







VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

**Modulación de la vía Glu-NO-GMPc y del aprendizaje por  
GMPc extracelular en cerebelo. Mecanismos moleculares  
implicados. Alteraciones en modelos animales de  
hiperamonemia y encefalopatía hepática**

**Tesi Doctoral presentada per:**

Andrea Cabrera Pastor

**Dirigida per:**

Dr. Vicente Felipo

Dra. Marta Llansola

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Doctorat en Bioquímica Clínica-Mèdica i Immunologia**

**València, 2014**





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

MARTA LLANSOLA GIL, Doctora en Ciencias Biológicas, Investigadora del Laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigación Príncipe Felipe,

JUAN VIÑA RIBES, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València y Investigador Jefe del Grupo de Investigación en Bioquímica Tisular de la Fundación para la Investigación del Hospital Clínico de Valencia, como tutor de la presente tesis doctoral,

MANIFIESTAN: que la licenciada en Ciencias Biológicas ANDREA CABRERA PASTOR ha realizado, bajo su supervisión, en el laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigación Príncipe Felipe, el trabajo "MODULACIÓN DE LA VÍA GLUTAMATO-ÓXIDO NÍTRICO-GMPc Y DEL APRENDIZAJE POR GMPc EXTRACELULAR EN CEREBELO. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS. ALTERACIONES EN MODELOS ANIMALES DE HIPERAMONEMIA Y ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA" y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Director/a Dr. Vicente Felipo    Dra. Marta Llansola

Tutor Dr. Juan Viña







# ÍNDICE

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	- 1 -
<b>1. HIPERAMONEMIA Y ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA. ALTERACIONES NEUROLÓGICAS ASOCIADAS</b> .....	- 1 -
<b>1.1. Metabolismo y toxicidad del amonio</b> .....	- 1 -
<b>1.2. Encefalopatía hepática crónica</b> .....	- 6 -
<b>1.2.1 Contribución de la hiperamonemia a la encefalopatía hepática crónica</b> -	10 -
<b>1.2.2 Alteraciones neurológicas en encefalopatía hepática crónica</b> .....	- 12 -
<b>1.2.2.1 Alteraciones motoras</b> .....	- 14 -
<b>1.2.2.2 Alteraciones cognitivas</b> .....	- 17 -
<b>2. MODELOS ANIMALES DE HIPERAMONEMIA Y ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA CRÓNICAS</b> .....	- 21 -
<b>3. EFECTOS DE LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA SOBRE LA FUNCIÓN MOTORA</b> .....	- 25 -
<b>3.1. Alteraciones motoras en modelos animales de hiperamonemia y encefalopatía hepática crónicas. Mecanismos moleculares</b> .....	- 25 -
<b>3.2. Mecanismos que modulan la actividad motora</b> .....	- 26 -
<b>3.3. Mecanismos responsables de las alteraciones en la actividad motora en hiperamonemia y EH</b> .....	- 27 -
<b>3.3.1. Alteraciones en la función de los circuitos neuronales ganglios basales-tálamo-corteza</b> .....	- 27 -
<b>3.3.2. Mecanismos responsables de la hipoquinesia en EH</b> .....	- 28 -
<b>3.4. Mecanismos que modulan la coordinación motora. Papel de la neurotransmisión GABAérgica</b> .....	- 29 -
<b>4. FUNCIÓN COGNITIVA: MEMORIA Y APRENDIZAJE. PAPEL DEL HIPOCAMPO Y DEL CEREBELO</b> .....	- 31 -
<b>4.1. Papel del hipocampo en procesos de aprendizaje y memoria</b> .....	- 33 -
<b>4.1.1. Tests de memoria espacial en modelos animales: Laberinto acuático de Morris, Laberinto radial, Memoria de la localización de un objeto</b> -	35 -

4.2. Papel del cerebelo en procesos de aprendizaje y memoria.....	- 37 -
4.2.1. Aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y .....	- 38 -
5. PAPEL DE LA VÍA GLUTAMATO-ÓXIDO NÍTRICO-GMPc EN PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA .....	- 40 -
5.1. El bloqueo del receptor NMDA altera procesos de aprendizaje y memoria espacial.....	- 42 -
5.2. Papel del NO en los mecanismos de plasticidad sináptica y memoria espacial.....	- 43 -
5.3. Papel del GMPc en aprendizaje y memoria espacial.....	- 43 -
5.4. Papel de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo en el aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y.....	- 44 -
6. MECANISMOS DE MODULACIÓN DE LA VÍA GLUTAMATO-ÓXIDO NÍTRICO-GMPc.....	- 45 -
7. ALTERACIONES COGNITIVAS EN MODELOS ANIMALES DE HIPERAMONEMIA Y ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA CRÓNICAS. ....	- 50 -
8. LA DISMINUCIÓN DE LA FUNCIÓN DE LA VÍA GLUTAMATO-NO-GMPc EN CEREBELO ES RESPONSABLE DE LA DISMINUCIÓN DE LA CAPACIDAD DE APRENDIZAJE DE UNA TAREA DE DISCRIMINACIÓN CONDICIONADA EN ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA E HIPERAMONEMIA CRÓNICAS .....	- 52 -
8.1. Mecanismos que contribuyen a las alteraciones de la vía glutamato-NO-cGMP en cerebelo en hiperamonemia y encefalopatía hepática crónicas ....	- 54 -
8.1.1. Papel de la neuroinflamación en el deterioro cognitivo en hiperamonemia y encefalopatía hepática crónicas.....	- 54 -
8.1.2. Aumento de la activación tónica del receptor NMDA.....	- 55 -
8.1.3. Alteraciones en la activación de receptores AMPA y metabotrópicos de glutamato .....	- 57 -
8.1.4. Aumento del tono GABAérgico.....	- 58 -
9. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DEL GMP CÍCLICO EXTRACELULAR.....	- 58 -
9.1. El GMPc extracelular modula la motilidad del intestino .....	- 59 -
9.2. El GMPc extracelular modula el transporte de Na <sup>+</sup> en el riñón.....	- 60 -

9.3. El GMPc extracelular tiene efecto neuroprotector frente a la excitotoxicidad en neuronas de cerebelo en cultivo .....	- 61 -
9.4. El GMPc extracelular modula el aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y .....	- 62 -
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>- 67 -</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>- 73 -</b>
1. Modelo animal de hiperamonemia crónica sin fallo hepático .....	- 73 -
1.1. Determinación de amonio en sangre .....	- 73 -
2. Procedimientos quirúrgicos.....	- 74 -
2.1. Implantación de minibombas osmóticas en el ventrículo cerebral .....	- 74 -
2.2. Microdiálisis en cerebelo <i>in vivo</i> .....	- 77 -
2.3. Determinación histológica de la posición de la cánula de la minibomba osmótica y de la guía de microdiálisis. ....	- 78 -
3. Análisis de la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc <i>in vivo</i> por microdiálisis en cerebelo.....	- 78 -
3.1. Determinación de GMPc extracelular en muestras de microdiálisis en cerebelo.....	- 80 -
3.2. Cuantificación de GABA en muestras de microdiálisis del cerebelo por HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	- 80 -
4. Obtención de cortes cerebrales frescos.....	- 81 -
4.1. Determinación de la actividad óxido nítrico sintasa .....	- 82 -
4.2. Determinación de la cantidad y fosforilación de NOS neuronal y CaMKII por Western blot .....	- 83 -
4.3. Determinación de GMPc en cortes de cerebelo .....	- 86 -
4.4. Determinación de la fosforilación de proteínas extracelulares en cortes de cerebelo mediante marcaje con ATP <sup>33</sup> .....	- 86 -
5. Identificación de proteínas de membrana de cerebelo que unen GMPc .....	- 88 -
6. Tests de aprendizaje y memoria .....	- 90 -

6.1. Test de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un Laberinto en Y .....	- 90 -
6.2. Laberinto radial de 8 brazos .....	- 91 -
6.3. Laberinto acuático de Morris.....	- 93 -
6.4. Ensayos de actividad y coordinación motora.....	- 95 -
6.4.1. Actividad motora .....	- 95 -
6.4.2. Beam walking.....	- 96 -
7. Determinación de factores inflamatorios en cerebelo e hipocampo .....	- 97 -
8. Análisis estadístico .....	- 99 -

**RESULTADOS..... - 103 -**

1. Efecto de la administración de GMPc extracelular sobre la actividad y coordinación motoras.....	- 103 -
1.1. Actividad motora .....	- 103 -
1.1.1. La administración de GMPc extracelular reduce algunos factores inflamatorios en cerebro.....	- 105 -
1.2. La administración de GMPc extracelular en el ventrículo cerebral restaura la coordinación motora y el GABA extracelular en ratas con hiperamonemia crónica.....	- 109 -
2. Efecto de la administración de GMPc extracelular sobre la capacidad de aprendizaje y memoria espacial.....	- 111 -
2.1. La administración de GMPc extracelular recupera la memoria de referencia y el índice de aprendizaje pero no la memoria de trabajo en el laberinto radial .....	- 111 -
2.2. La administración crónica de GMPc extracelular restaura la capacidad de aprendizaje espacial en el test del laberinto acuático de Morris .....	- 114 -
3. El GMPc extracelular restaura la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y .....	- 116 -
4. La administración crónica de GMPc extracelular restaura la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc en cerebelo in vivo.....	- 117 -

5. Efecto de la administración aguda de diferentes concentraciones de GMPc extracelular a través de la sonda de microdiálisis sobre la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo analizada por microdiálisis in vivo .....	120 -
6. La administración de GMPc extracelular aumenta la actividad de la óxido nítrico sintasa en cortes frescos de cerebelo de ratas hiperamonémicas .....	126 -
7. Efecto de la adición de GMPc extracelular sobre la fosforilación de la nNOS en la serina 847 en cortes de cerebelo .....	130 -
8. Efecto del GMPc extracelular sobre la fosforilación de la CaMKII en la treonina 286 en cortes de cerebelo de ratas control e hiperamonémicas.....	131 -
9. Efecto de la inhibición de la CaMKII sobre la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo in vivo analizada por microdiálisis .....	133 -
10. Efecto de un inhibidor de la CaMKII en cortes frescos de cerebelo sobre los niveles de GMPc.....	137 -
11. Aislamiento de proteínas de membrana de cerebelo que unen GMPc extracelular .....	138 -
12. Efecto de un inhibidor impermeable de PKA sobre la función de la vía glutamato-NO-GMPc analizada por microdiálisis en cerebelo in vivo .....	140 -
13. Efecto de un inhibidor impermeable de PKA sobre la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cortes frescos de cerebelo.....	145 -
13.1. Efecto de un inhibidor impermeable de PKA sobre la actividad de la óxido nítrico sintasa .....	145 -
13.2. Efecto del inhibidor impermeable de PKA sobre la fosforilación de la nNOS en la serina 847 en cortes de cerebelo .....	146 -
13.3. Efecto del inhibidor impermeable de PKA sobre la fosforilación de la CaMKII en la treonina 286 en cortes de cerebelo.....	148 -
13.4. Efecto del inhibidor impermeable de PKA sobre el GMPc total en cortes de cerebelo .....	149 -
14. Efecto del GMPc extracelular sobre la fosforilación de proteínas de membrana de cerebelo .....	151 -

<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>- 155 -</b>
1. Tratamiento crónico intracerebral con GMPc extracelular en ratas control e hiperamonémicas .....	- 155 -
1.1. El tratamiento crónico con GMPc extracelular restaura la actividad vertical y algunos marcadores inflamatorios en ratas hiperamonémicas .....	- 155 -
1.2. El tratamiento crónico con GMPc extracelular normaliza los niveles basales de GABA extracelular y la coordinación motora en ratas hiperamonémicas.....	- 157 -
1.3. El tratamiento crónico con GMPc extracelular restaura la capacidad de aprendizaje y memoria espacial.....	- 160 -
1.3.1. El tratamiento crónico con GMPc extracelular restaura el aprendizaje en el test del MWM en ratas hiperamonémicas .....	- 160 -
1.3.2. Efecto del tratamiento crónico con GMPc extracelular sobre el aprendizaje y la memoria en el test del laberinto radial .....	- 163 -
1.4. El tratamiento crónico con GMPc extracelular restaura la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo y la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y en ratas hiperamonémicas ...	- 165 -
2. Modulación de la vía glutamato-NO-GMPc por GMPc extracelular .....	- 167 -
2.1. Efecto de la administración de diferentes concentraciones de GMPc extracelular a través de la sonda de microdiálisis sobre la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo analizada por microdiálisis in vivo .....	- 167 -
2.2. Efecto del GMPc extracelular en cortes frescos de cerebelo sobre la óxido nítrico sintasa y la función de la vía glutamato-NO-GMPc.....	- 170 -
3. Aislamiento de proteínas de membrana de cerebelo que unen GMPc extracelular .....	- 177 -
3.1. Posible papel de una ecto ó exo PKA en la modulación de la vía glutamato-NO-GMPc por GMPc extracelular .....	- 178 -
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>- 187 -</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>- 191 -</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>ATP</b>	5'-trifosfato de adenosina
<b>AMPA</b>	ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropiónico
<b>AMPc</b>	Monofosfato de adenosina cíclico
<b>APS</b>	Persulfato de amonio
<b>BCIP</b>	Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
<b>BDL</b>	Ligadura del conducto biliar
<b>BH<sub>4</sub></b>	Tetrahidrobiopterina
<b>BSA</b>	Albumina de suero bovino
<b>CM</b>	Calmodulina
<b>Ca<sup>2+</sup>/CaM</b>	Complejo calcio/calmodulina
<b>CaMKII</b>	Proteína quinasa II dependiente de calmodulina
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EEG</b>	Electroencefalograma
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicol-bis-N', N', N', N'-tetraacético
<b>EH</b>	Encefalopatía Hepática
<b>EHM</b>	Encefalopatía Hepática Mínima
<b>EHPVO</b>	Obstrucción de la vena porta extra-hepática
<b>EPSPs</b>	Potenciales postsinápticos excitatorios
<b>GABA</b>	Ácido Gamma-aminobutírico
<b>GCs</b>	Guanilato ciclasa soluble
<b>GC</b>	Guanilato ciclasa
<b>GDH</b>	Glutamato deshidrogenasa
<b>GMP</b>	Guanosín 3', 5'- monofosfato
<b>GMPc</b>	Guanosín 3', 5'- monofosfato cíclico
<b>8-Br-GMPc</b>	8-Bromoguanosín 3', 5'- monofosfato cíclico
<b>GLT-1</b>	Transportador glial de glutamato
<b>Glu</b>	Glutamato

<b>GTP</b>	Guanosín-5'-trifosfato
<b>HA</b>	Hiperamonemia
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanolsulfónico
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta presión
<b>IBA-1</b>	Ionized calcium binding adaptor molecule-1
<b>IBMX</b>	3-isobutyl-1-methylxanthine
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IMP</b>	Inosina monofosfato
<b>KA</b>	Receptor Kainato
<b>LCA</b>	Líquido cefaloraquídeo artificial
<b>LTM</b>	Memoria a largo plazo
<b>LTP</b>	Potenciación a largo plazo ( <i>long term potentiation</i> )
<b>MDT</b>	Tálamo medio-dorsal
<b>mGluR</b>	Receptores metabotrópicos de glutamato
<b>MWM</b>	Laberinto acuático de Morris
<b>Nacc</b>	Núcleo acumbens
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NBT</b>	Nitroblue Tetrazolium
<b>NMDA</b>	Ácido N-metil-D-aspartato
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintasa neuronal
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>OPA</b>	Aldehído o-ftálico
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCS</b>	Anastomosis porta-cava ( <i>portacaval shunt</i> )
<b>PDE</b>	Fosfodiesterasa
<b>PFCx</b>	Corteza prefrontal
<b>PHES</b>	Psicométric hepatic encephalopathy tests
<b>Pi</b>	Fosfato inorgánico

<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PKG</b>	Proteína quinasa G
<b>PMSF</b>	Fenilmetilsulfonilfluoruro
<b>PPO</b>	2,5-diphenyloxazole
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno
<b>SDS</b>	Dodecilsulfatosódico
<b>Ser</b>	Residuo de Serina
<b>SNAP</b>	S-Nitroso-N-acetylpenicillamine
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNr</b>	Sustancia negra <i>pars reticulata</i>
<b>STM</b>	Memoria a corto plazo
<b>TEMED</b>	N', N', N', N'- Tetrametilenetilendiamina
<b>Thr</b>	Residuo de treonina
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>Tris Base</b>	Tris-(hidroximetil)-aminometano
<b>VMT</b>	Tálamo medio-ventral
<b>VP</b>	Pálido ventral



# **INTRODUCCIÓN**



### INTRODUCCIÓN

#### 1. HIPERAMONEMIA Y ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA. ALTERACIONES NEUROLÓGICAS ASOCIADAS

##### 1.1. Metabolismo y toxicidad del amonio

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



El  $\text{NH}_3$  es un gas capaz de atravesar libremente las membranas celulares. Sin embargo, el ion  $\text{NH}_4^+$  necesita transportadores para atravesarlas, como los que se han descrito en hígado y cerebro (Amlal y Soleimani, 1997; Ramirez *et al.*, 1999; Marcaggi y Coles, 2001; Weiner, 2004).

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

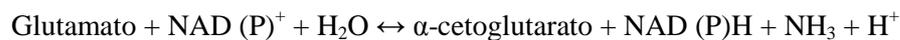
## INTRODUCCIÓN

---

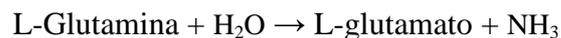
estríctamente regulados por distintas reacciones que mantienen el equilibrio entre su formación y su eliminación.

