios basales.

Una vez seleccionadas estas bandas, especialmente la banda de 73 kDa, se procedió a su corte ("picking"), digestión *in vitro* con tripsina, elución de los péptidos y análisis de los péptidos por nLC-MS/MS, de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 6.3.2. de Materiales y Métodos. Una vez analizados los pesos moleculares de los péptidos tripticos

obtenidos en la digestión, se ha identificado dicha proteína, con una probabilidad del 87%, como el Factor Inducible por Hipoxia 3- $\alpha$  (HIF 3- $\alpha$ ), como componente mayoritario de la banda, proteína que se produce en situación de hipoxia. Al oxidarse, el HIF 3- $\alpha$  no impide la respuesta del endotelio ante situaciones de hipoxia. Esto podría estar poniendo de manifiesto el papel del endotelio y la importancia de la triada endotelio, astrocito, neurona, en la patogenia de la encefalopatía hepática.

Resumiendo todo lo expuesto, quizás el principal hallazgo del presente trabajo, que corrobora estudios previos de nuestro grupo de los que se han publicado parte de los resultados presentados en esta Tesis (**Romero y col., 2004; Ramos-Guerrero, 2004; Romero y col., 2006**), es que la realización de la DPC en ratas constituye un modelo animal aceptado como modelo de disfunción hepática que evoluciona con EH, ya que: **a)** incrementa la actividad GAP en riñón y duodeno, y este incremento podría contribuir de manera significativa a la hiperamonemia sistémica, y **b)** la actividad GAP está incrementada en el córtex y ganglios basales, y esto podría ser responsable de la hiperamonemia en el cerebro y niveles intra-mitocondriales derivados de la hidrólisis de glutamina, que se mantienen como consecuencia de una correcta desintoxicación por la glutamina-sintetasa.

Durante la segunda mitad del siglo XX, se consideraba que la hiperamonemia derivaba de un mal funcionamiento del ciclo de la urea, que no era capaz de transformar en urea el

amonio procedente de la actividad glutaminasa correspondiente a las bacterias intestinales, y la mayoría de los tratamientos iban dirigidos contra el amonio generado por bacterias desde el colon (Sherlock, 1987). Sin embargo, esta hipótesis no fue universalmente aceptada (Shawcross y Jalan, 2005). Entre los principales datos discordantes podemos citar: i) La hiperamonemia en ratas con DPC es similar tanto en animales libres de gérmenes como en animales en condiciones normales (Nance y Kline, 1971; Warren, 1959) lo que apoya la idea de que la hiperamonemia y la encefalopatía podrían desarrollarse sin la intervención de las bacterias intestinales (Weber y Veach, 1979). ii) Un incremento de la concentración de amonio (hiperamonemia) se ha encontrado en vísceras drenadas por la vena porta y derivadas, amonio procedente, principalmente, de la desamidación de la glutamina. De ahí que, la constatación de un incremento de la actividad GAP en el intestino delgado pueda explicar lo observado, al menos en parte. Además, se ha demostrado que la GAP en el duodeno se incrementa en pacientes cirróticos que sufren una encefalopatía hepática mínima (Romero-Gómez y col., 2004).

Recientemente, también se ha implicado a la amoniogénesis renal en diversas formas de encefalopatía hepática. Así, en pacientes que sufren encefalopatía hepática como consecuencia de un episodio de sangrado de varices, o una sobredosis de diuréticos, la producción de amonio en los riñones parece ser el principal factor implicado en el desarrollo de la encefalopatía hepática (Jalan y Kapoor, 2004). La

Glutamina es filtrada en el glomérulo y se introduce en el lumen de la nefrona. La glutamina filtrada es reabsorbida en el túbulo proximal donde la glutamina se deamida por la GAP. El factor principal en la regulación de la actividad GAP del riñón parece ser el pH. Durante la acidosis metabólica, la actividad GAP se incrementa e induce mayor excreción de amonio (**Curthoys, 2001**). Sin embargo, en la EH, la alcalosis metabólica se observa más frecuentemente que la acidosis, y el incremento de la actividad GAP en el riñón podría ser un mecanismo de protección. Este incremento de GAP podría ser incluso más protector que los eventos asociados a la hiperamonemia sistémica. Esta posibilidad, sin embargo, necesita explorarse en más detalle en futuros estudios.

El amonio que ha alcanzado el cerebro sólo puede ser detoxicado mediante su reacción con el glutamato y transformación en glutamina, en los astrocitos, debido a la predominancia en estas células de la enzima glutamina sintetasa. La Glutamina es un aminoácido osmótico y puede jugar un papel importante en la regulación del volumen celular. Un pico elevado de proporción glutamina-glutamato/creatina es la característica típica de una imagen de cerebro obtenida por resonancia magnética en encefalopatía hepática. A pesar de estos datos, no se ha encontrado incremento de la glutamina sintetasa en cerebro de ratas sometidas a DPC (**Desjardins y col., 1999**).

Además, la administración de mezclas de amino ácidos induce hiperamonemia, eleva el pico de glutamina en el cerebro y se asocia con daños de la función neurofisiológica (**Balata y col., 2003**). También, el uso de metionina-sulfoxamina bloquea la actividad de la glutamina sintetasa y mejora disfunciones inducidas por el amonio, como inflamaciones de astrocitos (**Rama-Rao y col., 2003**). No obstante, la acumulación de glutamina, siguiendo un tratamiento con fármacos no bloqueantes de los receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA), no mostró tener relación con daños neurológicos (**Kosenko y col., 2003**). En efecto, en el cultivo de los astrocitos, el metabolismo de la glutamina se ha asociado a la producción de radicales libres y estrés oxidativo lo que puede representar un mecanismo clave en la neurotoxicidad del amonio (**Jayakumar y col., 2004**). Así, la acumulación de glutamina en el cerebro no es ni un suceso patológico *per se* ni una vía segura de detoxicación del amonio; la acumulación de glutamina en los astrocitos puede considerarse como un "Caballo de Troya" llevando de forma indirecta al daño cerebral. En astrocitos cultivados, inhibidores de la glutaminasa como la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) induce un bloqueo de la actividad glutaminasa y previene la producción de radicales libre y neurotoxicidad inducidas por el amonio (**Norenberg y col., 2004**). La mayoría de la glutamina en los astrocitos se metaboliza por GAP mitocondrial (**Sonnewald y col., 1996**) y, como el amonio podría inducir la producción de radicales libres, la GAP podría estar implicado en la producción de radicales libres.

La inhibición de esta enzima podría ser un nuevo objetivo terapéutico. Sin embargo, se ha informado que el DON inhibe la  $\gamma$ -glutamil-transpeptidasa, incrementa la liberación de glutamina, inhibe el transporte de glutamina en las células y bloquea el transporte de glutamina en las mitocondrias. Todos estos mecanismos podrían inducir una disminución en la cantidad de glutamina disponible para hidrólisis (Rama-Rao y col., 2005).

La inhibición de la GAP por compuestos como el IGF-1, el glutámico, la histidina, la neomicina o el lactitol demuestran que es de suma importancia la glutaminasa como posible diana terapéutica en el tratamiento de la EH.

En conclusión, la enzima GAP tiene un papel importante en intestino y riñones de ratas con DPC. Este aspecto podría jugar un papel importante en la inducción de hiperamonemia y encefalopatía hepática. Además, este estudio muestra un incremento de la actividad GAP y del contenido de glutaminasa en astrocitos del córtex y ganglios basales. La actividad glutaminasa mitocondrial en astrocitos podría estar implicada en la producción de amonio y de glutamato, en la inducción del tránsito de permeabilidad mitocondrial y en la producción de radicales libres que, como productos y/o consecuencias finales del metabolismo de la glutamina, podrían ser responsable, al menos en parte, del efecto patógeno observado en la encefalopatía hepática. Por lo tanto, la glutaminasa podría ser el nuevo objetivo terapéutico en el tratamiento de la encefalopatía hepática.

Posteriores estudios utilizando baterías de inhibidores de GAP, mediante una aproximación basada en la relación estructura-actividad, con los inhibidores empleados en este trabajo, o con el uso de ratones-GAP-knock-out, podrían clarificar el papel del incremento de la expresión de GAP en la fisiopatología de la encefalopatía hepática.