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

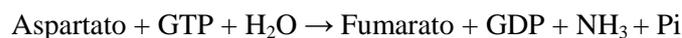
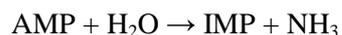
- (i) Glutamato deshidrogenasa: se localiza principalmente en hígado y en cerebro

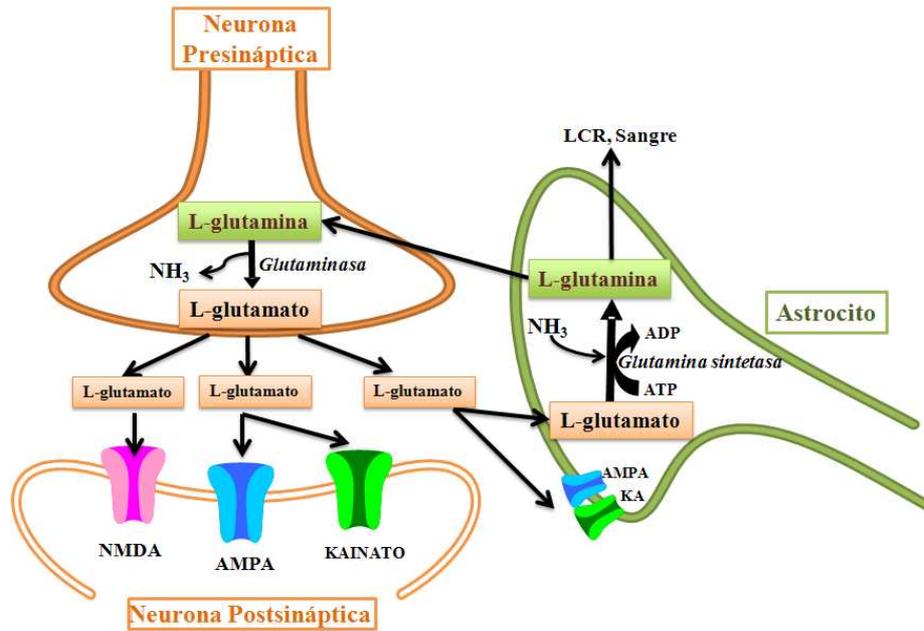


- (ii) Glutaminasa: se localiza principalmente en hígado, riñón, intestino y cerebro. En cerebro es abundante en las terminaciones sinápticas de las neuronas glutamatérgicas, participando en el ciclo glutamato-glutamina (Figura 1).



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

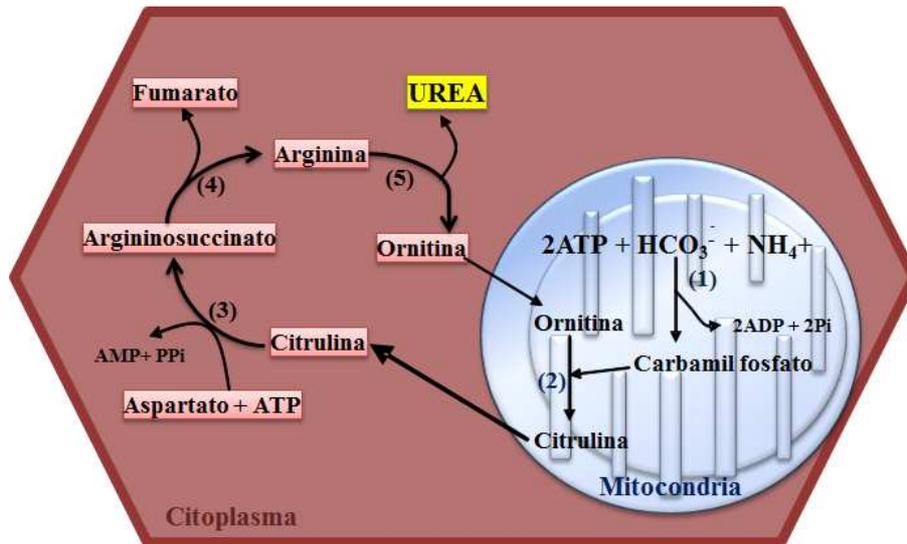




**Figura 1. Ciclo glutamato-glutamina.** El glutamato es liberado a la hendidura sináptica por la neurona presináptica. Para evitar la excesiva activación de sus receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA, Kainato), el glutamato es rápidamente eliminado de la hendidura sináptica por transportadores de glutamato localizados tanto en los astrocitos circundantes como en las neuronas. El astrocito incorpora amonio al glutamato mediante la glutamina sintetasa formando glutamina. Esta glutamina, liberada por el astrocito, es captada por las neuronas donde se transforma en glutamato y amonio por la acción de la glutaminasa. El glutamato se incorpora en vesículas sinápticas que serán liberadas de nuevo a la hendidura sináptica.

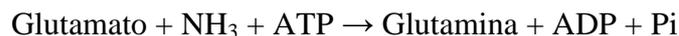
En los animales ureotélicos, incluidos los seres humanos, el amonio es eliminado principalmente en el hígado, a través del ciclo de la urea (Figura 2). Mediante este ciclo el amonio se incorpora en urea, la cual se excreta por la orina.

## INTRODUCCIÓN



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

En otros órganos, como cerebro y músculo, que no poseen el ciclo de la urea, el amonio es detoxificado esencialmente por la glutamina sintetasa. Esta enzima tiene un papel muy importante en el sistema nervioso central donde se localiza en los astrocitos (Martinez-Hernandez *et al.*, 1977; Norenberg y Martinez-Hernandez, 1979), participando en el ciclo glutamato-glutamina entre astrocitos y neuronas (Figura 1). La glutamina sintetasa incorpora el ion amonio al glutamato formando glutamina en una reacción que consume ATP.



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

Cuando existe fallo hepático, la detoxificación del amonio no se lleva a cabo correctamente y se elevan sus niveles en sangre y cerebro. El estado de hiperamonemia en el organismo daña la función cerebral, produciendo buena parte de las alteraciones neurológicas presentes en el síndrome de encefalopatía hepática crónica (ver apartado 1.2.2.).

Los niveles elevados de amonio alteran la transmisión sináptica. Una de las razones es que el tamaño y la carga iónica del  $\text{NH}_4^+$  en solución acuosa es muy similar al ion potasio ( $\text{K}^+$ ), por lo que muchos enzimas y canales iónicos que utilizan  $\text{K}^+$  pueden utilizar también  $\text{NH}_4^+$ . Por ejemplo, el  $\text{NH}_4^+$  puede sustituir al  $\text{K}^+$  en la actividad de la ATPasa intercambiadora de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en neuronas (Moser, 1987). Esta enzima tiene un papel esencial en el mantenimiento y control del potencial de membrana en neuronas, y por tanto en la despolarización/repolarización de la membrana celular y en la transmisión sináptica. Alteraciones en la función de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  juegan un papel importante en los efectos patológicos de la hiperamonemia aguda a concentraciones altas de amonio (Kosenko *et al.*, 1994).

Por otro lado, el ciclo glutamato-glutamina entre astrocitos y neuronas (Figura 1) es el principal mecanismo por el que se recicla el neurotransmisor glutamato. Por tanto, este ciclo es esencial para mantener un correcto

## INTRODUCCIÓN

---

funcionamiento de la neurotransmisión glutamatérgica. El amonio tiene un papel importante en este ciclo y el aumento de amonio en hiperamonemia afecta su función en algunas circunstancias.

### 1.2. Encefalopatía hepática crónica

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

La EH clínica se clasifica en 3 tipos: A, B y C (Ferenci *et al.*, 2002)

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

- EH tipo B: EH crónica, por derivación porto-sistémica sin enfermedad hepatocelular intrínseca. Se han descrito muchos casos entre la población japonesa (Watanabe, 2000). Existen derivaciones porto-sistémicas espontáneas, como la causada por la obstrucción de la vena porta extra-hepática (EHPVO). Es una causa común de hipertensión portal en niños (Yachha *et al.*, 1996). Estos pacientes presentan flujo sanguíneo hepático reducido, concentraciones de amonio en sangre aumentadas, la relación glutamina/creatinina aumentada y en ocasiones anastomosis porta-cava espontánea. También puede originar EH tipo B la ausencia congénita de vena porta aunque es poco frecuente. En este caso los pacientes presentan una malformación de forma que las venas mesentéricas drenan su sangre directamente a la circulación sistémica (Grazioli *et al.*, 2000). Normalmente se detecta cuando son niños y no porque presenten encefalopatía sino porque la función hepática está dañada. A medida que crecen y llegan a la edad adulta desarrollan encefalopatía y daño hepático y renal (Wojcicki *et al.*, 2004).
- EH tipo C: EH crónica, asociada a cirrosis hepática e hipertensión portal. Es la más frecuente. También genera derivaciones porto-sistémicas como consecuencia de enfermedades crónicas del hígado, generalmente cirrosis, con una apreciable derivación de la sangre portal a la circulación sistémica (Encefalopatía Porto-Sistémica, PSE). Se pueden producir episodios de EH clínica como consecuencia de determinados factores desencadenantes (hemorragia digestiva, alta ingesta de proteínas, estreñimiento, infección). Estos episodios de EH son habitualmente reversibles cuando el factor desencadenante es

## INTRODUCCIÓN

---

eliminado. La derivación porto-sistémica también se realiza en los hospitales para tratar problemas como la hemorragia digestiva secundaria a ruptura de várices esofagogástricas, una complicación muy frecuente y severa de los pacientes con cirrosis hepática e hipertensión portal.

La EH es un factor predictivo de mortalidad en los pacientes cirróticos. Se estima que 3 años después del primer episodio de encefalopatía clínica la mortalidad es del 60-80%.

Las encefalopatías hepáticas de tipo B y C pueden ser clínicamente evidentes (*encefalopatía hepática clínica*) o no (*encefalopatía hepática mínima*). La encefalopatía hepática clínica se clasifica en tres formas según el patrón temporal de su manifestación: ocasional, recurrente y persistente. La EH *ocasional* está caracterizada por un episodio de alteración neuropsiquiátrica debido a un factor desencadenante y generalmente no deja huellas en los pacientes en términos de alteraciones en los test psicométricos y del electroencefalograma (EEG). La EH *recurrente* se caracteriza por episodios múltiples de encefalopatía intercalados por periodos en los que la situación neurológica del paciente es aparentemente normal. Y la EH *persistente* se caracteriza por alteraciones neuropsiquiátricas evidentes y continuas, aunque de duración variable en el tiempo y aparece sin una clara causa desencadenante.

Además de los 3 tipos de EH clínica mencionados, existe una forma temprana más leve denominada encefalopatía hepática mínima (EHM). Pacientes sin signos evidentes de EH clínica pueden presentar diversos

déficits cognitivos (percepción visuo-espacial, atención, concentración) y motores que no son detectables en un examen neurológico rutinario pero se ponen de manifiesto cuando se realizan tests psicométricos o neurofisiológicos adecuados. Este tipo de EH se denominaba encefalopatía hepática subclínica o latente, términos que han sido reemplazados por encefalopatía hepática mínima (EHM) (1993; Lockwood, 2000; Schomerus y Hamster, 2001; Ferenci *et al.*, 2002; Amodio *et al.*, 2004; Romero-Gomez *et al.*, 2007). La EHM disminuye la calidad de vida de los pacientes (Slowik *et al.*, 2001), aumenta el riesgo de padecer accidentes laborales, domésticos y de tráfico y predispone a sufrir EH clínica. Un 35-50% de los pacientes adultos con cirrosis hepática presentan EHM (de Juana *et al.*, 2003; Minguez *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2008; 2009).

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

Se ha descrito que el 50% de los pacientes cirróticos con EHM desarrollan EH evidente durante los siguientes 6 meses (Yen y Liaw, 1990).

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

## INTRODUCCIÓN

---

### 1.2.1 Contribución de la hiperamonemia a la encefalopatía hepática crónica

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

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

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

5. Existe una buena correlación entre la gravedad de los síntomas neurológicos en los pacientes y la concentración arterial de amonio que presentan (Clemmesen *et al.*, 1999).
6. La neuropatología que se manifiesta en la encefalopatía hepática coincide con la que se observa como consecuencia de la exposición del cerebro a niveles altos de amonio:
  - Tanto en EH aguda como en la exposición aguda a amonio los astrocitos aumentan su volumen provocando edema cerebral. Esta complicación se presenta en pacientes con síndromes hiperamonémicos agudos (fallo hepático agudo, síndrome de Reye, enzimopatías congénitas del ciclo de la urea, etc.) y se correlaciona con los niveles de amonio alcanzados en esos pacientes (Clemmesen *et al.*, 1999).
  - Tanto en EH crónica como en la exposición crónica a amonio los astrocitos sufren alteraciones morfológicas y funcionales similares, apareciendo los denominados astrocitos de Alzheimer tipo II. Estas alteraciones se observan en pacientes con fallo hepático crónico así como en pacientes con hiperamonemia crónica debida a enzimopatías congénitas del ciclo de la urea (Michalak y Butterworth, 1997), en ratones con hiperamonemia inducida por

## INTRODUCCIÓN

---

inyección de ureasa (Gibson *et al.*, 1974) y en cultivos de astrocitos expuestos a amonio (Norenberg, 1987).

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

### 1.2.2 Alteraciones neurológicas en encefalopatía hepática crónica

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

Los síntomas más tempranos suelen ser alteraciones en el sueño y cambios en el comportamiento, que no son detectables durante el examen neurológico rutinario del individuo, pero disminuyen su calidad de vida (Slowik *et al.*, 2001).

Se ha descrito irritabilidad, apatía, trastornos de la conducta, cambios en el apetito, mirada fija, amnesia, cambios en el temperamento y en la personalidad. Algunos pacientes pasan de la depresión a la euforia en pocos minutos. Otros pacientes presentan sólo depresión o euforia alternadas con

un temperamento estable. Los síntomas paranoicos suelen ser comunes durante el estupor como resultado de las dificultades en la percepción y la interpretación. También pueden aparecer alucinaciones (Sherlock *et al.*, 1954).

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

El espectro clínico de la EH es muy amplio, por lo que su diagnóstico puede ser difícil dado que no existe un síntoma o examen de laboratorio específico para su diagnóstico. La gravedad de la EH clínica se clasifica en 4 grados según las manifestaciones neuropsicológicas. En la Tabla 1 se presentan los criterios de West-Haven para la estadificación del estado mental en pacientes con EH clínica.

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

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

## INTRODUCCIÓN

---

### 1.2.2.1 Alteraciones motoras

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

El sistema motor en mamíferos se organiza en tres sistemas: (i) vía corticoespinal, (ii) circuitos de los ganglios basales y (iii) cerebelo. En los pacientes con EH crónica se han descrito alteraciones y síntomas relacionados con los 3 niveles de organización. Manifestaciones clínicas motoras relacionadas con un mal funcionamiento de los ganglios basales (signos extrapiramidales como aquinesia, rigidez,...) se han descrito en pacientes con EH mínima y cirrosis hepática compensada (Krieger *et al.*, 1996; Jover *et al.*, 2003). Alteraciones de la coordinación motora (cerebelares) están presentes en pacientes con EH de grado 1 y 2, y alteraciones de la vía corticoespinal en pacientes desde grado 1 al 4 de EH (Krieger *et al.*, 1996; Jones y Weissenborn, 1997; Weissenborn *et al.*, 2005a).

Jover *et al.* (2005) realizaron una serie de tests psicométricos para medir el deterioro cognitivo, los signos extrapiramidales y la calidad de vida. De los 46 pacientes cirróticos estudiados, 22 manifestaron alteraciones motoras extrapiramidales y obtuvieron peores resultados en los tests psicométricos y de calidad de vida. En otro estudio, se comprobó que la presencia de alteraciones motoras extrapiramidales predice el desarrollo de EH clínica y que los signos avanzan a medida que avanza la enfermedad reduciendo la calidad de vida (Company *et al.*, 2010).

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

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

<sup>a</sup> Trastorno de la ejecución del movimiento aprendido que no puede ser explicado como consecuencia de debilidad muscular, pérdida sensorial o falta de comprensión o atención a las órdenes verbales

<sup>b</sup> Temblor de las manos en forma de aleteo

<sup>c</sup> Ausencia o irregularidad en la coordinación de los movimientos musculares

<sup>d</sup> Espasmo clónico de los músculos motores del globo ocular, que produce movimientos involuntarios de éste en varios sentidos

<sup>e</sup> Serie de contracciones rítmicas e involuntarias, de un músculo o grupo muscular por la extensión brusca y pasiva de sus tendones

<sup>f</sup> Se desencadena con los ojos abiertos y mediante giro de la cabeza con rapidez de un lado hacia el otro. El paciente comatoso cuyo tallo encefálico esté intacto dirige los ojos en la dirección opuesta a aquella en que se gira la cabeza

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

Descripción de algunas de las alteraciones motoras presentes en pacientes con encefalopatía hepática:

a) Aquinesia: pobreza del número de actos motores. Es un síntoma muy invalidante presente en un buen porcentaje de pacientes cirróticos (Jones y Weissenborn, 1997; Spahr *et al.*, 2000; Jover *et al.*, 2005). La aquinesia afecta a algunos movimientos elaborados, como la escritura, el lenguaje oral

## INTRODUCCIÓN

---

(disartria acinética), el balanceo normal de los brazos al andar o la expresión facial (hipomimia: faz inexpresiva y con disminución del parpadeo) (Ferenci *et al.*, 2002).

b) Bradiquinesia: enlentecimiento o reducción progresiva de la velocidad y amplitud de los movimientos repetitivos. En una persona no afectada los movimientos automáticos se desarrollan de forma involuntaria e inconsciente. En los pacientes con cirrosis hepática se han descrito retrasos en la iniciación motora, debilidad y fatigabilidad al reiterar los movimientos y enlentecimiento en la realización de las tareas. Esto afecta muchos aspectos motores de su vida diaria, como vestirse, asearse, comer, actividades manuales, etc., exigiéndoles su ejecución mucho más tiempo del que para ellos era habitual. El enlentecimiento psicomotor es uno de los primeros síntomas de la encefalopatía hepática (Jones y Weissenborn, 1997; Spahr *et al.*, 2000; Joebges *et al.*, 2003). Incluso en pacientes con encefalopatía hepática mínima es posible observar bradiquinesia.

c) Asterixis: es el temblor más característico que presentan los pacientes con EH (Uribe *et al.*, 1980; Jones y Weissenborn, 1997; Paul *et al.*, 2004; 2004; Timmermann *et al.*, 2005). Los pacientes sufren sacudidas repentinas e involuntarias de un músculo o grupo de músculos causadas por contracciones musculares repentinas que no pueden ser controladas por la persona que las padece.

d) Rigidez: es otro de los síntomas que pueden presentar los pacientes con EH (Jones y Weissenborn, 1997; Jover *et al.*, 2003). Consiste en una

contractura permanente de las masas musculares, que se traduce en una dificultad creciente para la movilización pasiva de las articulaciones.

e) Alteraciones de la postura: los pacientes con EH también pueden presentar trastornos posturales y de la marcha (Burkhard *et al.*, 2003; Mechtcheriakov *et al.*, 2005). La postura habitual del paciente tiende a la flexión del tronco, de la cabeza y de las cuatro extremidades.