Por otro lado, y en relación con el estrés oxidativo, de todo lo expuesto en los resultados podemos pensar que el mal funcionamiento mitocondrial y el estrés oxidativo y nitrosativo, posiblemente relacionados a través de la permeabilidad mitocondrial, y la excitotoxicidad mediada por glutamato, representa un aspecto fundamental en la patogenia de la EH y la hiperamonemia. Como ya hemos indicado el posible papel del estrés nitrosativo en la neurotoxicidad por amonio ha comenzado a estudiarse recientemente (**Görk y col., 2003**). Sin embargo, el papel de la oxidación de proteínas inducidas por la hiperamonemia en la neurotoxicidad por amonio no ha sido estudiada. En la presente tesis hemos comenzado a estudiar el papel del estrés oxidativo en mitocondrias no-sinaptosomales aisladas de cerebros (áreas cortical y subcortical) de animales con EH inducida por hiperamonemia y su papel con la disfunción mitocondrial, la PM, los PBR, y la excitotoxicidad mediada por glutamato, ya que ello podría proporcionarnos dianas terapéuticas importantes a la hora de tratar los estados de hiperamonemia. Dentro de nuestro estudio de las modificaciones oxidativas, hemos encontrado que las proteínas mitocondriales



obtenidas de astrocitos de ganglios basales son más sensibles a la oxidación que las proteínas mitocondriales aisladas de mitocondrias no sinápticas de córtex y cerebelo.

La mayor sensibilidad a la oxidación de las proteínas mitocondriales de ganglios basales puede deberse a dos causas: a) mayor producción de ROS y/o radicales libres en ganglios basales; b) menor poder antioxidante en córtex y cerebelo.

Del análisis de las proteínas oxidadas, hasta la fecha, sólo hemos identificado una, la proteína HIF-3 $\alpha$ . Se trata del factor inducible por hipoxia 3-alfa (HIF 3- $\alpha$ ), que es inductor de la proteína HIF-1, que se produce en situación de hipoxia. Al oxidarse, el HIF 3- $\alpha$  no impide la respuesta del endotelio ante situaciones de hipoxia. Esto podría estar poniendo de manifiesto el papel del endotelio y la importancia de la tríada endotelio-astrocito, neurona, en la patogenia de la encefalopatía hepática. Pero aún queda mucho trabajo por hacer.

## **VI. CONCLUSIONES**

1. La derivación porto-cava en ratas es un buen modelo de encefalopatía hepática mínima, que mimetiza un estado de hiperamonemia crónica y disfunción hepática, caracterizado por elevación del amonio en sangre, disminución del peso corporal, variación del perfil de aminoácidos en sangre, incrementándose los aminoácidos aromáticos y disminuyendo los aminoácidos ramificados, así como una elevación de los niveles de óxido nítrico.
2. La actividad GAP está aumentada en riñón y duodeno de ratas sometidas a DPC y este incremento contribuye de manera significativa a la hiperamonemia sistémica.
3. La actividad GAP está incrementada en el córtex y ganglios basales, y correlaciona con la formación de grupos carbonilos. El aumento de la actividad GAP en el astrocito provoca hiperamonemia y estrés oxidativo, así como oxidación proteica excesiva, destacando la oxidación del factor regulador de la hipoxia 3-alfa (HIF-3- $\alpha$ ).
4. El tratamiento con IGF-1 evita la pérdida de peso y disminuye la concentración de óxido nítrico en las ratas sometidas a DPC; pero no disminuye la producción de amonio.

## **Conclusiones**

---

5. La inhibición *in vitro* de la glutaminasa podría ayudar a la elección de una batería de compuestos, en la búsqueda de fármacos inhibidores de la glutaminasa para el tratamiento de la encefalopatía hepática, basada en una aproximación de estructura-actividad.

## **VII. BIBLIOGRAFIA**

Aguilar M. A., Minarro J., Felipo V. (2000). Chronic Moderate Hyperammonemia Impairs Active and Passive Avoidance Behavior and Conditional Discrimination Learning in Rats. *Exp. Neurol.*; 161(2):704-713.

Ahboucha S., Desjardins P., Chatauret N., Pomier-Layrargues G., Butterworth R. F. (2003). Normal Coupling Of Brain Benzodiazepine And Neurosteroid Modulatory Sites On The GABA-A Receptor Complex In Human Hepatic Encephalopathy. *Neurochem Int*; 43:551-556.

Albrecht J., Dolinska M. (2001). Glutamine As A Pathogenic Factor In Rat Renal Glutamine Metabolism. *J Nutr*;65:1-5.

Alman R. W., Ehrmantraut W. R., Fazekas J. F., Ticktin H. E. (1956). Cerebral metabolism in hepatic insufficiency. *Am J Med*; 21:843-849.

Als-Nielsen B., Kjaergard L. L., Gluud C. (2003). Benzodiazepine Receptor Antagonists For Acute And Chronic Hepatic Encephalopathy (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*;4. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997). Gapped BLAST And PSI-BLAST: A New Generation Of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids. Res.*; 25, 3389-3402.

## ***Bibliografia***

---

Amodio P, Del Piccolo F, Marchetti P, Angeli P, Iemmolo R, Caregaro L, Merkel C, Gerunda G, Gatta A. (1999). Clinical Features And Survival Of Cirrhotic Patients With Subclinical Cognitive Alterations Detected By The Number Connection Test And Computerized Psychometric Test. *Hepatology*;29:1662-1667.

Apelqvist G., Wikell C., Carlsson B., Hjorth S., Bergqvist P. B., Ahlner J., Bengtsson F. (2000). Dynamic And Kinetic Effects Of Chronic Citalopram Treatment In Experimental Hepatic Encephalopathy. *Clin Neuropharmacol*; 23:304-317.

Assy N., Hochberg Z., Amit T., Shen-Orr Z., Enat R., Baruch Y. (1997). Growth Hormone-Stimulated Insulin-Like Growth Factor (IGF) I And Igfbinding Protein-3 In Liver Cirrhosis. *J. Hepatol.*; 27:796-802.

Azori, I., Minana M. D., Felipe V., Grisolia S. (1989). A Simple Animal Model of Hyperammonemia. *Hepatology*; 10(3):311-314.

Bai G., Rama Rao K. V., Murthy Ch. R. K., et al. (2001). Ammonia Induces The Mitochondrial Permeability Transition In Primary Cultures Of Rat Astrocytes. *J Neurosci Res*; 66:981-991.

Balata S., Damink S. W., Ferguson K., Marshall I., Hayes P. C., Deutz N. E., Williams R., Wardlaw J., Jalan R. (2003). Induced Hyperammonemia Alters Neuropsychology, Brain MR Spectroscopy And Magnetization Transfer In Cirrhosis. *Hepatology*;37:931-939.

Bautista J., Corpas R., Jover M., Parrado J. and Millan F. (2000). Sunflower Protein Hydrolysates For Dietary Treatment Of Patients With Liver Failures. *J. American Oil Chem. Soc.*;77: 121-126.

Bender A. S., Rivera I. V., Norenberg M. D. (1992). Tumor Necrosis Factor Induces Astrocyte Swelling. *Trans Am Neurochem*; 23:113.

Bengtsson F., Bugge M., Brun A., Falck B., Henriksson K. G., Nobin A. (1988). The Impact Of Time After Portacaval Shunt In The Rat On Behavior, Brain Serotonin, And Brain And Muscle Histology. *J. Neurol. Sci.*; 83(1):109-122.

Bengtsson F., Bugge M., Vagianos C., Jeppsson B., Nobin A. (1987). Brain Serotonin Metabolism And Behavior In Rats With Carbon Tetrachloride-Induced Liver Cirrhosis. *Res Exp Med (Berl)*; 187(6):429-438.

Bengtsson F., Nobin A., Falck B., Gage F. H., Jeppsson B. (1986). Portocaval Shunt in the Rat: Selective Alterations in Behavior and Brain Serotonin. *Pharmacol. Biochem. Behav.*; 24(6):1611-1616.

Benjamin I. S., Engelbrecht G. H., Saunders S. J., Hoorn-Hickman R. (1988). Amino Acid Imbalance Following Portal



## ***Bibliografia***

---

Diversion In The Rat. The Relevance Of Nutrition And Of Hepatic Function. *J Hepatol*; 7(2):208-214.

Bernabeu R, Scmitz P, Faillace MP, Izquierdo I, Medina JH. (1996). Hippocampal cGMP And cAMP Are Differentially Involved In Memory Processing Of Inhibitory Avoidance Learning. *NeuroReport*;7:585-588.

Bernabeu R, Schroder N, Quevedo J, Cammaroto M, Izquierdo I, Medina JH. (1997). Further Evidence For The Involvement Of A Hippocampal cGMP/cGMP-Dependent Protein Kinase Cascade In Memory Consolidation. *NeuroReport*;8:2221-2224.

Berstein D. E., Cheicker S. (1959). Simple Technique For Porta-Caval Shunt In The Rat. *Journal of Applied Physiology*; 14:469-473.