### 1.2.2.2 Alteraciones cognitivas

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

Existe cierta controversia en cuanto a si existe o no deterioro en la memoria (Weissenborn *et al.*, 2003) en los pacientes con EH. Los test

## INTRODUCCIÓN

---

psicométricos empleados para medir la memoria en pacientes con EH evalúan fundamentalmente la memoria semántica y la memoria de trabajo (Weissenborn *et al.*, 2005b). En los tests que dependen de la atención, como ocurre en muchos tests de memoria, es difícil saber a qué alteración atribuir un error, a la atención o a la memoria. Existen test que permiten diferenciar entre atención y memoria. Uno de ellos es la retención de dígitos que mide la memoria a corto plazo, cuantificando el número de dígitos ordenados de forma seriada que un paciente puede recordar de forma correcta tras haberlos escuchado o leído. Otro test de memoria a corto plazo es la lista de palabras de Luria (Christensen, 1984). En estos dos tests los pacientes con EH obtienen peores resultados que los sujetos control (Weissenborn *et al.*, 2005b). El test de memoria de fotografías o dibujos mide la memoria a largo plazo. Se muestran al paciente varias imágenes duplicadas y desordenadas y tiene que recordar donde estaban las imágenes duplicadas y emparejarlas. En este test también se han observado alteraciones en los pacientes con EH (Weissenborn *et al.*, 2005b).

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

la cirrosis no influye en los resultados obtenidos en estas pruebas (Rehnstrom *et al.*, 1977).

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

Como se ha mencionado anteriormente, en los pacientes con EHM las alteraciones cognitivas no son evidentes y sólo se pueden detectar realizando tests psicométricos específicos. El término EHM se refiere a cambios sutiles en la función cognitiva o parámetros electrofisiológicos que pueden ser observados en pacientes con cirrosis que no presentan evidencias clínicas de EH (Amodio *et al.*, 2004). Para diagnosticar la presencia de EHM, se utiliza actualmente la batería denominada Psychometric Hepatic Encephalopathy Score (PHES) que consta de 5 tests psicométricos:

- Test de conexiones numéricas A: consiste en unir por orden los números (del 1 al 25) dispersos en un papel y lo más rápidamente posible, escogiendo siempre el camino más corto. Se mide el tiempo que el paciente tarda en realizar el test.
- Test de conexión numérica B: se debe realizar inmediatamente después del test de conexión numérica A. El paciente tiene una hoja con números del 1 al 13 y letras de la A hasta la L. La tarea consiste en conectar números y letras alternándolos, es decir unir el número 1 con la letra A,

## INTRODUCCIÓN

---

ésta con el número 2, con la letra B, así sucesivamente. Se mide el tiempo que el paciente necesita para terminar la tarea.

- Test de la clave de números: consiste en una hoja con cuadrados en los que se puede ver un número en la parte superior del cuadrado y un símbolo en la parte inferior. Cada símbolo corresponde a un número. El paciente tiene una hoja con cuadrados en los que ve los números en la parte superior y tiene que completarlos con el símbolo que le corresponda lo más rápidamente posible. Tiempo máximo disponible 90 segundos. Se cuantifica el número de cuadrados que el paciente es capaz de completar correctamente.
- Test de puntos seriados: consiste en 10 filas de círculos en los que el paciente tiene que poner un punto en el centro de cada círculo de la forma más precisa y rápida posible. Cuando termine una fila deberá empezar con la siguiente. Se mide el tiempo que necesita para llevar a cabo la tarea.
- Test de trazado de líneas: consiste en trazar una línea continua entre dos líneas paralelas de trazado irregular. No debe tocar ni cruzar las líneas pintadas. No puede mover el papel ni levantar la punta del rotulador. Se mide el tiempo que necesita para realizar la tarea y los errores cometidos.

Los resultados obtenidos en los test de la batería PHES se ajustan en función de la edad y el nivel de formación de acuerdo con las tablas de normalidad de los sujetos control ([www.redeh.org](http://www.redeh.org)). Se considera que un

paciente presenta EHM cuando en esta batería obtiene una puntuación igual o inferior a - 4.

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

## 2. MODELOS ANIMALES DE HIPERAMONEMIA Y ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA CRÓNICAS

Para poder avanzar en el estudio de los mecanismos que causan la EH y diseñar y ensayar posibles tratamientos terapéuticos es necesario utilizar modelos animales de EH. Los modelos animales de EH reproducen muchas de las alteraciones cognitivas y motoras encontradas en pacientes.

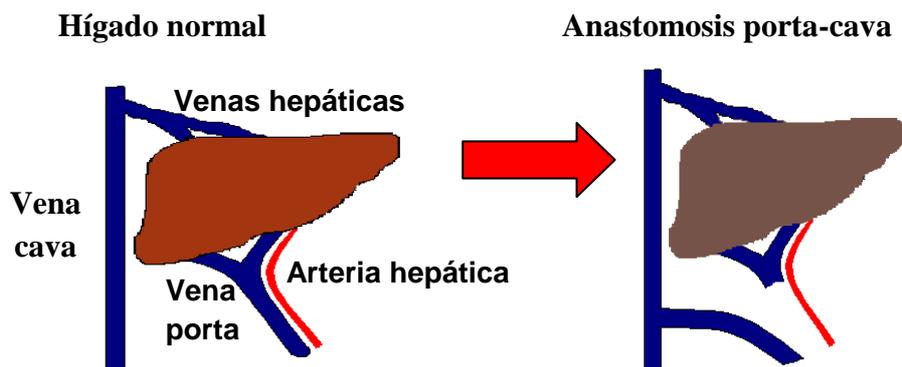
Dos de los principales modelos de EH crónica son las ratas con anastomosis porta-cava ó con ligadura biliar.

- **Modelo de EH por anastomosis porta-cava (PCS)**: este tipo de cirugía se ha utilizado en ratas, conejos, perros y cerdos. La cirugía consiste en cortar la vena porta, principal aporte sanguíneo al hígado y unirla con la vena cava (Figura 3). De esta forma, la sangre que proviene del intestino

## INTRODUCCIÓN

---

no circula a través del hígado y la metabolización de sustancias tóxicas por el mismo se reduce notablemente. Entre estas sustancias se encuentra el amonio, cuyos niveles aumentan tras la anastomosis porta-cava, produciendo hiperamonemia. Las ratas con anastomosis porta-cava (*portacaval shunt*, PCS) presentan alteraciones metabólicas como hiperamonemia, aumento de amonio y glutamina en cerebro y disminución de la utilización de glucosa en cerebro. También presentan alteraciones en ritmos circadianos (Bengtsson *et al.*, 1986; Steindl *et al.*, 1996) y en el sueño (Hernandez-Viadel *et al.*, 2003), alteraciones motoras como hipoquinesia (Bengtsson *et al.*, 1986; Martin, 1986; Steindl *et al.*, 1996; Rodrigo *et al.*, 2007) y alteraciones cognitivas como disminución de la memoria y la capacidad de aprendizaje (Elizondo *et al.*, 2007; Rodrigo y Felipe, 2007; Rougier *et al.*, 2007; Mendez *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Esquema del modelo de EH por anastomosis porta-cava.

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

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

- **Modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático:** este modelo se desarrolló a finales de los años 80 en nuestro laboratorio (Felipo *et al.*, 1988b; Azorin *et al.*, 1989). Consiste en administrar a las ratas una dieta que contiene acetato amónico (25 % p/p). Esto produce un estado de hiperamonemia crónica moderada en la que los niveles de amonio en sangre son aproximadamente el doble que en las ratas control. El modelo de hiperamonemia sin fallo hepático reproduce muchas de las alteraciones presentes en la encefalopatía hepática y permite discernir qué alteraciones cerebrales y neurológicas son debidas a la hiperamonemia y cuales son debidas a otros factores asociados al fallo

## INTRODUCCIÓN

---

hepático. Este modelo es sencillo y permite mantener hiperamonemia sostenida durante largos periodos de tiempo sin alterar la función hepática. Ha permitido la realización de estudios a largo plazo sobre la regulación del ciclo de la urea (Felipo *et al.*, 1988a; Grau *et al.*, 1992), alteración de los niveles de tubulina en cerebro (Felipo *et al.*, 1988b; Minana *et al.*, 1988a; 1988b) y de los niveles de ATP y otros metabolitos en hígado y cerebro (Kosenko *et al.*, 1994). Este modelo se ha empleado también para estudiar el efecto de la hiperamonemia crónica sobre la función cognitiva, especialmente la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada (Aguilar *et al.*, 2000) y motora. También se ha utilizado para investigar los mecanismos responsables de las alteraciones cognitivas y motoras, incluyendo la función de vías de transducción de señales en cerebro in vivo (Hermenegildo *et al.*, 1998) y la potenciación a largo plazo o LTP en hipocampo (Munoz *et al.*, 2000) y para evaluar la utilidad de distintos tratamientos terapéuticos para revertir el deterioro cognitivo y motor (De Flora *et al.*, 1996; Erceg *et al.*, 2005a; 2005b)

### 3. EFECTOS DE LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA SOBRE LA FUNCIÓN MOTORA

#### 3.1. Alteraciones motoras en modelos animales de hiperamonemia y encefalopatía hepática crónicas. Mecanismos moleculares

Los pacientes con EHM presentan hipoquinesia y enlentecimiento psicomotor (Dhiman y Chawla, 2009). Las ratas con anastomosis porta-cava (PCS) también presentan hipoquinesia (Bengtsson *et al.*, 1986; Martin, 1986; Steindl *et al.*, 1996; Theander *et al.*, 1997; Cauli *et al.*, 2006; 2009c). Las ratas PCS presentan una menor actividad motora espontánea o hipoquinesia a partir del día 10 desde la operación (Cauli *et al.*, 2009c). También presentan una menor actividad motora vertical (Theander *et al.*, 1997).

Las ratas con ligadura biliar (BDL) presentan alteraciones en la actividad motora espontánea y en la coordinación motora medida con el rotarod (Chan *et al.*, 2004; Jover *et al.*, 2006; Garcia-Ayllon *et al.*, 2008; Rodrigo *et al.*, 2010). La hiperamonemia potencia las alteraciones motoras presentes en las ratas cirróticas por ligadura del conducto biliar (Jover *et al.*, 2006). Las ratas hiperamonémicas sin fallo hepático también tienen disminuida la actividad motora espontánea (Ahabrach *et al.*, 2010; Rodrigo *et al.*, 2010) sugiriendo que la hiperamonemia contribuye al enlentecimiento motor.

### 3.2. Mecanismos que modulan la actividad motora

Los mecanismos que conducen al deterioro de la función cognitiva son diferentes de los mecanismos que conducen, por ejemplo, a hipoquinesia, asterixis o a estado de coma y muerte. Distintos tipos de alteraciones neurológicas son causadas por mecanismos moleculares diferentes, que implican distintas áreas cerebrales y circuitos neuronales.

Uno de los principales circuitos neuronales que modulan la actividad motora es el circuito ganglios basales-tálamo-corteza. Para que se produzca una respuesta motora, tanto estimuladora como inhibidora, es necesario que se transmita una señal a las áreas corticales implicadas en la correcta ejecución del movimiento. Muchas de las señales llegan a la corteza a través del tálamo, que recibe información de los ganglios basales, del cerebelo y de la medula espinal entre otros.

Los ganglios basales están constituidos por cuatro núcleos principales: el cuerpo estriado, globo pálido, núcleo subtalámico, y la sustancia negra (Crittenden y Graybiel, 2011), y están fuertemente conectados a la corteza, al tálamo, y a la amígdala, así como a las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo. La función primaria de los ganglios basales consiste en seleccionar respuestas motoras y de comportamiento adecuadas a un contexto particular.

El estriado es la principal área de integración de la información proveniente de los ganglios basales y constituye una pieza clave en el control de la actividad motora.

En ratas la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) en el núcleo acumbens (NAcc) del estriado induce la liberación de dopamina y aumento de la actividad motora (Wang y Mao, 2000; Canales *et al.*, 2003) por activación del circuito neuronal: núcleo acumbens→pálido ventral→tálamo medio-dorsal→corteza prefrontal. Diferentes neurotransmisores están implicados en la activación de este circuito. La activación de mGluRs en NAcc induce una liberación de dopamina en NAcc, se activan los receptores de dopamina y se induce una liberación de GABA en el pálido ventral (VP). El incremento de GABA extracelular activa a los receptores GABA inhibidores en VP, reduciendo la liberación de GABA en el tálamo medio-dorsal (MDT). La reducción de GABA extracelular en MDT reduce la inhibición de los receptores GABA, aumentando el glutamato extracelular en corteza cerebral, lo cual conduce a un aumento en la actividad motora (Cauli *et al.*, 2007a).

### **3.3. Mecanismos responsables de las alteraciones en la actividad motora en hiperamonemia y EH**

#### **3.3.1. Alteraciones en la función de los circuitos neuronales ganglios basales-tálamo-corteza**

En ratas con encefalopatía hepática crónica por PCS, se altera la función de los circuitos neuronales entre ganglios basales y corteza que modulan la actividad motora (descrito en el apartado 3.2). En ratas PCS, la activación del receptor metabotrópico de glutamato del grupo I (mGluRI) activa un circuito neuronal alternativo que implica al NAcc→sustancia negra pars

## INTRODUCCIÓN

---

reticulata (SNr)→tálamo medio-ventral (VMT)→corteza prefrontal (PFCx). A diferencia de lo que ocurre en ratas controles, la activación del mGluRI no induce una liberación de dopamina en NAcc, sino un aumento de glutamato extracelular. Este glutamato activa los receptores AMPA de las neuronas GABAérgicas del NAcc que proyectan a la SNr, donde liberan GABA. Las neuronas de la SNr proyectan a su vez fibras GABAérgicas al VMT y éste proyecciones glutamatérgicas al PFCx, activándose así un circuito neuronal alternativo (Cauli *et al.*, 2007a).

En ratas PCS la activación de receptores metabotrópicos de glutamato en NAcc también induce un aumento de la actividad motora, como en ratas control, pero lo hace activando un circuito neuronal diferente.

En ratas con hiperamonemia crónica sin fallo hepático la activación del mGluRI en el NAcc induce un aumento tanto de dopamina como de glutamato, activándose tanto el circuito normal descrito en ratas controles como el circuito alternativo observado en ratas PCS (Cauli *et al.*, 2007b).

### 3.3.2. Mecanismos responsables de la hipoquinesia en EH

Como se ha comentado antes, uno de los principales circuitos neuronales que modulan la actividad motora es el circuito ganglios basales-tálamo-corteza. Este circuito está estrechamente regulado en distintos pasos, uno de los cuales ocurre en la sustancia negra pars reticulada (SNr). La activación de los receptores de glutamato o el bloqueo de receptores GABA en la SNr inducen hipolocomoción en ratas normales (Turski *et al.*, 1987; Millan *et*

*al.*, 1989; Trevitt *et al.*, 2002). Contrariamente, antagonistas de receptores de glutamato o agonistas de receptores GABA administrados en SNr inducen hiperlocomoción (Matsui y Kamioka, 1978; Kaur y Starr, 1997; Trevitt *et al.*, 2002; Ravizza *et al.*, 2003).

Las ratas con encefalopatía hepática crónica por anastomosis porta-cava (PCS), presentan hipoquinesia que es debida a un aumento del glutamato extracelular y de la activación del receptor metabotrópico de glutamato mGluR1 en la sustancia negra pars reticulata (SNr). Esto induce un aumento del GABA extracelular en el tálamo ventro-medial (VMT). El aumento de activación de los receptores GABA en VMT reduce la liberación de glutamato en la corteza cerebral y, como resultado, se induce una menor actividad motora o hipoquinesia (Cauli *et al.*, 2006). Bloqueando el receptor mGluR1 en SNr se normaliza la función del circuito y la actividad motora en ratas PCS (Cauli *et al.*, 2006).

### **3.4. Mecanismos que modulan la coordinación motora. Papel de la neurotransmisión GABAérgica**

La coordinación motora se modula principalmente en cerebelo. Los niveles de glutamato extracelular procedente de células granulares o GABA procedente de células de Purkinje u otros tipos celulares presentes en el cerebelo, controlan la coordinación de los actos motores (Hanchar *et al.*, 2005).