Bessman S. P., Bradley J. E. (1955). Uptake Of Ammonia By Muscle; Its Implications In Ammoniogenic Coma. *N Engl J Med*; 253:1143-1147.

Bismuth H., Benhamou J. P., Lataste J. (1963). Experimental Portacaval Anastomosis In The Normal Rat. Technic And Preliminary Results. *Presse Med*; 71:1859-1861.

Blakemore A. H. (1955). The Surgical Treatment Of Cirrhosis Of The Liver. *Journal of Chronical Diseases*; 2:70-75.

Blanc P., Daures J. P., Rouillon J. M. (1992). Lactitol Or Lactulose In The Treatment Of Chronic Hepatic Encephalopathy: Results Of A Meta-Analysis. *Hepatology*; 15:222-228.

Blei A. T., Olafsson S., Therrien G., Butterworth R. F. (1994). Ammonia-Induced Brain Edema And Intracranial Hypertension In Rats After Portacaval Anastomosis. *Hepatology*; 19:1437-1444.

Boer J. E., Oostenbroek R. J., van Dongen J. J., Janssen M. A., Soeters P. B. (1986). Sequential Metabolic Characteristics Following Portacaval Shunt In Rats. *Eur Surg Res*; 18(2):96-106.

Bradford, M.M. (1976). A Rapid And Sensitive Method For The Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*; 72: 248-254.

Bruck R., Aeed H., Shirin H. (1999). The Hydroxyl Radical Scavengers Dimethylsulfoxide And Dimethylthiourea Protect Rats Against Thioacetamide-Induced Fulminant Hepatic Failure. *J Hepatol*; 31:27-38.

Brusilow S. W. (2002). Hyperammonemic Encephalopathy. *Medicine*; 81:240-249.

Bustamante J., Rimola A., Ventura P. J., Navasa M., Cirera I., Reggiardo V., Rodes J. (1999). Prognostic Significance Of Hepatic Encephalopathy In Patients With Cirrhosis. *J. Hepatol.*; 30:890-895.

## ***Bibliografia***

---

Butterfield D. A., Lauderback C. M. (2002). Lipid Peroxidation And Protein Oxidation In Alzheimer's Disease Brain: Potential Causes And Consequences Involving Amyloid Beta-Peptide-Associated Free Radical Oxidative Stress. *Free Rad. Biol. Med*; 32:1050–1060,

Butterfield D. A. (2004). Proteomics: A New Approach To Investigate Oxidative Stress In Alzheimer's Disease Brain. *Brain Res*; 1000:1–7.

Butterfield D. A., Boyd-Kimball D. (2004). Proteomics Analysis In Alzheimer's Disease: New Insights Into Mechanisms Of Neurodegeneration. *Int Rev Neurobiol*; 61:159–88.

Butterworth R. F. (1992). Pathogenesis And Treatment Of Portal Systemic Encephalopathy: An Update. *Dig Dis Sci*; 37:321-327.

Butterworth R. F. (2001). Neurotransmitter Dysfunction In Hepatic Encephalopathy: New Approaches And New Findings. *Metab Brain Dis*; 16:55-65.

Butterworth R. F. (2002). Pathophysiology of hepatic encephalopathy: New look at ammonia. *Metab brain dis*; 17:221-226.

Butterworth R. F. (2003). Pathogenesis Of Hepatic Encephalopathy: New Insights From Neuroimaging And Molecular Studies. *J Hepatol*; 39:278-285.

Castilla-Cortazar I., Garcia M., Muguerza B., Quiroga J., Perez R., Santidrian S. (1997a). Hepatoprotective Effects Of Insulin-Like Growth Factor I In Rats With Carbon Tetrachloride-Induced Cirrhosis. *Gastroenterology*; 113:1682-1691.

Castilla-Cortazar I., Prieto J., Urdaneta E., Pascual M., Núñez M., Zudaire E. (1997b). Impaired Intestinal Sugar Transport In Cirrhotic Rats. Correction By Low Doses Of Insulin-Like Growth Factor I. *Gastroenterology*; 113:1180-1187.

Castilla-Cortazar I., Garcia M., Quiroga J., Diez N., Diez-Caballero F., Calvo A., et al (2000). Insulin-Like Growth Factor-I Reverts Testicular Atrophy In Rats With Advanced Cirrhosis. *Hepatology*; 31:592-600.

Caufriez A., Reding P., Urbain D., Golstein J., Copinschi G. (1991). Insulin-Like Growth Factor I: A Good Indicator Of Functional Hepatocellular Capacity In Alcoholic Liver Cirrhosis. *J Endocrinol Invest*; 14:317-321.

Cemborain A., Castilla-Cortazar I., Garcia M., Quiroga J., Muguerza B., Picardi A. (1998). Osteopenia In Rats With Liver Cirrhosis: Beneficial Effects Of IGF-1 Treatment. *J. Hepatol.*; 28:122-131.

## Bibliografía

---

Chamuleau R. A. (1996). Animals Models Of Hepatic Encephalopathy. *Semin. Liver Dis*; 16 (3): 265-270.

Child CG. (1953). Eck's Fistula. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*; 96:375-376.

Choi J., Forster M. J., McDonald S. R., Weintraub S. T., Carroll C. A., Gracy R. W. (2004). Proteomic Identification Of Specific Oxidized Proteins In Apoe-Knockout Mice: Relevance To Alzheimer's Disease. *Free Radic Biol Med*; 36:1155– 62.

Clemmesen J. O., Kondrup J., Ott P. (2000). Splanchnic And Leg Exchange Of Amino Acids And Ammonia In Acute Liver Failure. *Gastroenterology*; 118:1131-1139.

Cohen SA, Meys M and Tarvin TL (1989). The Pico- Tag Method. A Manual of Avanced Techniques for Amino Acid Análisis, *Millipore Corp.*, Bedford, MA.

Conchillo M., De Knegt R. J., Payeras M., Quiroga J., Sangro B., Herrero J.I., Castilla-Cortazar I., Frystyk J., Flyvbjerg A., Yoshizawa C., Jansen P. L. M., Scharschmidt B., Prieto J. (2005). Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) Replacement Therapy Increases Albumin Concentration In Liver Cirrhosis: Results Of A Pilot Randomized Controlled Clinical Trial. *J Hepatol*; 43:630-636.

Conjeevaram H. S., Mullen K.D., May E. J., McCullough A. J. (1994a). Gender-Dependence Reduction of Spontaneous Motor Activity and Growth in Rats Subjected to Portocaval Shunt. *Hepatology*; 19(2):381-388.

Conjeevaram H. S., Nagle A., Katz A., Kaminsky-Russ K., McCullough A. J., Mullen K. D. (1994b). Reversal Of Behavioral Changes In Rats Subjected To Portacaval Shunt With Oral Neomycin Therapy. *Hepatology*; 19(5):1245-1250.

Conn H.O., Bircher (1994). Hepatic Encephalopathy. *J. Hepatology*; 32 (supp1): 171-180.

Connert S., Stremmel W., Elsing C. (2003). Procalcitonin Is A Valid Marker Of Infection In Decompensated Cirrhosis. *Z Gastroenterol*; 41:165-170.

Cooke R. M., Harvey T. S., Campbell I.D. (1991). *Biochemistry*; 30: 5484-91.

Cooper A. J., Lai J. C. (1987a). Cerebral Ammonia Metabolism In Normal And Hyperammonemic Rats. *Neurochem Pathol*; 6(1-2):67-95.

Cooper A. J., Plum F. (1987b). Biochemistry And Physiology Of Brain Ammonia. *Physiol Rev*; 67:440-519.

## ***Bibliografia***

---

Cordoba J., Alonso J., Rovira A., Jacas C., Sanpedro F., Castells L., Vargas V., Margarit C., Kulisevsky J., Esteban R., Guardia J. ( 2001). The Development Of Low-Grade Cerebral Edema In Cirrhosis Is Supported By The Evolution Of <sup>1</sup>H-Magnetic Resonance Abnormalities After Liver Transplantation. *J Hepatol*; 35:598-604.

Coy D. L., Srivastava A., Gottstein J., Butterworth R. F., Blei, A. T. (1991). Postoperative Course After Portocaval Anastomosis in Rats Is Determined by the Portocaval Pressure Gradient. *Am. J. Physiol.*; 261(6 Pt 1):G1072-G1078.

Coy D. L., Mehta R., Zee P., Salchli F., Turek F. W., Blei A. T. (1992). Portal-Systemic Shunting And The Disruption Of Circadian Locomotor Activity In The Rat. *Gastroenterology*; 103(1):222-228.

Cuneo R. C., Hickman P. E., Wallace J. D., Teh B. T., Ward G., Veldhuis J. D. (1995). Altered Endogenous Growth Hormone Secretory Kinetics And Diurnal GH-Binding Protein Profiles In Adults With Chronic Liver Disease. *Clin Endocrinol*; 43:265-275.

Curthoys N.P., Kuhlenschmidt T. (1975 Mar). Phosphate-Independent Glutaminase From Rat Kidney. Partial Purification And Identity With Gamma-Glutamyltranspeptidase. *J. Biol. Chem.*; 250: 2099 - 2105.

Curthoys, N. P., and Watford, M. (1995). Regulation Of Glutaminase Activity And Glutaminase Metabolism. *Annu. Rev. Nutr*,15:133-159.

Curthoys N.P. (2001). Role Of Mitochondrial Glutaminase In Rat Renal Glutaminase Metabolism. *J Nutr*,131:2491S-2495S;discussion2496S2497S.

Dalle-Done I., Scaloni A., Giustarini D. (2005). Proteins As Biomarkers Of Oxidative/Nitrosactive Stress In Disease: The Contribution Of Redox Proteomics. *Mass Spectrom Rev*, 24:55-99.

Das A., Dhiman R.K., Saraswat V.A., Verma M., Naik S.R. (2001). Prevalence And Natural History Of Subclinical Hepatic Encephalopathy In Cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*, 16(5):531-535.

Daughaday W. H., Rotwein P. (1989). Insulin-Like Growth Factors I And II. Peptide, Messenger Ribonucleic Acid And Gene Structures, Serum, And Tissue Concentrations. *Endocr. Rev.*; 10:68-91.

Dean R. T., Fu S., Stocker R., Davies M. J. (1997). Biochemistry And Pathology Of Radical-Mediated Protein Oxidation. *Biochem. J*; 324:1-18.



## Bibliografia

---

Deléage G., Roux B. (1987). An Algorithm For Protein Secondary Structure Prediction Based On Class Prediction. *Prot. Eng.*; 1, 289-294.

Desjardins P., Rao K. V., Michalak A., Rose C., Butterworth R. F. (1999). Effect Of Portacaval Anastomosis On Glutamine Synthetase Protein And Gene Expression In Brain, Liver, And Skeletal Muscle. *Metab Brain Dis*;14:273-280.

Donaghy A., Ross R., Wicks C., Hughes S. C., Holly J., Gimson A. (1997). Growth Hormone Therapy In Patients With Cirrhosis. *Gastroenterology*; 113:1617-1622.

Dunn C. W., Horto, J. W., Megison S. M., Vuitch M. F. (1991). Contribution of Portal Systemic Shunt to Kupffer Cell Dysfunction in Obstructive Jaundice. *J Surg. Res.*; 50(3):234-239.

Eisenberg, D., Weiss R. M., Terwilliger T. C. (1982). The Helical Hydrophobic Moment: A Measure Of The Amphiphilicity Of A Helix. *Nature*; 299, 371-374.

Eisenthal R., Cornish-Bowden A. (1974). *Biochem. J.*; 139: 715-720.

Elgadi K. M., Meguid R. A., Qian M., Souba W. W., Abcouwer S. F. (1999 Aug). Cloning And Analysis Of Unique Human Glutaminase Isoforms Generated By Tissue-Specific Alternative Splicing. *Physiol Genomics*; 31; 1(2):51-62.

Erceg S, Monfort P, Cauli O, Montoliu C, Llansola M, Piedrahita B. and Felipe V. Role Of Extracellular cGMP And Of Hyperammonemia In The Impairment Of Learning In Rats With Chronic Hepatic Failure: Therapeutic Implications. *Neurochemistry International*; 48: 441-446.

Felipo V., Butterworth R. F. (2002). Neurobiology Of Ammonia. *Prog Neurobiol*; 67: 259-279.

Ferenci P., Pappas S. C., Jones E. A. (1982). L-Leucine Prevents Ammonia-Induced Changes in Glutamate Receptors in the Brain and in Visual Evoked Potentials (Abstract). *Hepatology* ;2:708.

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 11<sup>th</sup> World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *J. Hepatology*; 35:716-721.

Fountoulakis M. (2004). Application Of Proteomics Technologies In The Investigation Of The Brain. *Mass Spectrom Rev*; 23:231-58.

Frishman D., Argos P. (1996 Feb). Incorporation Of Non-Local Interactions In Protein Secondary Structure Prediction From The Amino Acid Sequence. *Protein Eng.*; 9(2):133-42.

## Bibliografia

---

Funovics J. M., Cummings M. G., Shuman L., James J. H., Fischer J. E. (1975). An Improved Nonsuture Method For Portacaval Anastomosis In The Rat. *Surgery*, 77(5):661-664.

Garnier J., Osguthorpe D.J., Robson B. (1978). Analysis Of The Accuracy And Implications Of Simple Methods For Predicting The Secondary Structure Of Globular Proteins. *J. Mol. Biol.*; 120, 97-120.

Gibrat J. F., Garnier J., Robson B. (1987). Further Developpments Of Protein Secondary Structure Prediction Using Information Theory. *J. Mol. Biol.*; 198, 425-443.

Gitlin N., Lewis D.C., Hinkley L. (1986). The diagnosis and prevalence of subclinical hepatic encephalopathy in apparently healthy, ambulant, non-shunted patients with cirrhosis. *J. Hepatology*; 3: 75-82.

Good D. W., DuBose T. D. Jr. (1987). Ammonia transport by early and late proximal convoluted tubule of rat. *J Clin Invest*, 79:684-691.

Görk B., Foster N., Reinehr. (2003). Benzodiazepine-Induced Protein Tyrosine Nitration In Astrocytes. *Hepatology*, 37:334-342.

Grande L., Ramos Guerrero R., Collantes de Teran L., Camacho I., Corpas R., Díaz D., Bautista J. D., Romero Gómez M. (2003). Actividad Glutaminasa Mitocondrial Del Enterocito En La Encefalopatía Hepática Incipiente. *Gastroenterol Hepatol*; 26(Suppl 2):67.

Gregorios J. B., Mozes L. W., Norenberg M. D. (1985). Morphologic effects of ammonia on primary astrocyte cultures. II. Electrón microscopic studies. *J Neuropathol Exp Neurol*; 44:404-414.

Greve J. W., Gouma D. J., Soeters P. B., Buurman 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.

Groeneweg M., Quero J.C. De Bruijn I et al. (1998). Subclinical Hepatic Encephalopathy Impairs Daily Functioning. *Hepatology*; 28: 45-49.

Groeneweg M., Moerland W., Quero J.C., Hop W.C.J., Krabbe PF, Shalm S.W. (2000). Screening Of Subclinical Hepatic Encephalopathy. *J Hepatol*; 32:748-753.

Gutierrez A., Khan Z. U., Miralles C. P., Mehta A. K., Ruano D., Araujo F., Vitorica J., De Blas A. L. (1997 Apr) . GABAA Receptor Subunit Expression Changes In The Rat Cerebellum

***Bibliografia***

---

And Cerebral Cortex During Aging. *Brain Res Mol Brain Res*; 45(1):59-70.

Hahn M., Massen O., Nenecki M., Pavlov J. (1893). Die Eck'She Fistel Zwischen Der Unteren Hohlvene Und Der Pfortader Und Ihre Folgen Für Den Organismus. *Arch Exp Pathol Pharm*; 32: 161-210.

Hamm L. L., Simon E. E. (1990). Ammonia Transport In The Proximal Tubule. *Miner Electrolyte Metab*; 16:283-290.

Hartmann I.J., Groeneweg M., Quero J.C., Beijeman S.J., de Man R.A., Hop W.C. (2000). The Prognostic Significance Of Subclinical Hepatic Encephalopathy. *Am J Gastroenterol*; 95(8):2029-2034.

Haser W.G., Shapiro R.A., Curthoys N.P. (1985). Comparison Of The Phosphate-Dependent Glutaminase Obtained From Rat Brain And Kidney. *Biochem J.* ;229: 399-408.

Haussinger D., Kircheis G., Fischer R., Schliess F., vom Dahl S. (2000). Hepatic Encephalopathy In Chronic Liver Disease: A Clinical Manifestation Of Astrocyte Swelling And Low-Grade Cerebral Edema?. *J Hepatol*; 32:1035-1038.

Haussinger D., Schliess F., Kircheis G. (2002). Pathogenesis Of Hepatic Encephalopathy. *J Gastroenterol Hepatol*; 17:S256-S259.

Hawkins R., Jessy J., Mans A., Chedid A., DeJoseph M. (1994). Neomycin Reduces The Intestinal Production Of Ammonia From Glutamine. Hepatic Encephalopathy, Hyperammonemia, And Ammonia Toxicity. Edited by V. Felipo and S. Grisola, Plenum Press, New York.