## INTRODUCCIÓN

---

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro de mamíferos, donde activa receptores GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>C</sub>, y está implicado en la patogénesis de la EH (Schafer y Jones, 1982). La activación tónica GABAérgica en las células granulares del cerebelo puede alterar la coordinación motora (Hanchar *et al.*, 2005). El GABA liberado desde terminales presinápticos es eliminado de la hendidura sináptica por transportadores de GABA, y este proceso es clave en la terminación de corrientes sinápticas. La captación de GABA por los transportadores mantiene bajos los niveles de GABA en cerebelo, previniendo la activación tónica excesiva de receptores sinápticos y extrasinápticos (Chiu *et al.*, 2005). En cerebelo se han identificado transportadores GABA del subtipo 1 (GAT1) y subtipo 3 (GAT3). La inhibición de GAT1 aumenta los niveles de GABA extracelular (Chiu *et al.*, 2005). Los ratones knock-out para GAT1 tienen disminuida la coordinación motora cuando se evalúa en el rotarod (Chiu *et al.*, 2005).

Distintos estudios han demostrado una relación directa entre un aumento de la concentración extracelular de GABA en cerebelo y una menor coordinación motora (Fassio *et al.*, 1996; Chiu *et al.*, 2005; Hanchar *et al.*, 2005).

Estos datos indican que el aumento del GABA extracelular en cerebelo deteriora la coordinación motora.

Estudios anteriores de nuestro grupo demuestran que existe un aumento del tono GABAérgico en cerebelo de ratas hiperamonémicas, que es consecuencia de un aumento del GABA extracelular, de la expresión de

algunas subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>, y de algunos neuroesteroides que modulan positivamente los receptores GABA<sub>A</sub> (Cauli *et al.*, 2009a). El aumento del tono GABAérgico en cerebelo podría ser responsable de la disminución de la coordinación motora en modelos animales de hiperamonemia y EH.

#### **4. FUNCIÓN COGNITIVA: MEMORIA Y APRENDIZAJE. PAPEL DEL HIPOCAMPO Y DEL CEREBELO**

El aprendizaje es el proceso de adquisición de conocimientos, habilidades o actitudes a través de la experiencia o la educación, lo que origina un cambio persistente, cuantificable y específico en el comportamiento de un individuo. La memoria incluye todos los procesos que permiten el registro, codificación, consolidación, almacenamiento y recuperación de la información (Kandel, 2000). Aprendizaje y memoria son dos procesos relacionados que podrían definirse como dos pasos subsiguientes en la adquisición y elaboración de la información proporcionada por el medio ambiente a través de los sentidos. Aprendizaje implica siempre una forma de adquisición de información y, por lo tanto, una modificación del estado de la memoria del sujeto (Kandel, 2000). En función de su duración, la memoria se divide en dos subtipos: (i) memoria a corto plazo (STM, *short-term memory*) y (ii) memoria a largo plazo (LTM, *long-term memory*). La STM tiene una capacidad limitada y dura sólo un corto período de tiempo. En contraste, la LTM puede almacenar grandes cantidades de información con una duración potencialmente ilimitada. La

## INTRODUCCIÓN

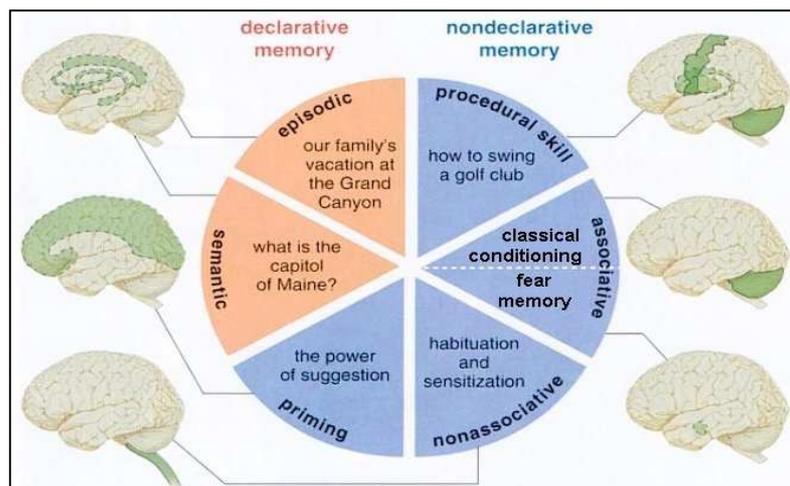
---

memoria también se puede clasificar en memoria declarativa (explícita) y memoria no declarativa (implícita). La memoria declarativa responde a la pregunta “saber qué”, e incluye conocer hechos, lugares, cosas y personas, y el significado de estos hechos. Se subdivide en *memoria episódica*, que incluye eventos experimentados personalmente y depende de la capacidad para recordar el contexto temporal y espacial en que se produjo, y *memoria semántica*, la cual incluye el conocimiento de estos hechos independientes del contexto en el que se aprendieron (Tulving, 1972).

El hipocampo es la principal área involucrada en la memoria declarativa junto con otras estructuras del lóbulo temporal medial (Squire y Zola, 1996). Está implicado en la formación y consolidación de la memoria espacial, como se ha demostrado en distintos estudios de lesión del hipocampo.

Por otro lado, la memoria implícita o no declarativa responde a la pregunta de “cómo”. Incluye la adquisición de habilidades motoras y hábitos y está mediada principalmente por el neocórtex y el cerebelo (Salmon y Butters, 1995).

Existen varias hipótesis acerca de la estructura de la memoria y de la organización, aunque, en general, existe una organización básica admitida (Figura 4). Cualquier tipo de aprendizaje y memoria depende de una red neuronal específica, sin embargo en el sistema nervioso los circuitos están interconectados (Kandel, 2000).



**Figura 4. Clasificación de la memoria según su función. Tipos de comportamiento que originan y áreas que se activan (Kandel, 2000)**

#### 4.1. Papel del hipocampo en procesos de aprendizaje y memoria

El hipocampo es una región cerebral que se curva a lo largo del ventrículo lateral y forma parte del sistema límbico. Se subdivide en giro dentado, complejo subicular e hipocampo propiamente dicho o “Cuerno de Ammon” que a su vez se divide en tres regiones llamadas CA1, CA2 y CA3. El principal tipo celular del hipocampo son las neuronas piramidales que se agrupan en capas bien definidas morfológicamente. Existen además neuronas no piramidales que se distribuyen por todos los estratos y que son interneuronas de los circuitos locales hipocámpicos.

La potenciación a largo plazo (LTP, *long-term potentiation*) es un fenómeno de plasticidad sináptica que consiste en un aumento, persistente

## INTRODUCCIÓN

---

en el tiempo, del tamaño del componente excitador de la respuesta sináptica registrada, que se traduce en un aumento de la eficacia sináptica duradero en el tiempo. La LTP en el hipocampo se considera la base de algunas formas de aprendizaje y memoria (Bliss y Collingridge, 1993; Cooke y Bliss, 2006). Se considera que cambios en la intensidad de la transmisión sináptica entre las neuronas son esenciales en los procesos de aprendizaje y almacenamiento de información en el cerebro. Cuando se someten animales de laboratorio a un aprendizaje se induce LTP en el hipocampo (Moser *et al.*, 1994). Además, existe una correlación significativa entre la magnitud de los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) y la capacidad de aprendizaje de una tarea de memoria espacial (Barnes *et al.*, 1996).

En primates y humanos se ha demostrado que lesiones en el hipocampo deterioran el almacenamiento inicial de ciertas formas de memoria a largo plazo (Squire y Zola-Morgan, 1991). En monos con disfunción del sistema septo-hipocampal inducida por lesiones excitotóxicas en la región CA1 del hipocampo se observa una disminución de la capacidad de aprendizaje de tareas que requieren discriminación condicional (Ridley y Baker, 1997).

Existen distintas teorías que tratan de explicar el papel del hipocampo en la memoria, y todas ellas coinciden en que el hipocampo es requerido para formar relaciones entre estímulos ambientales. No obstante, estas teorías divergen en la función del hipocampo en la memoria a largo plazo. Por un lado, se ha propuesto que el hipocampo almacena temporalmente la información y, durante la consolidación, se transfiere a la neocorteza (memoria declarativa). Alternativamente, se ha sugerido que la información (mapas espaciales o contexto de un episodio) se almacena en el hipocampo

o que el hipocampo retiene un índice que sirve para unir la información neocortical (Koehl y Abrous, 2011).

El hipocampo juega un papel esencial en la modulación del aprendizaje y la memoria espacial. Se describen a continuación algunos tests utilizados en modelos animales para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial y que se modulan esencialmente en hipocampo.

### **4.1.1. Tests de memoria espacial en modelos animales: Laberinto acuático de Morris, Laberinto radial, Memoria de la localización de un objeto**

Los animales necesitan para su supervivencia disponer de un buen sistema de orientación espacial. Para ello desarrollan estrategias de navegación que les permiten localizar y memorizar el lugar donde se encuentra la comida, el agua, su madriguera, etc. Interpretan las informaciones sensoriales que captan durante la exploración de su entorno y así construyen mapas espaciales para guiarse.

La realización de tests de aprendizaje y memoria en experimentos con animales de laboratorio, permite estudiar los mecanismos que regulan los distintos tipos de aprendizaje y memoria y evaluar los cambios de comportamiento inducidos por una situación patológica, alteraciones genéticas, un tratamiento dado, o activación/desactivación de receptores específicos, entre otros estudios. Existen diferentes tipos de test que permiten evaluar la capacidad de aprendizaje y la memoria espacial del animal:

## INTRODUCCIÓN

---

- El laberinto acuático de Morris (*Morris Water Maze*, MWM) es el test más utilizado para investigar aspectos específicos de la memoria espacial. El test consiste en poner al animal en una especie de piscina llena de agua en la que hay una plataforma escondida que el animal tiene que encontrar. Tras sucesivos ensayos debe aprender donde está la plataforma y nadar directamente hacia ella para escapar del agua (*ver procedimiento en Material y Métodos, apartado 6.3., página 93*).

Este test es particularmente sensible a los efectos del envejecimiento. Algunos autores sugieren que la disminución en el aprendizaje espacial relacionado con la edad se debe a cambios en la función y en la morfología del hipocampo (Gallagher y Nicolle, 1993; Geinisman *et al.*, 1995). Existen evidencias de la implicación del hipocampo en el aprendizaje espacial en el MWM (McNaughton *et al.*, 1996; Bures *et al.*, 1997; Poucet y Benhamou, 1997; Whishaw *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 1998; Poucet *et al.*, 2000). El hipocampo es necesario en la adquisición, consolidación/almacenamiento y recuperación de información espacial. Se ha propuesto que, en el MWM, el hipocampo y procesos de plasticidad sináptica como la LTP juegan un papel esencial en la determinación por el animal de su posición en un ambiente y en la memoria para repetir una ruta en este ambiente (Redish y Touretzky, 1998). No obstante, no se conocen en detalle los mecanismos por los que el hipocampo modula el aprendizaje espacial.

Todos los tipos de aprendizaje, incluido el MWM, dependen de la acción coordinada de diferentes áreas cerebrales y circuitos neuronales,

aunque cada tipo de aprendizaje parece estar modulado principalmente en áreas cerebrales concretas (D'Hooge y De Deyn, 2001).

- En el laberinto radial de 8 brazos, la ejecución de la tarea también requiere memoria espacial y es sensible a la edad y al daño en el hipocampo. El animal, en sucesivos ensayos, debe explorar el ambiente que le rodea y aprender en que brazo del laberinto está localizada la comida (*ver procedimiento en Material y Métodos, apartado 6.2 , página 91*). Evaluamos los errores de referencia espacial (cuantas veces entra en un brazo sin comida) y los errores de memoria de trabajo (cuantas veces entra en un brazo que ya ha visitado durante ese mismo ensayo). Existen evidencias que indican una disociación funcional entre el hipocampo dorsal y ventral, estando el primero implicado de forma preferencial en el aprendizaje espacial en el laberinto radial (Pothuizen *et al.*, 2004).

#### **4.2. Papel del cerebelo en procesos de aprendizaje y memoria**

Observaciones clínicas realizadas durante décadas han mostrado que el cerebelo es la principal área cerebral responsable de la regulación de determinados aspectos de la función y la coordinación motoras (Snider *et al.*, 1976; Schmahmann, 1991). Otros estudios evidencian el papel del cerebelo en el aprendizaje motor (Vezina y Kim, 1999), en la memoria de trabajo (Desmond *et al.*, 1997; Wiggs *et al.*, 1999) y en ciertas funciones cognitivas no motoras (Arriada-Mendícoa *et al.*, 1999).

## INTRODUCCIÓN

---

Se ha demostrado recientemente la implicación del cerebelo en diversos tipos de procesos cognitivos, como la atención visuo-espacial, navegación espacial, mecanismos de aprendizaje, planificación y adecuación temporal y en la modulación de la función verbal (Gordon, 2007; Oliveri *et al.*, 2007). Algunos tipos de aprendizaje, como la respuesta de parpadeo condicionada, también se forman y almacenan en el cerebelo (Krupa *et al.*, 1993; Krupa y Thompson, 1995). El cerebelo también juega un papel en el aprendizaje espacial que no se limita a los componentes motores sino que incluye componentes cognitivos del aprendizaje espacial (Martin *et al.*, 2003). Además, existen datos que apoyan que la función de la vía glutamato-óxido nítrico (NO)-GMPc en cerebelo modula algunos tipos de aprendizaje, incluyendo la capacidad de aprendizaje de una tarea en el laberinto en Y (Yamada *et al.*, 1996; Erceg *et al.*, 2005a; Piedrafita *et al.*, 2007; Llansola *et al.*, 2009).

### **4.2.1. Aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y**

El cerebelo controla ciertos tipos de aprendizaje, como la capacidad de aprender una tarea de discriminación condicionada visuo-espacial en un laberinto en Y. Se utiliza un laberinto en forma de Y (Figura 5), en el que uno de los brazos es el brazo de salida, donde se coloca al animal y los otros dos son los brazos de elección. Las paredes del laberinto pueden ser blancas o negras. En función del color del laberinto la comida se coloca al final del brazo derecho o del izquierdo. El objetivo del test es que el animal aprenda

a asociar el color del laberinto y el brazo donde está la comida (*ver procedimiento en Material y Métodos, apartado 6.1, página 90*). Es una tarea de discriminación porque el animal aprende una estrategia de orientación basada en un estímulo condicional (color de las paredes del laberinto) (Aguilar *et al.*, 2000; Erceg *et al.*, 2005a). Este tipo de test se ha utilizado ampliamente en nuestro laboratorio para investigar los mecanismos de las alteraciones cognitivas en EH. Nuestro grupo demostró que la hiperamonemia o EH crónicas, disminuyen la capacidad de aprender esta tarea (Aguilar *et al.*, 2000). El estudio de los mecanismos moleculares ha mostrado que la capacidad de aprender la tarea en el laberinto en Y está modulada por la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo (Yamada *et al.*, 1996; Erceg *et al.*, 2005a; 2006; Cauli *et al.*, 2007c; Piedrafita *et al.*, 2007; Llansola *et al.*, 2009).

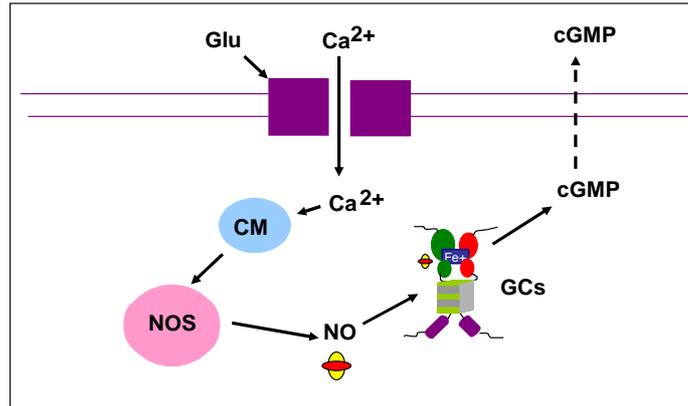


**Figura 5. Tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y.**

Se realiza en un laberinto de madera con tres brazos idénticos en longitud y en forma de Y. Uno de los brazos se elige como salida y los otros dos son los brazos de elección. Dependiendo del color del laberinto se colocan los “pellets” de comida en la parte más distal de uno u otro brazo de elección. Cuando el laberinto es negro se colocan los pellets al final del brazo izquierdo. Cuando el laberinto es blanco se colocan los pellets al final del brazo derecho. El animal debe aprender la asociación entre el color del laberinto y el brazo correcto en el cual se localiza la comida y dirigirse directamente al brazo donde se encuentra la comida. Este test requiere restricción de la dieta durante el tiempo que dura el pre-test y el test para que el refuerzo en forma de comida tenga el efecto esperado.