Hazell A. S., Butterworth R. F. (1999). Hepatic Encephalopathy: An Update Of Pathophysiologic Mechanisms. *Proc Soc Exp Biol Med*; 222:99-112.

Heini H. G., Gebhardt R., Brecht A., Mecke D. (1987) Purification And Characterization Of Rat Liver Glutaminase. *Eur. J. Biochem.*; 162 541-546.

Hermenegildo C., Montoliu C., Llansola M., Munoz M.D., Gaztelu J. M., Minana 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. *Eur. J Neurosci.*;10(10):3201-3209.

Herneth A. M., Steindl P., Ferenci P., Roth E., Hörtnagl H. (Nov 1998). Role Of Tryptophan In The Elevated Serotonin-Turnover In Hepatic Encephalopathy. *J Neural Transmission*;105(8-9):975-986.

## ***Bibliografia***

---

Herz R., Sautter V., Robert F., Bircher J. (1972). The Eck Fistula Rat: Definition Of An Experimental Model. *Eur J. Clin. Invest.*; 2(6):390-397.

Hu S., Sheng W. S., Ehrlich L. C., Peterson P. K., Chao C. C. (2000). Cytokine Effect On Glutamate Uptake By Human Astrocytes. *Neuroimmunomodulation*; 7:153-159.

Huang L. T., Hsieh C. S., Chou M. H., Chuang J.H., Liou C. W., Tiao M. M., Lai M. C. (2004). Obstructive Jaundice in Rats: Cause of Spatial Memory Deficits With Recovery After Biliary Decompression. *World J Surg.*; 28(3):283-287.

Imbert G., Saudou F., Yvert G., Devys D., Trottier Y., Garnier J. M., Weber C., Mandel J. L., Cancel G., Abbas N., Durr A., Didierjean O., Stevanin G., Agid Y., Brice A. (1996 Nov). Cloning Of The Gene For Spinocerebellar Ataxia 2 Reveals A Locus With High Sensitivity To Expanded CAG/Glutamine Repeats. *Nat Genet*; 14(3):285-291.

Isteindl P.E., Gottstein J., and Blei A. T. (1995). Disruption of Circadian Locomotor Activity in Rats After Portocaval Anastomosis Is Not Gender Dependent. *Hepatology*; 22(6):1763-1768.

Jalan R., Kapoor D. (2003). Enhanced Renal Ammonia Excretion Following Volume Expansion In Patients With Well Compensated Cirrhosis Of The Liver. *Gut*; 52:1041-1045.

Jalan R., Olde Damink S. W. M., Lee A., Hayes P. C., Williams R. (2003). Brain Production Of Inflammatory Cytokines In Patiensia With Acute Liver Failure And Uncontrolled Intracranial Hypertension. *Hepatology* 38:548A.

Jalan R., Kapoor D. (2004). Reversal Of Diuretic-Induced Hepatic Encephalopathy With Infusion Of Albumin But Not Colloid. *Clin Sci (Lond)*;106:467-474.

James L. A., Lunn P. G., Elia M. (1988). Glutamine Metabolism In The Gastrointestinal Tract Of The Rat Assesed By The Relative Activity Of Glutaminase (E.C. 3.5.1.2) And Glutamine Synthetase (E.C. 6.3.1.2). *Br J Nutrition*; 79:365-372.

James L. A., Lunn P. G., Middleton S., Elia M. (1998 Mar). Distribution Of Glutaminase And Glutamine Synthetase Activities In The Human Gastrointestinal Tract. *Clin Sci (Lond)*; 94(3):313-319.

Jayakumar A. R., Panickar K., Norenberg M. D. (2002a). Peripheral Benzodiazepine Receptor Ligands Induce The Formation Of Free Radicals In Cultured Neural Cells. *J Neurochem*; 83:1226-1234.

Jayakumar A. R., Rama Rao K. V., Bai G., Norenberg M. D. (2002b). Role Of Oxidative Stress In The Ammonia-Induced



## Bibliografía

---

Mitochondrial Permeability Transition In Cultured Astrocytes. *J Neurochem*; 81(Suppl 1):109.

Jayakumar A. R., Rama Rao K. V., Schousboe A., Norenberg M. D. (2004). Glutamine-Induced Free Radical Production In Cultured Astrocytes. *Glia*;46:296-301.

Jerkins A. A., Steele R. D. (1988). Diet Composition And Surgical Technique Influence The Postoperative Recovery Of Portacaval Shunted Rats. *Hepatology*; 8(4):855-860.

Jones J. I., Clemmons D. R. (1995). Insulin-Like Growth Factors And Their Binding Proteins: Biological Actions. *Endocr. Rev.*; 16:3-34.

Jover R., Rodrigo R., Felipe V., Insausti R., Sáez-Valero J., García-Ayllón M.J., 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). Liver Failure And Liver Disease. Brain Edema And Inflammatory Activation In Bile Duct Ligated Rats With Diet-Induced Hyperammonemia: A Model Of Hepatic Encephalopathy In Cirrhosis. *Hepatology*;43:1257-1266.

Kim J. S., He L., Qian T., Lemasters J. J. (2003). Role Of The Mitochondrial Permeability Transition In Apoptotic And Necrotic Death After Ischemia/Reperfusion Injury To Hepatocytes. *Curr Mol Med*; 3:527-535.

Kircheis G., Nilius R., Held C., Berndt H., Buchner M., Gortelmeyer R., Hendricks R., Kruger B., Kuklinski B., Meister H., Otto H. J., Rink C., Rosch W., Stauch S. (1997). Therapeutic Efficacy Of L-Ornithine-L-Aspartate Infusions In Patients With Cirrhosis And Hepatic Encephalopathy: Results Of A Placebo-Controlled, Double-Blind Study. *Hepatology*; 25:1351-1360.

Kircheis G., Wettstein M., Dahl S., Haussinger D. (2002). Clinical Efficacy Of L-Ornithine-L-Aspartate In The Management Of Hepatic Encephalopathy. *Metab Brain Dis*; 17:453-462

Klose J, Kobalz U (1995). Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*;16:1034–1059.

Klose J. (1999). Large-Gel 2-D Electrophoresis. *Methods Mol Biol*;112: 147-172

Knecht K., Michalak A., Rose C., Rothstein J. D., Butterworth R. F. (1997). Decreased Glutamate Transporter (GLT-1) Expression In Frontal Cortex Of Rats With Acute Liver Failure. *Neurosci Lett*; 229:201-203.

Kosenko E., Venediktova N., Kaminsky Y., Montoliu C., Felipo V. (2001). Preparation And Handling Of Brain Mitochondria Useful To Study Uptake And Release Of Calcium. *Brain Research Protocols*;7(3):248-54.

## ***Bibliografia***

---

Kosenko E., Llansola M., Montoliu C., Monfort P., Rodrigo R., Hernandez-Viadel M., Erceg S., Sanchez-Perez A. M., Felipe V. (2003). Glutamine Synthetase Activity And Glutamine Content In Brain: Modulation By NMDA Receptors And Nitric Oxide. *Neurochem Int*; 43:493-499.

Kountouras J., Billing B. H., Scheuer P. J (1984). Prolonged Bile Duct Obstruction: a New Experimental Model for Cirrhosis in the Rat. *Br. J. Exp. Pathol.*; 65(3):305-311.

Krahenbuhl S, Weber FL Jr, Brass EP. (1991). Decreased hepatic glycogen content and accelerated response to starvation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology*;14:1189-95.

Kvamme E., Torgner IA., Roberg (2001). Kinetic And Localization Of Brain Phosphate Activated Glutaminase. *Journal of Neuroscience*; 66: 951-958.

Kyte J., Doolittle R. F. (1982). A Simple Method For Displaying The Hydrophobic Character Of A Protein. *J. Mol. Biol.*; 157, 105-132.

Laake J. H., Takumi Y., Eidet J., Torgner I. A., Roberg B., Kvamme E., Ottersen O. P. (1999). Postembedding Immungolp Labelling Reveals Subcellular Localization And Pathway-Specific

Enrichment Of Phosphate Activated Glutaminase In Rat Cerebellum. *Neuroscience*;88:1137-1151.

Labow B., Souba W., Abcouwer S. (2001 Sep) Mechanisms Governing The Expresión Of The Encimes Of Glutamione Metabolism-Glutaminase And Glutamine Synthetase. *J Nutr*, 131 (9): 2467S-74S.

Laterza O. F., Curthoys N. P. (2000). Specificity And Functional Análisis Of The pH-Responsive Element Within Renal Glutaminase mRNA. *Am. J. Physiol*; 278: F970-F977.