### 5. PAPEL DE LA VÍA GLUTAMATO-ÓXIDO NÍTRICO-GMPc EN PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA

El receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) es un tipo de receptor ionotrópico de glutamato que está implicado en procesos de plasticidad sináptica y de memoria y aprendizaje. Una de las vías de transducción de señales asociada al receptor NMDA es la vía glutamato-óxido nítrico (NO)-GMP cíclico (Figura 6). La activación del receptor NMDA aumenta el calcio en la neurona postsináptica. El  $\text{Ca}^{2+}$  se une a la calmodulina (CM), presente en la densidad postsináptica. El complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina modula la actividad de una serie de proteínas, entre ellas la óxido nítrico sintasa (NOS). Esta enzima sintetiza óxido nítrico (NO) a partir de arginina (Garthwaite *et al.*, 1988; Kiedrowski *et al.*, 1992; Rodriguez-Alvarez *et al.*, 1996). El óxido nítrico, entre otros efectos, activa la guanilato ciclasa soluble (GCs) cuando se une a su grupo hemo. El óxido nítrico es un gas y puede difundir de la célula en la que se ha formado y activar la guanilato ciclasa de células vecinas. La guanilato ciclasa soluble es un heterodímero constituido por una subunidad  $\alpha$  y otra  $\beta$ , ambas necesarias para la actividad del enzima, que cataliza la conversión de GTP a GMP cíclico (GMPc), que actúa como segundo mensajero intracelular. Parte del GMPc formado cuando se activa la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc se libera al medio extracelular y, en condiciones adecuadas, la concentración de GMPc extracelular es una buena medida del grado de activación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc en cerebro *in vivo*.



**Figura 6. Vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico, asociada al receptor NMDA** La activación del receptor NMDA aumenta el calcio en la neurona post-sináptica, el calcio se une a la calmodulina (CM) y activa la óxido nítrico sintasa neuronal (NOS). El óxido nítrico (NO) formado activa a su vez la guanilato ciclasa soluble (sGC), que forma GMP cíclico (cGMP), parte del cual se libera al medio extracelular.

El GMPc actúa como segundo mensajero modulando canales iónicos dependientes de GMPc, fosfodiesterasas y proteínas-quinasas dependientes de GMPc.

La vía glutamato-óxido nítrico-GMPc modula importantes procesos cerebrales como la comunicación intercelular, la liberación de algunos neurotransmisores en algunas áreas cerebrales, los ritmos circadianos, la potenciación a largo plazo (LTP), y algunas formas de memoria y aprendizaje. La inhibición de cualquiera de los pasos de la vía glutamato-óxido nítrico (NO)-GMP cíclico deteriora algunos tipos de memoria y aprendizaje.

### 5.1. El bloqueo del receptor NMDA altera procesos de aprendizaje y memoria espacial

Antagonistas, tanto competitivos como no competitivos, del receptor NMDA alteran los procesos de aprendizaje y memoria en el laberinto en Y (Parada-Turska y Turski, 1990; Maurice *et al.*, 1994). La administración de antagonistas del receptor NMDA durante el preentrenamiento altera la adquisición de tareas de evitación pasiva (Riekkinen *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997), evitación activa, tareas visuoespaciales (Murray y Ridley, 1997) y tareas de condicionamiento clásico (Xu, 1997).

Si la administración se realiza después del entrenamiento disminuye la capacidad para aprender tareas espaciales en el laberinto acuático de Morris (Packard y Teather, 1997) y tareas de evitación pasiva y activa (Cestari y Castellano, 1997).

Antagonistas de los receptores NMDA, bloquean la inducción de la LTP y disminuyen la capacidad de aprendizaje espacial en el laberinto acuático (Morris *et al.*, 1986; Davis *et al.*, 1992).

Existen también estudios genéticos que apoyan el papel de los receptores NMDA en ciertos tipos de aprendizaje (McHugh *et al.*, 1996; Tsien *et al.*, 1996; Huerta *et al.*, 2000; Rampon *et al.*, 2000). Los ratones *knockout* para el gen que codifica la subunidad NR2A del receptor NMDA tienen disminuida la LTP en hipocampo y la capacidad de aprendizaje espacial (Sakimura *et al.*, 1995). Por otra parte, la sobreexpresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA en ratones transgénicos potencia la activación

del receptor NMDA, facilita la potenciación sináptica y mejora el aprendizaje y la memoria (Tang *et al.*, 1999).

### **5.2. Papel del NO en los mecanismos de plasticidad sináptica y memoria espacial**

El NO también juega un papel importante en los mecanismos de plasticidad sináptica y en la formación de la memoria espacial (Chapman *et al.*, 1992; Yamada *et al.*, 1995). La inhibición de la óxido nítrico sintasa: (i) reduce el aprendizaje de diversas tareas espaciales tales como el laberinto en T o el laberinto radial (Ingram *et al.*, 1998a; Ingram *et al.*, 1998b; Zou *et al.*, 1998) y (ii) altera la memoria implicada en el reconocimiento de objetos y el aprendizaje de tareas de evitación pasiva (Myslivecek, 1997; Prickaerts *et al.*, 1997).

### **5.3. Papel del GMPc en aprendizaje y memoria espacial**

El GMPc está implicado en procesos tempranos de consolidación de la memoria (Bernabeu *et al.*, 1996; Bernabeu *et al.*, 1997). La microinyección bilateral intrahipocampal de un análogo permeable de GMPc mejora el aprendizaje de una tarea de evitación pasiva (Bernabeu *et al.*, 1996) y un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble reduce los niveles de GMPc y causa amnesia para dicha tarea cuando se suministra inmediatamente después del entrenamiento (Bernabeu *et al.*, 1997). Por otra parte, el aumento de los niveles de GMPc por administración de zaprinast, un inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa que degrada GMPc o por microinyección de un análogo

## INTRODUCCIÓN

---

de GMPc que atraviesa libremente las membranas, el 8-Br-GMPc, en el hipocampo dorsal mejora los resultados en la tarea de reconocimiento de objetos (Prickaerts *et al.*, 1997; Prickaerts *et al.*, 2002). Estos datos indican que el GMPc formado por la guanilato ciclasa en respuesta al NO juega un papel esencial en determinados tipos de aprendizaje y memoria.

Así pues, la activación de la vía glutamato-NO-GMPc y el aumento de GMPc asociado, modula en hipocampo diferentes tipos de aprendizaje y memoria espacial.

### **5.4. Papel de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo en el aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y**

La activación de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo modula algunos tipos de aprendizaje, como la tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y. La reducción de la función de esta vía en cerebelo reduce la capacidad de aprendizaje de esta tarea en ratas (Yamada *et al.*, 1996; Erceg *et al.*, 2005a; 2005b; Piedrafita *et al.*, 2008) y su aumento mejora el aprendizaje (Cauli *et al.*, 2007c; 2009a; Llansola *et al.*, 2009).

Yamada *et al.* (1996) demostraron que bloqueando el receptor NMDA con dizocilpina o inhibiendo la óxido nítrico sintasa disminuía el aprendizaje en el laberinto en Y en ratones. Sugirieron que la disminución en la producción de NO-GMPc en el cerebro podría ser responsable del deterioro inducido por la dizocilpina en el aprendizaje. Comprobaron que la

dizocilpina reducía la concentración de GMPc sólo en el cerebelo y no en otras áreas cerebrales. Además, el deterioro inducido por la dizocilpina en el aprendizaje se reducía administrando análogos de GMPc. Así pues, Yamada et al. (1996) proponen que el cerebelo es la principal región cerebral implicada en la modulación de este tipo de aprendizaje. Estos datos indican que la activación de la vía glutamato-NO-GMPc, y en consecuencia el incremento de GMPc producido por la guanilato ciclasa en respuesta a la activación de receptores NMDA y de la óxido nítrico sintasa en cerebelo tienen un papel crucial en algunos tipos de aprendizaje, incluyendo la tarea en el laberinto en Y.

Situaciones que aumentan la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo in vivo como la exposición perinatal a PBDE99 también aumentan la capacidad de aprender la tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y (Llansola *et al.*, 2009).

Por otra parte, tanto la función de la vía en cerebelo como la capacidad de aprender la tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y disminuyen en paralelo con la edad (Piedrafita *et al.*, 2007).

### **6. MECANISMOS DE MODULACIÓN DE LA VÍA GLUTAMATO-ÓXIDO NÍTRICO-GMPc**

La vía glutamato-NO-GMPc tiene múltiples sitios de regulación. Cada uno de sus pasos está regulado por diversos mecanismos. La función de la vía glutamato-NO-GMPc en su conjunto se puede modular a nivel de la

## INTRODUCCIÓN

---

activación del receptor NMDA, la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, la actividad de la NOS, los niveles de NO, la activación de la guanilato ciclasa y los niveles de GMPc. Se resumen brevemente algunos de los mecanismos de regulación de la vía glutamato-NO-GMPc más relevantes en el contexto de esta tesis.

Para activarse el receptor NMDA necesita, además del glutamato, la presencia de un co-agonista (glicina). El receptor tiene varios sitios de unión donde se unen distintos tipos de compuestos que modulan su función. Ciertas poliaminas, al igual que la glicina, modulan positivamente el canal, mientras que el zinc o un exceso de protones lo modulan negativamente. El receptor NMDA comparte características funcionales de canales regulados por ligando y de canales sensibles al voltaje. En condiciones normales, cuando el potencial de membrana está próximo al valor de reposo, el canal del receptor NMDA está bloqueado por  $\text{Mg}^{2+}$ . Este bloqueo es dependiente de voltaje y se elimina cuando la membrana se despolariza, permitiendo el paso de iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  y  $\text{K}^{+}$ .

La óxido nítrico sintasa (NOS) está sujeta a diferentes tipos de regulación tanto a nivel transcripcional como post-traducciona. A nivel post-traducciona, los principales mecanismos que regulan la actividad de la NOS son su fosforilación en diferentes residuos y su interacción con otras proteínas reguladoras y estructurales que regulan su actividad y su localización en la célula. Algunas de estas proteínas cuando se unen a las NOS inducen cambios alostéricos (activadores alostéricos), otras inhiben sus actividad (inhibidores), y otras son proteínas adaptadoras y de andamiaje que permiten la unión de las NOS a diferentes complejos de proteínas y

receptores que regulan la localización y la actividad de las NOS y su activación en respuesta a distintos estímulos.

La NOS neuronal (nNOS) puede ser regulada por fosforilación por distintas protein-quinasa, como las protein-quinasa dependientes de AMPc (PKA) (Brune y Lapetina, 1991), y GMPc (PKG) (Dinerman *et al.*, 1994), PKC (Okada, 1995), y por diferentes quinasa dependientes de calcio-calmodulina (CaMK) (Hayashi *et al.*, 1999). La fosforilación de la nNOS induce un aumento o una disminución de su actividad dependiendo del residuo fosforilado.

Una de las proteín-quinasa que modulan la actividad de la nNOS es la CaMKII. La CaMKII se activa por autofosforilación en la Thr 286 y fosforila la nNOS en la Ser 847, disminuyendo su actividad (Hayashi *et al.*, 1999; Komeima *et al.*, 2000). Esta fosforilación se puede inhibir por inhibidores de la CaMKII (Osuka *et al.*, 2002).

La CaMKII pertenece a la familia de proteín-quinasa dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina. La CaMKII fosforila diferentes sustratos, incluida la nNOS, y está implicada en la regulación de muchos aspectos de la respuesta al calcio de la función celular como: regulación del metabolismo de aminoácidos y lípidos, de canales iónicos y de receptores, de la síntesis y liberación de neurotransmisores, de la organización del citoesqueleto, la plasticidad sináptica y el aprendizaje y la formación de memoria. La CaMKII consta de un dominio catalítico en el extremo aminoterminal con el sitio de unión de ATP y del sustrato, seguido por un dominio autorregulador dónde la CaMKII se autofosforila en diferentes residuos (286, 305 y 306) y un dominio de asociación en el extremo carboxiterminal.

## INTRODUCCIÓN

---

La CaMKII tiene la capacidad de regularse por autofosforilación en diferentes residuos. La CaMKII en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra inactiva. Tras la entrada del calcio, éste se une a la calmodulina y el conjunto  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  se une a la CaMKII activándola y estimulando su autofosforilación en el residuo de treonina 286. Esta autofosforilación le permite fosforilar varios sustratos y regular diferentes funciones celulares dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando se disocia de la  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , la CaMKII sigue activa independientemente del  $\text{Ca}^{2+}$  pero con un nivel de actividad más bajo (20-80% de su actividad máxima). Para mantenerse activa en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  la CaMKII se autofosforila en las treoninas 305 y 306. La CaMKII fosforilada en Thr 286/Thr 305/Thr 306 es una forma activa (20-80%) de la CaMKII pero es incapaz de unirse a  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . La CaMKII se defosforila por diferentes proteínas fosfatasas que se encargan de devolverla a su estado inactivo. Las fosfatasas que la defosforilan son diferentes según su localización subcelular. La CaMKII citosólica se defosforila principalmente por la proteína-fosfatasa PP2A, mientras que la CaMKII que se encuentra en las densidades postsinápticas se defosforila principalmente por la proteína fosfatasa PP1 (Strack *et al.*, 1997).

La CaMKII es uno de los principales moduladores de la función de la vía glutamato-NO-GMPc. Modula la actividad de la nNOS, a la que fosforila en la Ser847, reduciendo su actividad y, en consecuencia, la formación de NO y la función de la vía glutamato-NO-GMPc.

La función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc, asociada al receptor ionotrópico de glutamato NMDA, se modula también por otro tipo de receptor ionotrópico, el receptor  $\text{GABA}_A$ , que se activa por GABA. La

activación de los receptores GABA<sub>A</sub> reduce la función de la vía (Fedele *et al.*, 1997; 2000; Cauli *et al.*, 2009a). Contrariamente, la nicotina es capaz de inducir la activación de la vía (Fedele *et al.*, 1998).

La vía NO-GMPc en cerebelo está modulada también por receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) (Yamada y Nabeshima, 1997; Fedele y Raiteri, 1999; Chen *et al.*, 2001; Boix *et al.*, 2011; Cabrera-Pastor *et al.*, 2012). En cultivos de neuronas cerebelares el receptor metabotrópico mGluR5, pero no el mGluR1, regula la activación de la NOS mediada por el receptor NMDA (Llansola y Felipe, 2010).

Tres tipos de receptores de glutamato: mGluR5, AMPA y NMDA cooperan en la modulación del grado y duración de la activación de la vía NO-cGMP en cerebelo *in vivo*. La activación del mGluR5 induce un aumento del glutamato extracelular, el cual activa receptores AMPA, activándose la óxido nítrico sintasa y aumentando la formación de NO, que activa la guanilato ciclasa, aumentando el GMPc. La respuesta mediada por los receptores AMPA se desensibiliza rápidamente. La activación de los receptores AMPA también induce una despolarización leve que permite la activación del receptor NMDA, prolongándose en el tiempo la activación de la vía glutamato-NO-GMPc iniciada por la activación de los receptores AMPA (Boix *et al.*, 2011).

### **7. ALTERACIONES COGNITIVAS EN MODELOS ANIMALES DE HIPERAMONEMIA Y ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA CRÓNICAS.**

Las ratas con hiperamonemia crónica sin fallo hepático tienen disminuida la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y (Aguilar *et al.*, 2000; Erceg *et al.*, 2005a; Rodrigo *et al.*, 2010).

Las ratas con ligadura biliar (BDL) muestran un deterioro en la capacidad de aprendizaje de la tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y (Rodrigo *et al.*, 2010), del aprendizaje espacial en el test del laberinto acuático de Morris (Huang *et al.*, 2004) y en el test de reconocimiento de objetos (Garcia-Ayllon *et al.*, 2008).

Las ratas con EH debida a PCS tienen disminuida la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y (Erceg *et al.*, 2005a; Cauli *et al.*, 2007c) y el aprendizaje espacial evaluado con el test de Morris (Monfort *et al.*, 2007; Mendez *et al.*, 2008). El test del laberinto acuático de Morris (MWM) se utiliza para medir la memoria espacial en ratas. Las ratas con anastomosis porta-cava (PCS) necesitan más tiempo que las ratas control para encontrar la plataforma y permanecen menos tiempo en el cuadrante de la piscina donde se situaba la plataforma por tanto, tienen disminuida la capacidad de aprender y memorizar la tarea del MWM. Se ha propuesto que la capacidad de aprender y recordar esta tarea es dependiente de la LTP en hipocampo (Morris, 1989; Grant y Silva, 1994). Las ratas con EH debida a anastomosis porta-cava

tienen disminuida la LTP en hipocampo. La aplicación del tétano, que en ratas normales aumenta al doble los potenciales excitatorios post-sinápticos, no los aumenta en ratas PCS (Monfort *et al.*, 2007).

Este deterioro de la LTP en hipocampo sería responsable de la disminución de la capacidad de aprendizaje en el laberinto acuático de Morris.

El deterioro de la LTP es consecuencia de la alteración en la activación de la vía glutamato-NO-GMPc.

La hiperamonemia reduce la magnitud de la LTP dependiente del receptor NMDA en la región CA1 del hipocampo de rata (Munoz *et al.*, 2000). La aplicación del tétano para inducir la LTP en este área induce la activación de la vía glutamato-NO-GMPc. El GMPc formado activa la protein-quinasa dependiente de GMPc (PKG), que fosforila y activa la fosfodiesterasa 5 (PDE 5) que degrada GMPc disminuyendo sus niveles por debajo de la concentración basal inicial. La activación secuencial de esta vía es necesaria para la correcta inducción y mantenimiento de la LTP (Monfort *et al.*, 2002).

La inhibición de cualquiera de estos pasos impide la correcta formación y mantenimiento de la LTP. En cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas, la activación de la PKG es transitoria, y en consecuencia la activación de la PDE5 y la disminución de GMPc también son transitorias (Monfort *et al.*, 2005) impidiendo la correcta inducción de la LTP.