Le Roith D. (1997). Insulin-Like Growth Factors. *N. Engl. J. Med.*; 336: 633-640.

Lee S. H., Fisher B. (1961). Portacaval Shunt In The Rat. *Surgery*; 50:668-672.

Levin J. M., Robson B., Garnier J. (1986). An Algorithm For Secondary Structure Determination In Proteins Based On Sequence Similarity. *FEBS Lett.*; 205, 303-308.

Levine, RL., Williams, J.A., Stadtman, E. and Schacter, E. (1994). *Methods in Enzymol*;233:346-357.

Liu XH, Suh DY, Call J, Prestwich GD. (Mar 2004). Antigenic Prenylated Peptide Conjugates And Polyclonal Antibodies To Detect Protein Prenylation. *Bioconjug Chem.* Apr;15(2):270-277.

Lockwood A. H., McDonald J. M., Reiman R. E., Gelbard A. S., Laughlin J. S., Duffy T. E., Plum F. (1979). The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia. *J Clin Invest*; 63:449-460.

Lockwood A. H., Yap E. W., Wong W. H. (1991). Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab*; 11:337-341.

Lund P. (1988). L-Glutamine And L-Glutamate: UV-Method With Glutaminase And Glutamate Deshydrogenase. *Methods of Enzymatic Analysis*, Volumen 8, ed H.U. Bermeier, Weinheim; 357-363.

Maddison J. E. (1988). Canine Congenital Portosystemic Encephalopathy. *Aust. Vet. J.*; 65(8):245-249.

Maddison J. E., Dodd P. R., Morrison M., Johnston G. A., Farrell G. C. (1987). Plasma GABA, GABA-Like Activity And The Brain GABA-Benzodiazepine Receptor Complex In Rats With Chronic Hepatic Encephalopathy. *Hepatology*; 7(4):621-628.

Marlene Tsao and E. Otter. (1999). Quantification Of Glutamine In Proteins And Peptides Using Enzymatic Hydrolysis And Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry*; 269: 143-148.

Master S., Gottstein J., Blei A. T. (1999). Cerebral Blood Flow And The Development Of Ammonia-Induced Brain Edema In Rats After Portacaval Anastomosis. *Hepatology*; 30:876-880.

McCullough AJ, Tavill AS. (1991). Disordered energy and protein metabolism in liver disease. *Semin Liver Dis*;11:265–277.

McDemmott W., Adams R. (1954). Episodic Stupor Associated With An Eck Fistula In The Human With Particular Reference To The Metabolism Of Ammonia. *J Clin Invest*; 33: 1-9.

McLean E. K., McLean A. E., Sutton P. M. (1969). Instant cirrhosis. An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. *Br J Exp Pathol*; 50(5):502-506.

Miles A. M. (1996). *Methods Enzimology*.

Miyazaki T, Matsuzaki Y, Karube M, Bouscarel B, Miyakawa S and Tanaka N. (2003). Amino Acid Ratios In Plasma And Tissues In A Rat Model Of Liver Cirrhosis Before And After Exercise. *Hepatology Research*, 27:230-237.

Muckart D. J., Bhagwanjee S. (1997). Definitions Of The Systemic Inflammatory Response Syndrome And Allied Disorders In Relation To Critically Injured Patients. *Crit Care Med*; 25:1789-1795.

## ***Bibliografia***

---

Mullen K. D., Birgisson S., Gacad R.C., Conjeevaram H. (1994). Animals Models Of Hepatic Encephalopathy And Hyperammonemia. In: Felipe V, Grisolia S, editors. hepatic encephalopathy, hyperammonemia and ammonia toxicity. *New York: Plenum Press*; 1-10.

Mullen K. D., McCullough A. J. (1989). Problems With Animal Models Of Chronic Liver Disease: Suggestions For Improvement In Standardization. *Hepatology*; 9(3):500-503.

Murthy C. R., Rama Rao K. V., Bai G., Norenberg M. D. (2001). Ammonia-Induced Production Of Free Radicals In Primary Cultures Of Rat Astrocytes. *J Neurosci Res*; 66(2):282-288.

Nance F.C., Kline D.G. (1971). Eck'S Fistula Encephalopathy In Germ Free Dogs. *Ann Surg*;174:856-862.

Nicolao F., Efrati C., Masini A., Merli M., Attili A. F., Riggio O. (2003). Role Of Determination Of Partial Pressure Of Ammonia In Cirrhotic Patients With And Without Hepatic Encephalopathy. *J Hepatol*; 38:441-446.

Niman HL, Houghten RA, Walker LE, Reisfeld RA, Wilson IA, Hogle JM, Lerner RA. (Aug 1983). Generation Of Protein-Reactive Antibodies By Short Peptides Is An Event Of High Frequency: Implications For The Structural Basis Of Immune Recognition. *Proc Natl Acad Sci USA*;80(16):4949-53.

Nissim I. (1999 Oct). Newer Aspects Of Glutamine/Glutamate Metabolism: The Role Of Acute PH Changes. *Am J Physiol*; 277(4 Pt 2):F493-7.

Norenberg M. D., Martínez-Hernández A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res*; 161:303-310.

Norenberg M. D. (1981) The Astrocyte In Liver Disease. In: Fedoroff S, Hertz L, eds. *Advances in Cellular Neurobiology*. New York: Academic Press; vol 2:303-352.

Norenberg M. D. (1987). The Role Of Astrocytes In Hepatic Encephalopathy. *Neurochem Pathol*; 6:13-33.

Norenberg M. D. (2001). Astrocytes And Ammonia In Hepatic Encephalopathy. In: de Vellis J, ed. *Astrocytes in the Aging Brain*. Totowa, NJ: Humana Press; 477-496.

Norenberg M. D., Jayakumar A. R., Rao K. V. R. (2004a). Oxidative Stress In The Pathogenesis Of Hepatic Encephalopathy. *Metabol Brain Disease*; 19:313-329.

Norenberg M. D., Rama Rao K. V. R., Jayakumar A. R. (2004b). Ammonia Neurotoxicity And The Mitochondrial Permeability Transition. *J Bioenerg Biomembr*;36:303-307.



## ***Bibliografía***

---

Numata M. (1983). A Modified Technique To Make A Portacaval Shunt In Rats. *Microsurgery*; 4(4):243-244.

Nuñez de Castro I. (2001). *Enzimología*. Ediciones Pirámide.

O'Carroll R. E., Hayes P. C., Ebmeier K. P., Dougall N., Murray C., Best J. J., Bouchier I. A., Goodwin G. M. (1991). Regional cerebral blood flow and cognitive function in patients with chronic liver disease. *Lancet*; 337:1250-1253.

Olalla L., Gutierrez A., Campos J. A., Khan Z. U., Alonso F. J., Segura J. A., Marquez J., Aledo J. C. (2002 Oct). Nuclear Localization Of L-Type Glutaminase In Mammalian Brain. *J Biol Chem*. 11;277(41):38939-44. Epub 2002 Aug 05.

Olde Damink S. W., Jalan R., Deutz N. E., Redhead D. N., Dejong C. H., Hynd P., Jalan R. A., Hayes P. C., Soeters P. B. (2003). The Kidney Plays A Major Role In The Hyperammonemia Seen After Simulated Or Actual GI Bleeding In Patients With Cirrhosis. *Hepatology*; 37:1277-1285.

Olde Damink S. W., Jalan R., Redhead D. N., Hayes P. C., Deutz N. E., Soeters P. B. (2002). Interorgan Ammonia And Amino Acid Metabolism In Metabolically Stable Patients With Cirrhosis And A TIPSS. *Hepatology*; 36:1163-1171.

Ong J. P., Aggarwal A., Krieger D., Easley K. A., Karafa M. T., Van Lente F., Arroliga A. C., Mullen K. D. (2003). Correlation

Between Ammonia Levels And The Severity Of Hepatic Encephalopathy. *Am J Med*; 114:188-193.

Parker J. M. R., Guo D., Hodges, R. S. (1986). New Hydrophilicity Scale Derived From High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation Of Predicted Surface Resi-Dues With Antigenicity And X-Ray-Derived Accessible Sites. *Biochemistry*; 25, 5425-5432.

Patarroyo M. E., Romero P., Torres M. L., Clavijo P., Moreno A., Martínez A., Rodríguez R., Guzman F., Cabezas E. (1987 Aug). Induction Of Protective Immunity Against Experimental Infection With Malaria Using Synthetic Peptides. *Nature*; 13-19;328(6131):629-32.

Pérez-Gómez C., Campos-Sandoval J. A., Alonso F. J., Segura J. A., Manzanares E., Ruiz-Sánchez P., González M. E., Márquez J., Matés J. M. (2005). Co-Expression Of Glutaminase K And L Isoenzymes In Human Tumour Cells. *Biochem. J.*;386:535-542.

Philips G., Schwartz R., Gabuzda G., Davidson C. (1952). The Syndrome Of Impending Hepatic Coma In Patients With Cirrhosis Of The Liver Given Certain Nitrogenous Substances. *New Engl J Med*; 247: 239-246.

Picardi A., Costa de Oliveira A., Muguerra B., Tosar A., Quiroga J., Castilla-Cortazar I. (1997). Low Doses Of Insulin-Like Growth

***Bibliografía***

---

Factor-I Improve Nitrogen Retention And Food Efficiency In Rats With Early Cirrhosis. *J. Hepatol*; 26:191–202.

Pilbeam C. M., Anderson R. M., Bhathal, P. S. (1983a). The Brain In Experimental Portal-Systemic Encephalopathy. I. Morphological Changes in Three Animals Models. *J Pathol.*; 140(4):331-345.

Pilbeam C. M., Anderson R. M., Bhathal P. S. (1983b). The Brain In Experimental Portal-Systemic Encephalopathy. II. Water and Electrolyte Changes. *J. Pathol.*; 140(4):347-355.

Plauth M., Roske A. E., Romaniuk P., Roth E., Ziebig R., Lochs H. (2000). Post-Feeding Hyperammonaemia In Patients With Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt And Liver Cirrhosis: Role Of Small Intestinal Ammonia Release And Route Of Nutrient Administration. *Gut*; 46:849-855.

Prior R. L., Visek W. J. (1972). Effects Of Urea Hydrolysis On Tissue Metabolite Concentrations In Rats. *Am. J. Physiol.*; 223(5):1143-1149.

Proctor E., Chatamra K. (1982). High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology*; 83(6):1183-1190.

Proctor E., Chatamra K. (1984). Standardized Micronodular Cirrhosis In The Rat. *Eur. Surg. Res.*; 16(3):182-186.

Rama Rao V. L., Audet R. M., Butterworth R. F. (1997). Increased Neuronal Nitric Oxide Synthase Expression In Brain Following Portacaval Anastomosis. *Brain Res*; 765:169-172.

Rama Rao K. V., Norenberg M. D. (2001). Cerebral Energy Metabolism In Hepatic Encephalopathy And Hyperammonemia. *Metab Brain Dis*; 16:67-78.

Rama Rao V. L. (2002). Nitric Oxide In Hepatic Encephalopathy And Hyperammonemia. *Neurochem Intern*; 41:161-170.

Rama Rao K. V., Chen M., Simard J. M., Norenberg M. D. (2003a). Increased Aquaporin-4 Expression In Ammonia-Treated Cultured Astrocytes. *Neuroreport*; 14:2379-2382.

Rama Rao K. V., Chen M., Simard J. M., Norenberg M. D. (2003b). Supresión Of Ammonia-Induced Astrocyte Swelling By Cyclosporin A. *J Neurosci Res*; 74:891-897.

Rama Rao K. V., Jayakumar A. R., Norenberg M. D. (2003c). Ammonia Neurotoxicity: Role Of The Mitochondrial Permeability Transition. *Metabolic Brain Disease*; 18:113-127.

Rama Rao K. V., Jayakumar A. R., Norenberg M. D. (2003d). Induction Of The Mitochondrial Permeability Transition In Cultured Astrocytes By Glutamine. *Neurochem Int*; 43:517-523.

## ***Bibliografía***

---

Rama Rao K. V., Jayakumar A. R., Norenberg M. D. (2005). Differential Response Of Glutamine In Cultured Neurons And Astrocytes. *J. Neurosc Res*; 79:193-199.

Ramos-Guerrero R. (2004). Papel de la glutaminasa fosfato dependiente (EC 3.5.1.2) en la patogenia de la Encefalopatía Hepática. Tesis Doctoral Universidad de Sevilla.

Reinhard W. O., Bazell A. H. (1946). One Stage Functional Hepatectomy In The Rat. *Proceedings of the Society of Experimental and Biologycal Medicine*; 62:270.

Reverter M., Lundh T., Lindberg J. E. (1997). Determination Of Free Amino Acids In Pig Plasma By Precolumn Derivatization With 6-N-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate And High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography B*; 696:1-8.

Roberg B., Torgner I. A., Laake J., Takumo Y., Ottersen O., Kvamme E. (2000). Properties And Submitochondrial Localization Of Pig And Rat Renal Phosphate-Activated Glutaminase. *Am J Physiol Cell Physiol*; 279: C648-C657.

Rodrigo R., Jover R., Candela A., Compan A., Saez-Valero J., Erceg S., Felipo V. (2005). Bile Duct Ligation Plus Hyperammonemia In Rats Reproduces The Alterations In The Modulation Of Soluble Guanylate Cyclase By Nitric Oxide In Brain Of Cirrhotic Patients. *Neuroscience*;130(2):435-443.

Rodrigo R., Felipe V. (2006). Brain Regional Alterations In The Modulation Of The Glutamate-Nitric Oxide-cGMP Pathway In Liver Cirrhosis. Role Of Hyperammonemia And Cell Types Involved. *Neurochem Int*;48(6):472-477.

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. *Am J Gastroenterol*; 96:2718-2723.

Romero-Gomez M., Grande L., Camacho I., Benitez S., Irlés J. A., Castro M. (2002). Altered Response To Oral Glutamine Challenge As Prognostic Factor For Overt Episodes In Patients With Minimal Hepatic Encephalopathy. *J Hepatol*; 37:781-787.

Romero-Gomez M., Grande L., Camacho I. (2004a). Prognostic Value Of Altered Oral Glutamine Challenge In Patients With Minimal Hepatic

Romero-Gómez M., Ramos-Guerrero R., Grande L., de Terán L.C., Corpas R., Camacho I., Bautista J.D. (2004b). Intestinal Glutaminase Activity Is Increased In Liver Cirrhosis And Correlates With Minimal Hepatic Encephalopathy. *J Hepatol*;41:49-54.

Romero-Gómez M., Jover M., Díaz-Gómez D., Collantes de Terán L., Rodrigo R., Camacho I., Echevarría M., Felipe V.,

## Bibliografia

---

Bautista J.D. (2006). Phosphate-Activated Glutaminase Activity Is Enhanced In Brain, Intestine And Kidneys Of Rats Following Portacaval Anastomosis. *World J Gastroenterol*;12(15):2406-2411.

Roughneen P. T., Gouma D. J., Kulkarni A. D., Fanslow W. F., Rowlands B. J. (1986). Impaired Specific Cell-Mediated Immunity n Experimental Biliary Obstruction and Its Reversibility by Internal Biliary Drainage. *J Surg. Res.*; 41(2):113-125.

Sandhu M. S., Dunger D. B., Giovannucci E. L.(2002). Insulin, Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I), IGF Binding Proteins, Their Biologic Interactions, And Colorectal Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*; 94: 972-980.

Sayre FW. and Roberts E. (Nov 1958). Preparation and Some Properties of a Phosphate-activated Glutaminase from Kidneys. *J. Biol. Chem.*; 233: 1128 - 1134.

Schafer D. F., Jones E. A. (1990). Hepatic encephalopathy. In: Zakim D., Boyer T.D., editors. *Hepatology: A textbook of liver disease*. Philadelphia: W.B. Saunders; 447-460.

Scharf J. G., Schmitz F., Frystyk J., Skjaerbaek C., Moesus H., Blum W. F. (1996). Insulin-Like Growth Factor-I Serum Concentrations And Patterns Of Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins In Patients With Chronic Liver Disease. *J Hepatol*; 25:689-699.

Schmid C. (1995). Insulin-Like Growth Factors. *Cell. Biol. Int.*; 19:445-457.

Schomerus H., Hamster H., Blunck V., Reinhard U., Mayer K., Dolle W. (1981). Latent Portasystemic Encephalopathy. I. Nature Of Cerebral Functional Defects And Their Effect On Fitness To Drive. *Dig Dis Sci*; 26: 622-630.

Schomerus H., Hamster W. (2001). Quality Of Life In Cirrhotics With Minimal Hepatic Encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*; 16:37-41.

Segel IH (1976). *Cálculos de Bioquímica*. Editorial Acribia; 307-308.

Shawcross D., Deutz NEP., Olde Damink SWM., Jalan R. (2003). Hepatic Encephalopathy In Liver Failure. A Multiorgan Perspective. In *Progress In The Treatment Of Liver Diseases*. Ars Médica, Barcelona. Ed Arroyo V, Forns X, García Pagan JC, Rodés J. 51-60.