Las ratas con EH debida a PCS también tienen alterada la LTP en hipocampo como consecuencia de alteraciones en la vía de glutamato-NO-

## **INTRODUCCIÓN**

---

GMPc. La transmisión sináptica glutamatérgica en el hipocampo de ratas PCS presenta las siguientes alteraciones: (i) alteración de la fosforilación de los receptores NMDA y AMPA y (ii) disminución de su expresión en membrana y (iii) reducción de la magnitud de los potenciales postsinápticos excitatorios inducidos tras la activación de los receptores NMDA y AMPA. Como consecuencia de la reducción de la función de estos receptores, la aplicación del tétano no induce activación de la guanilato ciclasa soluble ni el subsiguiente cambio en GMPc ni en la actividad fosfodiesterasa que degrada GMPc y por tanto no se induce la LTP (Monfort *et al.*, 2007). Esto contribuiría al deterioro de la capacidad de aprendizaje y de la memoria espacial en el Morris water maze.

### **8. LA DISMINUCIÓN DE LA FUNCIÓN DE LA VÍA GLUTAMATO-NO-GMPc EN CEREBELO ES RESPONSABLE DE LA DISMINUCIÓN DE LA CAPACIDAD DE APRENDIZAJE DE UNA TAREA DE DISCRIMINACIÓN CONDICIONADA EN ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA E HIPERAMONEMIA CRÓNICAS**

La capacidad de aprender la tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y está disminuida en ratas con encefalopatía hepática por PCS debido a la reducción de la función de la vía glutamato-NO-GMPc y de la formación de GMPc en respuesta a la activación del receptor NMDA en cerebelo.

La capacidad de aprendizaje de esta tarea puede ser restaurada en ratas PCS mediante diversos tratamientos que restauran la función de la vía y los niveles de GMPc en cerebelo. El tratamiento con inhibidores de la fosfodiesterasa 5, que degrada el GMPc, recuperan los niveles de GMPc y el aprendizaje (Erceg *et al.*, 2005b). Esto se puede conseguir tanto por administración intracerebral de zaprinast (Erceg *et al.*, 2005a) como por administración oral de sildenafil (Erceg *et al.*, 2005b), dos inhibidores de la fosfodiesterasa 5.

Las ratas PCS son hiperamonémicas y presentan neuroinflamación (Cauli *et al.*, 2007c). El tratamiento con ibuprofeno, un antiinflamatorio, reduce la neuroinflamación pero no la hiperamonemia, y también restaura la función de la vía y la capacidad de aprendizaje en ratas PCS (Cauli *et al.*, 2007c), indicando que la neuroinflamación juega un papel esencial en el deterioro de la vía y del aprendizaje en el laberinto en Y.

Las ratas hiperamonémicas sin fallo hepático, también tienen disminuida la función de la vía (Hermenegildo *et al.*, 1998) y la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y (Aguilar *et al.*, 2000). El tratamiento de las ratas hiperamonémicas con inhibidores de fosfodiesterasas también restaura la función de la vía glutamato-NO-GMPc y la capacidad de aprendizaje (Erceg *et al.*, 2005a). Se ha demostrado que la hiperamonemia crónica per se induce la activación de la microglía y neuroinflamación, contribuyendo a las alteraciones cognitivas y motoras que ocurren en la EH (Rodrigo *et al.*, 2010). El tratamiento con ibuprofeno de las ratas hiperamonémicas también restaura la función de la vía y el aprendizaje. Esto indica que la

## **INTRODUCCIÓN**

---

neuroinflamación media los efectos de la hiperamonemia sobre la vía y el aprendizaje (Rodrigo *et al.*, 2010).

Todos estos datos demuestran que la disminución de la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y en hiperamonemia y encefalopatía hepática es debida a la disminución en la función de la vía glutamato-NO-GMPc.

### **8.1. Mecanismos que contribuyen a las alteraciones de la vía glutamato-NO-cGMP en cerebelo en hiperamonemia y encefalopatía hepática crónicas**

La función de la vía glutamato-NO-GMPc está disminuida en cerebelo in vivo en ratas con hiperamonemia crónica (Hermenegildo *et al.*, 1998) o con encefalopatía hepática debida a anastomosis porta-cava (Monfort *et al.*, 2001). Distintos mecanismos contribuyen a la disminución de la función de la vía en cerebelo.

#### **8.1.1. Papel de la neuroinflamación en el deterioro cognitivo en hiperamonemia y encefalopatía hepática crónicas**

Cada vez hay más evidencias que apoyan la idea de que la inflamación coopera con la hiperamonemia en la inducción de las alteraciones neurológicas en pacientes con EH o EHM (Odeh *et al.*, 2004; Shawcross *et al.*, 2004; Odeh *et al.*, 2005; Montoliu *et al.*, 2009). Los modelos animales de EH también presentan neuroinflamación (Cauli *et al.*, 2007c; Rodrigo *et al.*, 2010). Existen datos experimentales que indican que tratamientos

terapéuticos dirigidos a reducir la inflamación podrían prevenir el progreso de la EH y sus complicaciones. El tratamiento con ibuprofeno, un antiinflamatorio no esteroideo, reduce la neuroinflamación y restaura la función cognitiva y motora de ratas PCS (Cauli *et al.*, 2007c). Sin embargo, los antiinflamatorios no esteroideos no pueden utilizarse en pacientes cirróticos en estado avanzado porque les producen serios efectos secundarios en riñón. Por tanto, se están buscando dianas terapéuticas que permitan reducir la neuroinflamación sin afectar la función renal. Otra diana antiinflamatoria es la MAPK p38. La actividad de la p38 está aumentada en ratas PCS. El tratamiento con un inhibidor de p38 reduce la activación de la microglía, la neuroinflamación y los marcadores inflamatorios en cerebro y sangre, y restaura la capacidad de aprendizaje y la actividad y coordinación motora en ratas PCS (Agusti *et al.*, 2011).

### **8.1.2. Aumento de la activación tónica del receptor NMDA**

En cortes frescos de cerebelo de ratas con hiperamonemia crónica están disminuidas la función de la vía glutamato-NO-GMPc, la actividad NOS y su activación en respuesta a la activación del receptor NMDA. Estas alteraciones reproducen las encontradas en cerebelo *in vivo*, por lo que estos cortes son un buen modelo para estudiar los mecanismos implicados.

La hiperamonemia crónica disminuye la actividad de la nNOS en condiciones basales debido a un aumento en la actividad de la CaMKII por fosforilación en su residuo de treonina Thr 286 que induce un aumento de la fosforilación en el residuo de Serina 847 en la nNOS.

## INTRODUCCIÓN

---

Por otro lado, la menor activación de la nNOS en respuesta a la activación del receptor NMDA es debida a una alteración de la localización subcelular de la nNOS, con una disminución del contenido en membranas sinápticas y un aumento en el citosol.

Tanto la disminución de la actividad basal de la nNOS como la disminución en su activación son debidas a un aumento en la activación tónica del receptor NMDA en hiperamonemia. Así pues, el bloqueo del receptor NMDA con MK801 (i) restaura el contenido de la nNOS en las membranas postsinápticas y lo disminuye en citosol, (ii) normaliza la fosforilación de la CaMKII en la Thr 286 y la de la nNOS en la Ser 847, (iii) restaura la actividad basal de la nNOS y la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cortes de ratas hiperamonémicas (El-Mlili *et al.*, 2008; 2010).

En cerebelo in vivo, la hiperamonemia crónica también (i) disminuye la función de la vía glutamato-NO-GMPc y el aumento de GMPc inducido por la activación del receptor NMDA (Hermenegildo *et al.*, 1998), (ii) disminuye la activación de la nNOS tras la activación del receptor NMDA (Rodrigo *et al.*, 2007) y (iii) disminuye la activación de la guanilato ciclasa soluble por NO. Si se administra SNAP, un agente generador de NO que activa directamente la guanilato ciclasa soluble, se induce un aumento de GMPc significativamente menor en ratas hiperamonémicas que en ratas control (Hermenegildo *et al.*, 1998). En cerebelo in vivo, al igual que en cortes frescos de cerebelo, hay un aumento de la activación tónica del receptor NMDA y la administración de MK801 restaura la función de la vía glutamato-NO-GMPc en hiperamonemia crónica (ElMlili *et al.*, 2010).

El aumento de la activación tónica del receptor NMDA y la consiguiente disminución de la función de la vía glutamato-NO-GMPc en hiperamonemia crónica podría considerarse una respuesta adaptativa para evitar la muerte neuronal inducida por la activación excesiva del receptor NMDA, como ocurre en situaciones agudas con dosis altas de amonio. No obstante, esta respuesta adaptativa tiene efectos perjudiciales que contribuyen a las alteraciones neurológicas observadas en la hiperamonemia crónica y encefalopatía hepática.

### **8.1.3. Alteraciones en la activación de receptores AMPA y metabotrópicos de glutamato**

El receptor NMDA coopera con los receptores AMPA y metabotrópicos de glutamato (mGluRs) en la modulación del grado y la duración de la activación de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo in vivo (Fedele y Raiteri, 1996). En cultivo de neuronas cerebelares, el receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5) modula la función de la vía NO-GMPc (Llansola y Felipo, 2010).

La hiperamonemia crónica altera la función de los mGluRs en cultivos primarios (Llansola *et al.*, 2005) y en cerebro in vivo (Canales *et al.*, 2003).

In vivo, la hiperamonemia crónica altera la modulación de la vía NO-GMPc por receptores mGluR5 y AMPA en cerebelo. Reduce la liberación de glutamato y la activación de la vía NO-GMPc en respuesta a la activación del receptor mGluR5. También reduce la activación de la vía en

## **INTRODUCCIÓN**

---

respuesta a la activación de receptores AMPA de baja afinidad y aumenta la activación por receptores AMPA de alta afinidad (Cabrera-Pastor *et al.*, 2012).

La alteración en la modulación de los receptores AMPA y mGluR5 podría estar implicada en el daño de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo de ratas hiperamonémicas y encefalopatía hepática.

### **8.1.4. Aumento del tono GABAérgico**

El aumento de la activación de los receptores GABA reduce la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo (Fedele *et al.*, 2000) y en corteza cerebral (Pepicelli *et al.*, 2004). En ratas hiperamonémicas, la activación tónica de los receptores GABA<sub>A</sub> está aumentada en cerebelo (Cauli *et al.*, 2009a), lo que contribuye a la disminución de la función de la vía glutamato-NO-GMPc. El bloqueo de los receptores GABA con bicuculina restaura la función de la vía en cerebelo y la capacidad de aprendizaje de la tarea en el laberinto en Y (Cauli *et al.*, 2009a).

## **9. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DEL GMP CÍCLICO EXTRACELULAR**

Los niveles intracelulares de GMPc están regulados por tres procesos independientes: (i) síntesis por las guanilato ciclasas, (ii) degradación por fosfodiesterasas, y (iii) exportación al medio extracelular por

transportadores de membrana (MRPs o transportadores sensibles a probenecid). El papel fisiológico de esta exportación y del GMPc extracelular no se conoce con claridad. No obstante, algunos estudios indican que el GMPc extracelular en intestino, riñón o cerebro ejerce funciones fisiológicas y no es excretado simplemente para extinguir la señalización interna.

### **9.1. El GMPc extracelular modula la motilidad del intestino**

Que el GMPc extracelular ejerce efectos en intestino se demostró en un estudio que trataba de averiguar cómo la solitaria altera el ambiente fisiológico del lumen del intestino delgado del huésped, contrayendo el músculo liso intestinal y disminuyendo el tránsito intestinal. Ensayaron diferentes compuestos secretados por el parásito y sólo la infusión luminal de GMPc en el huésped inducía patrones contráctiles similares a los observados durante la infección por solitaria (Kroening *et al.*, 2003). Dado que el GMPc no atraviesa las membranas celulares, su efecto debía ocurrir en el medio extracelular. Si añadían fosfodiesterasas que degradan el GMPc, no observaban respuesta. Cuando añadían AMPc o 8-Br-GMPc (homólogo de GMPc permeable a membrana) había un incremento en la frecuencia contráctil pero no era significativamente diferente de los controles. Así pues, concluyeron que el GMPc actúa como una molécula de señalización extracelular, regulando in vivo los mecanismos de motilidad del intestino delgado. Posteriormente se ha comprobado que existen sitios extracelulares de unión de GMPc en el intestino de mamíferos. El GMPc, liberado por el

## INTRODUCCIÓN

---

parásito en el lumen intestinal, interactúa con dos poblaciones de receptores de superficie celular y altera los patrones de motilidad del músculo liso del intestino del huésped (Zimmerman *et al.*, 2008).

### 9.2. El GMPc extracelular modula el transporte de Na<sup>+</sup> en el riñón

El GMPc extracelular es un mediador crítico de la presión natriurética, mecanismo por el cual el riñón regula la presión sanguínea. Un incremento de la presión de perfusión en células del túbulo proximal renal induce excreción de sodio. Las células del túbulo renal en humanos contienen guanilato ciclasa soluble, capaz de generar y exportar GMPc en respuesta a NO. Este GMPc es exportado al medio extracelular de las células renales por un transportador de aniones orgánicos sensible a probenecid y no se reincorpora al citosol. La incorporación de sodio a la célula está inhibida cuando el GMPc es exportado, por tanto, el GMPc extracelular está regulando la reabsorción de sodio (Sasaki *et al.*, 2004). La presión natriurética está modulada por NO y por la exportación de GMPc al espacio intersticial. El GMPc extracelular inhibe la reabsorción de sodio en el túbulo proximal e induce natriuresis vía protein-quinasa G (PKG) (Jin *et al.*, 2001; 2004; Ahmed *et al.*, 2007; Lieb *et al.*, 2009). El GMPc extracelular aumenta los niveles de la proteína fosforilada Src e induce natriuresis de manera dependiente de Src. El lugar de unión del GMP extracelular a las membranas de las células renales del túbulo se desconoce. Se ha propuesto que el GMPc se une a un dominio extracelular de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y que en la señalización subsiguiente se activaría Src (Nascimento *et al.*, 2011).

### **9.3. El GMPc extracelular tiene efecto neuroprotector frente a la excitotoxicidad en neuronas de cerebelo en cultivo**

El GMPc está implicado en la neurotoxicidad del glutamato y del NO, pero también puede tener un papel neuroprotector. El papel del GMPc en neurotoxicidad y neuroprotección se estudió en cultivos primarios de neuronas de cerebelo. Se comprobó que el GMPc intracelular estaba implicado en el mecanismo por el que la activación excesiva del receptor NMDA conduce a la muerte neuronal. La activación del receptor NMDA aumenta el calcio en la neurona post-sináptica. El calcio activa la óxido nítrico sintasa neuronal y forma óxido nítrico que activa a su vez la guanilato ciclasa soluble formándose GMP cíclico (cGMP), parte del cual se libera al medio extracelular. Si se inhibía la formación de GMPc, inhibiendo la guanilato ciclasa soluble, se prevenía la muerte neuronal inducida por glutamato o por NO (Montoliu *et al.*, 1999). Para corroborar que el aumento de GMPc es neurotóxico, Montoliu *et al.* (1999) indujeron un aumento de GMPc inhibiendo su degradación con inhibidores de fosfodiesterasas (IBMX). Inesperadamente el IBMX no sólo no potenció la muerte neuronal sino que previno la muerte inducida por glutamato. Se comprobó que en presencia de IBMX, el GMPc no se acumulaba en el interior de las neuronas sino que se liberaba al medio extracelular y que existía una correlación entre el aumento de GMPc extracelular y la prevención de la muerte neuronal inducida por glutamato. Además, el aumento de GMPc en el medio extracelular por adición directa de GMPc, también prevenía la neurotoxicidad por glutamato en cultivos de neuronas cerebelares. Estos resultados son compatibles con un efecto neurotóxico si se incrementan los

## INTRODUCCIÓN

---

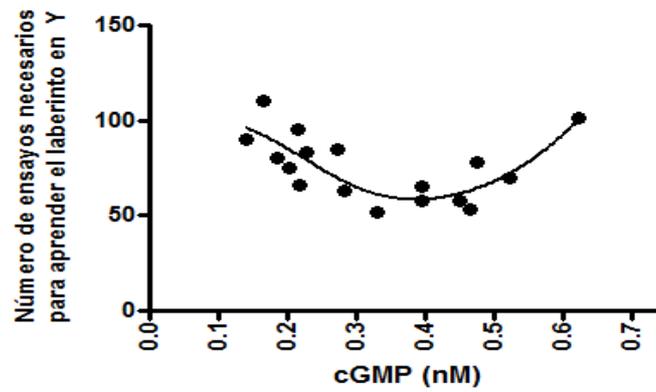
niveles de GMPc intracelular y un efecto neuroprotector por parte del GMPc extracelular (Montoliu *et al.*, 1999).

### **9.4. El GMPc extracelular modula el aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y**

En modelos animales de hiperamonemia y encefalopatía hepática, el aumento de la concentración de GMPc extracelular en cerebelo es capaz de restaurar la capacidad de aprendizaje del test de discriminación condicionada en el laberinto en Y. No obstante, el aumento excesivo de GMPc extracelular puede ser perjudicial para el aprendizaje y debe mantenerse en un rango de concentración adecuado (Erceg *et al.*, 2005a; 2005b). Para comprobar si la disminución de la capacidad de aprendizaje de la tarea en el laberinto en Y en ratas con hiperamonemia o EH es consecuencia de la menor función de la vía glutamato-NO-GMPc y la menor formación de GMPc, Erceg *et al.* (2005a y 2005b) estudiaron si el aumento de GMPc en cerebelo restaura la capacidad de aprendizaje. Para aumentar los niveles de GMPc realizaron dos tratamientos: (1) administración continua intracerebral de zaprinast, un inhibidor de la fosfodiesterasa que degrada el GMPc, (2) administración oral crónica de sildenafil, un inhibidor de la fosfodiesterasa capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.

Comprobaron que los dos tratamientos restauran la capacidad de aprender en el laberinto en Y y que existe una correlación significativa entre la concentración de GMPc basal extracelular y la capacidad de aprendizaje

de la tarea de discriminación condicionada. Cuanto mayor es la concentración de GMPc mayor es la capacidad de aprendizaje. Esto sugiere que el GMPc extracelular modula la capacidad de aprendizaje. Parece existir un umbral ( $\approx 500$  pM) a partir del cual un aumento de la concentración de GMPc extracelular ya no mejora la capacidad de aprendizaje de la tarea de discriminación condicional sino que la deteriora (Figura 7). Los inhibidores de fosfodiesterasa aumentan tanto el GMPc extracelular como el intracelular. Para comprobar si realmente es el GMPc extracelular el que modula la capacidad de aprendizaje, utilizaron un tercer tratamiento para aumentar exclusivamente el GMPc extracelular sin afectar el intracelular. Para ello administraron GMPc intracerebralmente, mediante minibombas osmóticas. El GMPc no atraviesa la membrana celular, por lo que cualquier efecto que produzca es debido al aumento de GMPc extracelular. Comprobaron que el GMPc restaura la capacidad de aprendizaje de la tarea en el laberinto en Y en ratas hiperamonémicas. Esto indica que la manipulación farmacológica de los niveles de GMPc extracelular en cerebro podría ser útil en el tratamiento clínico de las alteraciones cognitivas de los pacientes con encefalopatía hepática (Erceg *et al.*, 2005a; 2005b). No se conocen los mecanismos por los que el aumento de GMPc extracelular restaura la capacidad de aprender la tarea en el laberinto en Y.



**Figura 7. Correlación entre la concentración de GMPc extracelular y la capacidad de aprendizaje.** Cada punto representa el número de ensayos necesarios para aprender frente a la concentración de GMPc extracelular (Figura de Erceg S., 2004).

# **OBJETIVOS**



### OBJETIVOS

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

La capacidad de aprendizaje en un laberinto en Y está disminuida en ratas con hiperamonemia y encefalopatía hepática crónicas. La infusión continua intracerebral de GMPc mediante minibombas osmóticas restaura la capacidad de aprendizaje en ratas con hiperamonemia (Erceg et al, 2005a), pero el mecanismo por el que restaura el aprendizaje se desconoce.

La vía glutamato (Glu)-óxido nítrico (NO)-GMPc modula el aprendizaje en el laberinto en Y (Erceg et al, 2005b). La función de esta vía está reducida en cerebelo in vivo de ratas con hiperamonemia y EH, conduciendo a una disminución de la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y. Tratamientos que restauran la función de la vía restauran la capacidad de aprendizaje. Puesto que el tratamiento con GMPc extracelular restaura la capacidad de aprendizaje de esta tarea, partimos de la hipótesis de que el GMPc añadido debe restaurar la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo y de esta forma restaura la capacidad de aprendizaje.

Los objetivos principales de esta tesis son:

**A)** Estudiar si el tratamiento crónico intracerebral con GMPc extracelular restaura otras alteraciones cognitivas y motoras presentes en ratas con hiperamonemia crónica.

## **OBJETIVOS**

---

**B)** Estudiar los mecanismos moleculares por los que el tratamiento intracerebral con GMPc exógeno restaura la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y.

Para ello se han abordado los siguientes objetivos concretos:

- 1.** Estudiar si la infusión crónica intracerebral de GMPc extracelular en ratas hiperamonémicas:
  - A.** Restaura la coordinación motora.
  - B.** Restaura la actividad motora.
  - C.** Recupera la capacidad de aprendizaje y/o la memoria espacial.
  
- 2.** Estudiar si la infusión crónica intracerebral de GMPc extracelular en ratas hiperamonémicas:
  - A.** Normaliza los niveles de GABA extracelular en cerebelo.
  - B.** Recupera la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo in vivo.
  
- 3.** Estudiar si la administración aguda de GMPc extracelular en cerebelo a través de sondas de microdiálisis recupera la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo de ratas hiperamonémicas in vivo. Analizar los mecanismos implicados.
  
- 4.** Analizar en cortes frescos de cerebelo ex-vivo los mecanismos por los que la adición de GMPc extracelular restaura la función de la vía glutamato-NO-GMPc en hiperamonemia:

## **OBJETIVOS**

---

- A.** Analizar en cortes frescos de cerebelo de ratas control los mecanismos moleculares por los que el GMPc extracelular modula la función de la vía glutamato-NO-GMPc. Efectos sobre los niveles de GMPc, la actividad NOS, la fosforilación de la nNOS en la serina 847 y la fosforilación de la CaMKII en la treonina 286.
- B.** Analizar en cortes frescos de cerebelo las alteraciones inducidas por la hiperamonemia crónica en los mecanismos por los que el GMPc extracelular modula la vía glutamato-NO-GMPc.
- C.** Tratar de identificar la posible diana extracelular del GMPc, a través de la cual modula la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



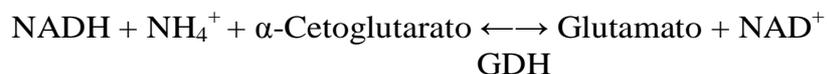
**MATERIAL Y MÉTODOS**

**1. Modelo animal de hiperamonemia crónica sin fallo hepático**

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

**1.1. Determinación de amonio en sangre**

Para comprobar los niveles de amonio de los animales se utilizó el método basado en la siguiente reacción:



Este método (Hermenegildo et al. 2000) es una adaptación del procedimiento descrito por Kun y Kearney (1974). Se toman 150  $\mu\text{L}$  de sangre, se desproteiniza con 1 volumen de ácido tricloroacético frío al 10%, manteniéndolo en hielo durante 15 minutos. Tras centrifugar a 12000g

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

durante 10 minutos a 4°C, se recupera el sobrenadante y se neutraliza con  $\text{KHCO}_3$  2 M. Se vuelve a centrifugar a 12000 g, 10 minutos a 4°C. El sobrenadante neutralizado se utiliza para medir el amonio.

La mezcla de reacción contiene en un volumen final de 102.5  $\mu\text{L}$ : 60  $\mu\text{L}$  de muestra, 30 mM  $\alpha$ -ketoglutarato y 0.5 mM NADH en tampón fosfato (pH=8). Después de registrar la fluorescencia inicial para comprobar que es estable, se añaden 5  $\mu\text{g}$  por pocillo de glutamato deshidrogenasa (GDH, Boehring Mannheim, Germany) (10 mg/ml) iniciándose la reacción. Se siguen los cambios en fluorescencia en el fluorímetro (Fluoroskan Ascent; Labsystems Oy, Helsinki, Finland) durante 90 minutos. El ensayo se llevó a cabo utilizando placas Costar UV de 96 pocillos (cat. no. 3635; Corning Costar Corporation, Cambridge, MA). Se registran los cambios en fluorescencia en las muestras y en estándares con diferentes concentraciones de amonio. A partir de los datos de fluorescencia obtenidos en los estándares, se calcula una curva donde se extrapolan los valores de fluorescencia de las muestras para obtener la concentración de amonio en sangre.

## **2. Procedimientos quirúrgicos**

### **2.1. Implantación de minibombas osmóticas en el ventrículo cerebral**

Para la liberación continua de GMPc extracelular en el ventrículo cerebral se implantaron minibombas osmóticas en ratas tras dos semanas de dieta de amonio. Se utilizaron minibombas osmóticas con cánula para

infusión cerebral (“ALZET”. Brain infusion KIT II 3-5 mm. Mini-Osmotic pumps model 2004. ALZA Corporation, Palo Alto, CA, USA). Se anestesiaron las ratas con isoflurano (5% en 100% de oxígeno para inducir la anestesia y 2% para mantenerla). La cabeza del animal se colocó en un sistema de estereotaxia para implantar la cánula en el ventrículo. Se realizó una incisión sagital de unos 2.5 cm dejando la superficie del cráneo al descubierto. A continuación, se preparó un bolsillo subcutáneo en el área escapular de la espalda del animal, donde se colocó la minibomba osmótica conectada vía catéter a la cánula a implantar intraventricularmente en cerebro. Este bolsillo se preparó utilizando una pinza hemostática para hacer un pequeño túnel subcutáneo desde la incisión a nivel del cuero cabelludo hasta el área media y se fue abriendo y cerrando la pinza para dar forma al bolsillo. El bolsillo permite la colocación de la minibomba con cierto margen de movimiento sin deslizarse demasiado.

La cánula se implantó en el ventrículo lateral izquierdo realizando un pequeño agujero en las siguientes coordenadas: +0,9 mm eje anteroposterior, +1,3 mm eje mediolateral y 4,5 mm dorsoventral respecto al bregma (Paxinos y Watson, 2007). La cánula se sujetó a la superficie del cráneo con un tornillo y cemento dental, y se suturó la piel. La minibomba osmótica se insertó en el bolsillo subcutáneo, sin que el catéter estuviera muy tirante, para que el animal tenga movilidad sin peligro de que el catéter se desenganche de la cánula.

Las minibombas osmóticas se rellenaron previamente con vehículo (suero salino) o con GMPc (sigma) a una concentración 240  $\mu$ M. Cada

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

minibomba osmótica tiene una capacidad de 220  $\mu\text{L}$  y libera 0.25  $\mu\text{L}/\text{hora}$  durante 28 días.

En el estudio se utilizaron 4 grupos de ratas:

- 1) Ratas control a las que se implantaron minibombas osmóticas con vehículo (suero salino).
- 2) Ratas control a las que se implantaron minibombas osmóticas con GMPc 240  $\mu\text{M}$ .
- 3) Ratas hiperamonémicas a las que se implantaron minibombas osmóticas con vehículo.
- 4) Ratas hiperamonémicas a las que se implantaron minibombas osmóticas con GMPc 240  $\mu\text{M}$ .

Se dejaron transcurrir tres o cuatro días para que los animales se recuperasen de la operación antes de empezar el pretest de aprendizaje.

Tras 28 días desde la implantación de las minibombas osmóticas se sacrificaron las ratas. La funcionalidad de las bombas se verificó pesándolas antes de colocarlas y después del sacrificio. También se verificó el lugar donde se colocó la cánula mediante una determinación histológica, como se describe en el apartado 2.3.

### 2.2. Microdiálisis en cerebelo *in vivo*

Tres semanas después de iniciar la dieta de amonio y dos semanas después de la implantación de las minibombas osmóticas, se anestesiaron las ratas con isoflurano (5% en 100% de oxígeno para inducir la anestesia y 2% para mantenerla). Se colocó la cabeza del animal en un sistema de estereotaxia para implantar en el cerebelo la guía de microdiálisis (MD-2251, Omega-ring Intracerebral Guide Cannula and Stylet, 6/pkg. BASi). Tras la anestesia se realizó una incisión sagital de aproximadamente 2.5 cm para dejar la superficie del cráneo al descubierto y con ayuda de una espátula, suavemente, se raspó para quitar el tejido conectivo y de este modo permitir posteriormente una buena adhesión del cemento dental a la superficie del cráneo. A continuación, se marcaron las coordenadas de introducción de la guía en el cerebelo: -10.5 mm anteroposterior, -1.6 mm medio lateral y 0.8 mm dorsoventral respecto al bregma (Paxinos y Watson, 2007). Se realizaron dos perforaciones (1 mm de diámetro) para insertar dos tornillos de sujeción al cráneo y un agujero (1 mm de diámetro) que permitió el acceso vertical de la guía al cráneo. La guía se sujetó al cráneo mediante los tornillos y cemento dental. Después se suturó la piel y se devolvieron las ratas individualmente a sus jaulas durante un periodo de 48-72 horas hasta el momento de realizar la microdiálisis cerebral.

### **2.3. Determinación histológica de la posición de la cánula de la minibomba osmótica y de la guía de microdiálisis.**

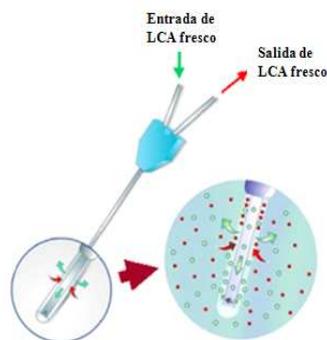
Se seleccionaron dos animales por grupo para verificar la posición de la cánula en el ventrículo cerebral ó de la guía en cerebelo. Se cortaron los cerebros con un micrótopo en cortes de 30  $\mu\text{m}$  a nivel de los ventrículos laterales y del cerebelo y se conservaron en una solución protectora (30% etilenglicol / 30% glicerol en 0.1 M de  $\text{NaKPO}_4$ ) a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el análisis histoquímico (Canales et al. 2003). Los cortes se tiñeron con violeta de cresilo para verificar la posición en uno de los ventrículos laterales de la cánula de la minibomba osmótica y en el cerebelo de la sonda de microdiálisis.

### **3. Análisis de la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc *in vivo* por microdiálisis en cerebelo**

Se retiró el estilete y se colocó la sonda de microdiálisis (MD-2200, Brain Microdialysis Probes) en la guía de forma cuidadosa y con el animal despierto. Se perfundió continuamente a través de la sonda líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) a un flujo de 3  $\mu\text{L}/\text{minuto}$  mediante una bomba de microperfusión (BAS, Analytical Systems, Inc, USA). La composición del LCA es  $\text{NaCl}$  145 mM,  $\text{KCl}$  3.0 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.26 mM, tamponado a pH 7.4 con tampón fosfato 2 mM (Hermenegildo et al., 1998). El LCA se filtró con filtros Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. La figura 8 muestra un esquema del funcionamiento de la sonda de microdiálisis. El dializado recogido durante una hora y media tras la

inserción de la sonda se desechó porque estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que los niveles de GMPc precisan ese intervalo de tiempo para estabilizarse. Transcurrido ese tiempo se recogieron muestras cada 30 minutos (90  $\mu$ L de dializado en cada muestra). Las muestras se conservaron en nitrógeno líquido hasta ser almacenadas a -80°C hasta el momento de ser empleadas.

Una vez recogidas las muestras para determinar los niveles basales se administraron a través de la misma sonda distintos compuestos de interés (GMPc, inhibidor de la CaMKII, inhibidor impermeable de la PKA, AMPc) disueltos en LCA y se siguió tomando muestra para evaluar los efectos de estos compuestos. Para analizar la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc se administró el agonista del receptor NMDA a 0.3 mM a través de la sonda, que activa la vía y conduce a un aumento de la concentración de GMPc extracelular. En estas condiciones, la acumulación de GMPc extracelular es una buena medida de la función de la vía Glutamato-NO-GMPc in vivo (Erceg et al. 2005a; Erceg et al. 2005b).



**Figura 8.** Esquema del funcionamiento de una sonda de microdialisis

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

### **3.1. Determinación de GMPc extracelular en muestras de microdiálisis en cerebelo**

A las muestras obtenidas de la microdiálisis cerebral se les añadió EDTA 4 mM para prevenir la posible degradación del GMPc por fosfodiesterasas y se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El contenido de GMPc se midió mediante enzima-inmunoensayo utilizando el kit BIOTRACK GMPc de Amersham. El ensayo se basa en la competición de una cantidad desconocida de GMPc (de la muestra) y una cantidad fija de GMPc unido a peroxidasa por la unión al anticuerpo específico contra GMPc (unido al pocillo). La peroxidasa unida al GMPc reacciona con el reactivo (substrato TMB) dando un color azul. Cuanto más GMPc hay en la muestra menos GMPc-peroxidasa se une al anticuerpo específico contra GMPc y menos color se observa. La concentración de GMPc en la muestra se determina por extrapolación de los datos en la curva estándar de GMPc y se expresa en pmol/mL.

### **3.2. Cuantificación de GABA en muestras de microdiálisis del cerebelo por HPLC (High Performance Liquid Chromatography)**

Los niveles de ácido- $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en el líquido extracelular de cerebelo se determinaron por HPLC con un detector de fluorescencia (Waters 474, filtro de excitación 340 nm y filtro de emisión 460 nm) después de haber sido derivatizados con OPA (dialdehído ftálico). Los aminoácidos reaccionan con el OPA en presencia de un reductor fuerte, en condiciones alcalinas (pH 9-11), dando un compuesto fluorescente. Se

derivatizaron 10 $\mu$ L del extracto con la solución de OPA y se inyectaron en el HPLC al cabo de 2 minutos. Para la separación de los aminoácidos se usó una columna de fase reversa C18, con una longitud de 250 mm y un diámetro de 4.6 mm y con partículas de 5  $\mu$ m de diámetro (ODS 2, Waters Spherisorb) mantenida a temperatura constante de 20°C. Se empleó un estándar de GABA 50  $\mu$ M (Sigma). La cromatografía se realizó con un programa de gradiente de dos soluciones (A y B) cuyo flujo fue de 1 mL/min. La solución A era una mezcla 95/5 (vol/vol) de tampón acetato sódico 50 mM (pH 5.67) y metanol y alcohol isopropílico (12.5 mL por litro de fase). La solución B era una mezcla 70/30 (vol/vol) metanol/agua. La concentración de GABA (nM) se calculó a partir del área obtenida por HPLC.

#### **4. Obtención de cortes cerebrales frescos**

Las ratas se decapitaron, se extrajo el cerebelo y rápidamente se sumergió en vasos con solución Krebs (en mM: NaCl 119, KCl 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 26.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5 y glucosa 11), enfriados en hielo y burbujeados con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>) para mantener los cerebros frescos y oxigenados. Se hicieron cortes transversales de 400  $\mu$ m en un Vibrótomo (LEICA, Vt1000s). Durante todo el proceso, el tejido se mantuvo en solución Krebs y burbujeado con carbógeno. Antes de empezar los tratamientos se estabilizaron los cortes perfundiéndolos sólo con tampón Krebs.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 4.1. Determinación de la actividad óxido nítrico sintasa

Los cortes de cerebelo obtenidos (ver apartado 4) se pasaron a los pocillos del sistema de perfusión (Campden Instruments, Ltd. Modelo 745) (Figura 9) que contenían solución Krebs burbujeada con carbógeno.