Shawcross D., Jalan R.(2005). Dispelling Myths In The Treatment Of Hepatic Encephalopathy. *Lancet*; 365:431-433.

Sherlock S. (1987). Chronic Portal Systemic Encephalopathy: Update 1987. *Gut*;28:1043-1048.



## ***Bibliografia***

---

Smith C. D., Carney J. M., Starke-Reed P. E., Oliver C. N., Stadtman E. R., Floyd R. A., Markesbery W. R. (1991). Protein oxidation in aging brain. *Proc. Natl. Acad. Sci; USA* 88:10540–10543.

Snodgrass P. J. (1989). Urea cycle enzyme activities are normal and inducible by a high-protein diet in CCl<sub>4</sub> cirrhosis of rats. *Hepatology*; 9(3):373-379.

Sobel R. A., DeArmond S. J., Forno L. S., Eng L. F. (1981). Glial Fibrillary Acidic Protein In Hepatic Encephalopathy. An Immunohistochemical Study. *J Neuropathol Exp Neurol*; 40:625-632.

Song G., Dhodda V. K., Blei A. T., Dempsey R. J., Rao V. L. (2002). GeneChip Analysis Shows Altered mRNA Expression Of Transcripts Of Neurotransmitter And Signal Transduction Pathways In The Cerebral Cortex Of Portacaval Shunted Rats. *J Neurosci Res*; 68:730-737.

Sonnewald U., Therrien G., Butterworth R. F. (1996). Portacaval Anastomosis Results In Altered Neuron-Astrocytic Metabolic Trafficking Of Amino Acids: Evidence From <sup>13</sup>C-NMR Studies. *J Neurochem*;67:1711-1717.

Spahr L., Vingerhoets F., Lazeyras F., Delavelle J., Du Pasquier R., Giostra E. (2000). Magnetic Resonance Imaging and Proton

Spectroscopic Alterations Correlate With Parkinsonian Signs in Patients With Cirrhosis. *Gastroenterology*, 119:774-781.

Srivastava A., Mehta R., Rothke S.P. (1994). Fitness to drive in patients with cirrhosis and portal-systemic shunting: a pilot study evaluating driving performance. *J. Hepatology*, 21: 1023-1028.

Stabenau J. R., Warren K. S., Rall D. P. (1959). The role of gradient in the distribution of ammonia between blood and cerebrospinal fluid, brain and muscle. *J Clin Invest*; 38:373-383.

Stadman E. R., (2001). Protein Oxidation in Aging and Age-Related Diseases. *Ann New York Acad Sci*; 928:22-38.

Stauch S., Kircheis G., Adler G., Beckh K., Ditschuneit H., Gortelmeyer R., Hendricks R., Heuser A., Karoff C., Malfertheiner P., Mayer D., Rosch W., Steffens J. (1998). Oral L-Ornithine-L-Aspartate Therapy Of Chronic Hepatic Encephalopathy: Results Of A Placebo-Controlled Double-Blind Study. *J. Hepatol.*; 28:856-864.

Strauss E., Tramonte R., Silva E. P. (1992). Double-Blind Randomized Clinical Trial Comparing Neomycin And Placebo In The Treatment Of Exogenous Hepatic Encephalopathy. *Hepatogastroenterology*, 39:542-545.

## ***Bibliografia***

---

Szweda L., Atkinson D. (1990). Response Of Rat Liver Glutaminase To Ph, Ammonium And Citrate. *The Journal of Biological Chemistry*; 265:20869-20873.

Thompson J. S., Schafer D. F., Haun J., Schafer G.J. (1986). Adequate diet prevents hepatic coma in dogs with Eck fistulas. *Surg Gynecol Obstet*; 162(2):126-130.

Tricklebank M. D., Smart J. L., Bloxam D. L., Curzon G. (1978). Effects of Chronic Experimental Liver Dysfunction and L-Tryptophan on Behaviour in the Rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*; 9(2):181-189.

Uribe M., Campollo, Vargas F., Ravelli G. P., Mundo F., Zapata L., Gil S., Garcia-Ramos G. (1987). Acidifying Enemas (Lactitol And Lactose) Vs. Nonacidifying Enemas (Tap Water) To Treat Acute Portal-Systemic Encephalopathy: A Double Blind, Randomized Clinical Trial. *Hepatology*; 7: 639-643.

Van Anken H.C., Schiphorst M.E. (1979). A Kinetic Determination Of Ammonia In Plasma. *Clin Chim Acta*;56:151-157.

Vidal M (1903). Le Traitement Chirurgical Des Ascitis. *Presse Medicale*;747.

Vogels B. A., Maas M. A., Daalhuisen J., Quack G., Chamuleau R. A. (1997). Memantine, A Noncompetitive NMDA Receptor

Antagonist Improves Hyperammonemia-Induced Encephalopathy And Acute Hepatic Encephalopathy In Rats. *Hepatology*; 25:820-827.

Von heijne G. (1992). Membrane Protein Structure Prediction. Hydrophobicity Analysis And The Positive-Inside Rule. *J. Mol. Biol*; 8, 249-254.

Waagepetersen H. S., Sonnewald U., Larsson O. M., Schousboe A. (2000). A possible role of alanine for ammonia transfer between astrocytes and glutamatergic neurons. *J Neurochem*; 75: 471-479.

Warren K. S., Newton W. L. (1959). Portal And Peripheral Blood Ammonia Concentrations In Germ-Free And Conventional Guinea Pigs. *Am J Physiol*; 197:717:720.

Weber F. L., Veach G. (1979). The Importance Of The Small Intestine In Gut Ammonium Production In The Fasting Dogs. *Gastroenterology*; 3:235-240.

Wein C., Koch H., Popp B., Oehler G., Schauder P. (2004). Minimal Hepatic Encephalopathy Impairs Fitness To Drive. *Hepatology*; 39: 739-745.

Weisdorf S. A., Freese D. K., Radmer W.J., Dehner L. P., Cerra F. B. (1990). Plasma Amino Acids in Long-Term Models for

## Bibliografia

---

Obstructive Versus Toxic Liver Injury in Developing Rats. *J Pediatr. Gastroenterol Nutr.*; 10(3):371-379.

Whipple A. O. (1945). Problem Of Portal Hypertension In Relation To Hepatosplenopaties. *Annals of surgery*; 122:445-475.

Whitaker W. L. (1946). Portal Vein Ligation And Eck Fistula In The Rat. *Proceedings of the Society of Experimental and Biological Medicine*; 167:420-423.

Wolpert E., Phillips S. F., Summerskill W. H. (1970). Ammonia production in the human colon. Effects of cleansing, neomycin and acetohydroxamic acid. *N Engl J Med*; 283:159-164.

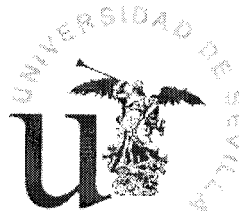
Yamada K, Hiramatsu M, Noda Y, Mamiya T, Murai M, Kameyama T. (1996). Role Of Nitric Oxide And Cyclic GMP In The Dizocilpine-Induced Impairment Of Spontaneous Alternation Behaviour In Mice. *Neuroscience*; 74:365-374.

Yurdaydin C. (2003). Blood ammonia determination in cirrosis: still confusing alter all these years? *Hepatology*; 38:1307-1310.

Zeneroli M. L., Baraldi M., Ventura E., Vezzelli C., Tofanetti O., Germini M. (1991). Alterations Of GABA-A And Dopamine D-2 Brain Receptors In Dogs With Portal-Systemic Encephalopathy. *Life Sci*; 48(1):37-50.

Zieminska E., Dolinska M., Lazarewicz J. W., Albrecht J. (2000). Induction Of Permeability Transition And Swelling Of Rat Brain Mitochondria By Glutamine. *Neurotoxicology*; 21:295-300.

Zwingmann C., Desjardins P., Hazell A., Chatauret N., Michalak A., Butterworth R. F. (2002). Reduced Expression Of Astrocytic Glycine Transporter (Glyt-1) In Acute Liver Failure. *Metab Brain Dis*; 17:263-273.



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

Reunido el tribunal en el día de la fecha, integrado por los abajo firmantes, para evaluar la tesis doctoral de D. titulada

acordó otorgarle la calificación de **SOBRESALIENTE "COM LAUDE" POR UNANIMIDAD**.

Sevilla, a **21** de **DICIEMBRE** de 200 **6**

Vocal,  

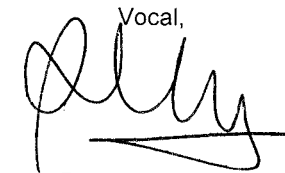

Presidente,



Vocal,  


Secretario,



Vocal,  


Doctorando,