**Figura 9.** Sistema de perfusión.

La temperatura se mantuvo a 35°C durante todo el experimento con un controlador de temperatura. Los cortes se incubaron durante 20 min en solución Krebs para estabilizarlos, y a continuación se perfundieron a un flujo de 1 mL/min con solución Krebs conteniendo o no: GMPc (2 y 10 nM, durante 20 min), inhibidor de la proteína-quinasa A (1  $\mu$ M, durante 30 min), AMPc (10  $\mu$ M y 10 nM, durante 20 min) e inhibidor de la CaMKII (KN62, 10  $\mu$ M durante 30 min).

Después del tratamiento, se homogenizaron con un politrón (Polytron ®PT 1200 E) 3 cortes/tratamiento en 300 µL de Tampón A (Hepes 20 mM, Sacarosa 320 mM, DTT 1 mM, Leupeptina 10 mg/L, Pepstatina A 10 mg/L, EGTA 1 mM, pH 7.4) y se sonicaron 20 segundos. Guardamos una alícuota para cuantificar proteína en el homogenado por el método del ácido bicínico, BCA (BCA Protein Assay Kit, Thermo). Preparamos una dilución ¼ de la muestra con agua milli-Q, añadimos 100 µL de la mezcla de reacción (NADPH 200 µM, BH4 50 µM, L-Arginina C<sup>14</sup> 1 µCi/mL, CaCl<sub>2</sub> 1 mM en Tampón A) e incubamos 30 min a 37°C. A continuación, se pasó la muestra por columnas DOWEX AG 50WX-8, previamente activadas con tampón (acetato sódico 20 mM y L-citrulina 1 mM, pH 5.5). En estas condiciones, la arginina radioactiva quedará retenida en la columna y eluirá la citrulina radioactiva formada durante la reacción. Se lavaron las columnas con 1.5 mL de agua milli-Q y ese eluido se recogió en un vial con 12 mL de líquido de centelleo. Se agitaron los viales para mezclar la muestra con el líquido de centelleo. Se cuantificó la citrulina radioactiva en un contador durante 10 min cada vial. Los resultados se expresaron como cpm/mg de proteína. La diferencia de cpm de muestras con y sin nitroarginina corresponde a la citrulina formada por la actividad de la NOS.

#### **4.2. Determinación de la cantidad y fosforilación de NOS neuronal y CaMKII por Western blot**

Estudiamos la cantidad y fosforilación de NOS neuronal y de CaMKII en cortes de cerebelo homogenizados en 200 µL/corte de tampón de

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

fosforilación (Tris-HCl 66 mM pH 7.4, SDS 1%, EGTA 1 mM, Glicerol 10%, Leupeptina 0.2 mg/mL, NaF 1 mM, Na orto-vanadato 1 mM). Determinamos la concentración de proteína con el método colorimétrico BCA (BCA Protein Assay Kit, Thermo) y separamos las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida del 8% con SDS. Se cargan 30 µg de muestra/pocillo disuelta en tampón de muestra 2X (Tris-HCl 0.5 M a pH 6.8, Glicerol 5%, SDS 10%, 2-Mercaptoetanol 2.5%, Bromofenol 1%).

Los geles de poliacrilamida constan de dos zonas de diferente concentración de acrilamida: gel “stacking” (Tris Base 0.125 M, 0,1% SDS a pH 6.8, Acrilamida 3.9%, Bisacrilamida 0.015%, APS 0,04% y TEMED), que concentra la muestra en una banda estrecha antes del inicio de su separación y gel “running” (Tris Base 0.4 M, 0.1% SDS, pH a 8.8, Acrilamida 8 %, Bisacrilamida 0.2%, APS 0.04% y TEMED), en el que las proteínas se separan según su masa molecular relativa. El tampón empleado para la electroforesis contenía Tris Base 0.3%, 0.02% SDS, Glicina 1.5%. La intensidad de la corriente fue de 25 mA por gel.

Una vez terminada la electroforesis se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF o nitrocelulosa en tampón de transferencia (Tris Base 0.025 M, Glicina 0.05 M) y a una corriente de 400 mA durante 2 horas. A continuación, se bloquearon las membranas con BSA al 3% en TBS-Tween (NaCl 0.15 M, Tris Base 50 mM, Tween-20 0.05%, pH 7.5) durante 45-60 minutos. Las membranas se lavaron cinco veces con TBS-Tween durante 6 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo durante 16 horas a 4°C. Se vuelven a lavar las membranas cuatro

## MATERIAL Y MÉTODOS

veces con TBS-Tween durante 6 minutos. Después se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación.

Los anticuerpos primarios y secundarios que se utilizaron fueron los siguientes:

Anticuerpo 1°	Dilución	Anticuerpo 2°	Dilución
Anti-nNOS (fabricado en este laboratorio)	1/1000	Anti-IgG de conejo- peroxidasa (Sigma)	1/2000
Anti-PNOS * en Serina 847 (Abcam)	1/2000	Anti-IgG de conejo- peroxidasa (Sigma)	1/2000
Anti-CaMKII alfa** (Abcam)	1/2000	Anti-IgG de ratón- peroxidasa (Sigma)	1/2000
Anti-PCaMKII en Treonina 286 (Abcam)	1/1000	Anti-IgG de ratón- peroxidasa (Sigma)	1/2000

\*Reconoce específicamente la NOS neuronal fosforilada en la Serina 847.

\*\*Reconoce específicamente la CaMKII fosforilada en la Treonina 286.

A continuación, la membrana se lavó cuatro veces durante 10 minutos con TBS-Tween y se hizo un último lavado con tampón sustrato (NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris-HCl 100 mM a pH= 9.5). Por último, se reveló utilizando un método colorimétrico para la enzima peroxidasa con una solución de revelado (NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris-HCl 100 mM, 0.6% stock NBT, 0.35% stock BCIP, pH= 9.5).

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

Las imágenes de las bandas fueron capturadas en un escáner Hewlett Packard Scanjet 5300C y la intensidad de las bandas fue cuantificada con el programa AlphaImager 2200 (AlphaEaseFC 2200 for Windows, Cambridge, UK). Se utilizó la actina como control de carga y la intensidad de banda se expresó como porcentaje de las ratas control ó de las ratas hiperamonémicas en cada western-blot.

### **4.3. Determinación de GMPc en cortes de cerebelo**

Después de la incubación de los cortes con los respectivos tratamientos en el sistema de perfusión, se homogenizó cada corte en 200 µL de tampón de ensayo para GMPc (proporcionado con el kit) con EDTA 4 mM. Se incuban a 100°C en un incubador (ThermoStat plus, Eppendorf 1.5 mL) durante 5 min, centrifugamos a 19000 g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se congela a -20°C hasta la determinación del GMPc mediante enzima-inmunoensayo utilizando el kit BIOTRACK GMPc de Amersham (ver apartado 3.1). El precipitado se resuspende en 200 µL de NaOH 0.5 M, se incuba 2 horas a 37°C y se determina la concentración de las proteínas con el método colorimétrico BCA (BCA Protein Assay Kit, Thermo).

### **4.4. Determinación de la fosforilación de proteínas extracelulares en cortes de cerebelo mediante marcaje con ATP<sup>33</sup>**

Se obtuvieron cortes de cerebelo (como se indica en el apartado 4) y se incubaron en el sistema de perfusión colocando en cada pocillo 2

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

cortes/tratamiento: GMPc 10 nM sólo ó en combinación con inhibidor impermeable de PKA 1  $\mu$ M durante 30 min. A continuación, se pasaron los cortes a tubos con 500  $\mu$ L del tratamiento correspondiente. Añadimos 5  $\mu$ Ci de ATP<sup>32</sup> a cada muestra e incubamos 10 min. A continuación, con un pincel pasamos los cortes a tubos con 200  $\mu$ L de tampón de fosforilación (Tris-HCl 66 mM pH 7.4, SDS 1%, EGTA 1 mM, Glicerol 10%, Leupeptina 0.2 mg/mL, NaF 1 mM, Na orto-vanadato 1 mM), homogenizamos y hervimos a 100°C durante 5 min. Determinamos la concentración de proteína con el método colorimétrico BCA (BCA Protein Assay Kit, Thermo) y separamos las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS, cargando 50  $\mu$ g de proteína/pocillo disuelta en tampón de muestra 2X (Tris-HCl 0.5 M a pH 6.8, Glicerol 5%, SDS 10%, 2-Mercaptoetanol 2.5%, Bromofenol 1%). Sumergimos los geles en fijador (45% metanol, 7.5% ácido acético glacial) durante 1 hora y 30 min. A continuación, los transferimos durante 30 min a una cubeta con dimetilsulfóxido (DMSO) y repetimos este paso una vez más. Después incubamos el gel en 2,5-diphenyloxazole (PPO) al 20% en DMSO durante 1 hora. Lavamos con agua milli-Q durante 30 min realizando varios cambios de agua y finalmente, secamos los geles en una secadora a 50°C durante toda la noche. Una vez secado el gel, lo colocamos en un cassette con películas de revelado y lo guardamos a -80°C. Revelamos la película a los 10 días de exposición.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 5. Identificación de proteínas de membrana de cerebelo que unen GMPc

Para identificar proteínas de membrana que unen GMPc, aislamos y purificamos las proteínas de membrana de cerebelo, las incubamos con bolas de agarosa que tienen unido GMPc e identificamos las bandas de proteínas que unen GMPc por electroforesis. Estas bandas se envían a secuenciar por espectrometría de masas.

Para la obtención de membranas, se decapitó la rata, se extrajo el cerebro y se sumergió en una solución de sacarosa 320 mM en hielo. A continuación, se pesó el área y se añadieron 50 volúmenes de Tris-Citrato 50 mM pH 7.4 a 4°C. Se homogenizó el tejido durante 10 segundos con un homogeneizador electrónico (Ultra-Turrax® T25 basic, IKA® Werke). Se centrifugó 20 min a 20.000 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se añadieron al precipitado 50 volúmenes del tampón Tris-Citrato. Se resuspendió el precipitado con el homogeneizador y se volvió a centrifugar 20 min a 20.000g 4 °C, este paso se repitió 5 veces. Se midió la proteína del precipitado añadiendo 4 o 5 volúmenes de tampón (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 300 mM, DTT 125 µM, PMSF 1 mM, Leupeptina 4 µM, Pepstatina A 4 µM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, SDS 0.1%, Igepal 1%, Deoxicolato 5%) para conseguir una concentración de proteína de 3.5-4 mg/mL. A continuación, centrifugamos a 100.000 g 1 hora a 4 °C. Dializamos el sobrenadante a 4°C durante 4 horas con tampón (Tris-HCl 10 mM pH 8, DTT 125 µM, PMSF 0.1 mM, EDTA 0.5 mM, EGTA 0.5 mM, Mercaptoetanol 0.1%). Medimos la proteína de la muestra dializada por el

método colorimétrico de BioRad (Bio-Rad Protein Assay, Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad Laboratories GmbH).

Lavamos las bolas de agarosa control y las bolas de agarosa que tienen unido GMPc 5 veces con tampón (Tris HCl 2 mM pH 8, NaCl 50 mM, DTT 25  $\mu$ M, PMSF 0.2 mM, EDTA 0.2 mM, EGTA 0.2 mM, Mercaptoetanol 0.1%, Leupeptina 1  $\mu$ M, Pepstatina A 1  $\mu$ M, SDS 0.02%, Deoxicolato 0.8%). Incubamos la muestra con las bolas durante 30 min a 37°C en agitación. Tras una precipitación por centrifugación rápida durante 5 segundos, se guardó el sobrenadante y se midió la proteína por el método colorimétrico BCA. El precipitado se lavó 3 veces con tampón (Tris-HCl 10 mM pH 8, DTT 20  $\mu$ M, PMSF 0.2 mM, EDTA 0.2 mM, EGTA 0.2 mM, Leupeptina 1  $\mu$ M, Pepstatina A 1  $\mu$ M). Se resuspendió el precipitado con 50  $\mu$ L de sample buffer 2X (Tris-HCl 0.5 M a pH 6.8, Glicerol 5%, SDS 10%, 2-Mercaptoetanol 2.5%, Bromofenol 1%). Se hirvió 5 min la muestra y tras una precipitación por centrifugación rápida durante 5 segundos, se cargó el sobrenadante en un gel de poliacrilamida del 8% con SDS. La electroforesis se realizó a 25 mA por gel. Se sumergió el gel en una solución con el colorante azul de Comassie (50% Metanol, 10% Ácido acético, 0.1 % Brilliant blue) y en agitación continua durante 3 horas. El gel se destiñó con una solución al 25% de isopropanol y 10% de ácido acético glacial, hasta que se observaron las bandas de proteínas teñidas de azul. En un transiluminador se seleccionaron las bandas presentes en las carreras de proteínas incubadas con bolas de agarosa con GMPc y que no aparecían en las carreras de proteínas incubadas sin GMPc. Estas bandas se enviaron a

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

secuenciar por espectrometría de masas al laboratorio dirigido por el Dr. Juan José Calvete en el Instituto de Biomedicina de Valencia.

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

#### **6.1. Test de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un Laberinto en Y**

Este test se realiza en un laberinto de madera de tres brazos idénticos en forma y longitud (60 cm de largo, 11.5 cm de ancho y 25 cm de altura) colocados en forma de Y (Figura 5, apartado Introducción). Uno de los brazos se elige como salida y los otros dos son los brazos de elección. El color de las paredes del laberinto puede ser blanco o negro. Dependiendo del color del laberinto se colocan los “pellets” de comida (Dutless Precision Pellets®, Rodent Purified Diet, Bio-Serv) en la parte más distal de uno u otro brazo de elección. Cuando el laberinto es negro se colocan los pellets al final de brazo izquierdo. Cuando el laberinto es blanco se colocan los pellets al final del brazo derecho. El animal tiene que aprender donde está el pellet en función del color del laberinto (Erceg et al. 2005; Murray y Ridley. 1997). La realización de este test requiere un período de familiarización del animal con el laberinto (pre-test 4 días) y una restricción de la comida accesible (unos 8 gramos al día) durante el tiempo que dura el test y el pre-test para que el refuerzo en forma de comida tenga el efecto esperado.

El día 1 de pre-test se dejó explorar a las ratas (de 2 en 2) en el mismo laberinto durante 10 minutos con la comida esparcida por todo el laberinto. Este laberinto era de color blanco. El día 2 de pre-test se pusieron las ratas

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

El test se repite diez veces cada día cambiando de forma aleatoria el color de las paredes, y se considera que el animal ha aprendido cuando acierta los 10 ensayos seguidos en un mismo día. Un acierto consiste en que el animal escoge el brazo izquierdo y come los pellets colocados al final del mismo, en el caso de que el laberinto sea negro. En el caso de que el laberinto sea blanco, el animal escoge el brazo derecho.

Cada vez que una rata se somete al test se deja como máximo 3 minutos en el laberinto durante los cuales o bien realiza un acierto, un error o bien un no ensayo: se queda en el brazo de salida.

Si a los 25 días de la realización del test la rata no ha aprendido ya no se hacen más tests considerando que el animal no es capaz de aprender la tarea.

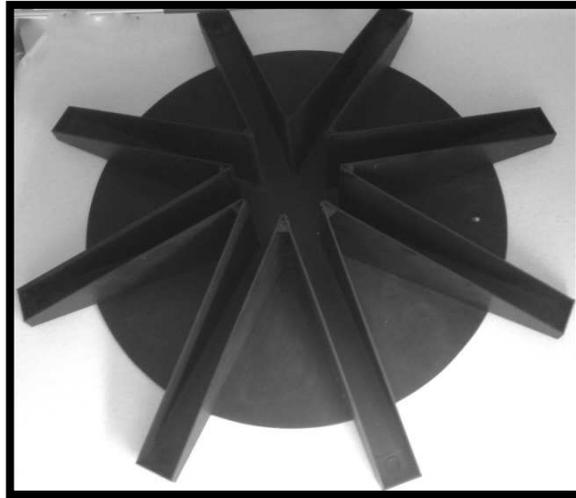
### **6.2. Laberinto radial de 8 brazos**

Este test evalúa el aprendizaje espacial y se realiza en un laberinto con un área central que permite el acceso a ocho brazos equidistantes y de idéntico tamaño. Los brazos tienen una longitud de 70 cm y una anchura de 10 cm y el área central tiene 30 cm de diámetro (Figura 10). El laberinto es de plexiglás negro y está a una altura de 1 m sobre el suelo. Cada brazo tiene paredes laterales con una altura superior en el extremo próximo a la

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

zona central (30 cm) que en el extremo distal (5 cm). En el extremo distal de cada brazo, hay un comedero empotrado donde se coloca la comida de recompensa. A las ratas se les reduce la ingesta de comida cuatro días antes de realizar el pre-test y se mantienen con esa dieta restrictiva durante todo el test. En la primera sesión del pre-test se colocan dos ratas en el laberinto durante 5 minutos con comida esparcida por todo el laberinto. En la segunda sesión del pre-test se coloca sólo una rata en el laberinto durante 5 minutos con comida en todos los comederos (2 pellets). A continuación, se realiza el test durante 6 días con 5 ensayos/día. Se coloca la comida en 4 de los 8 comederos: en 2 brazos consecutivos (ejemplo: 1 y 2) y en otros 2 brazos no consecutivos (ejemplo: 4 y 6). Los brazos con/sin comida son diferentes para cada rata. Se espera que la rata se coma todos los pellets pero si no se mueve esperamos como máximo 3 minutos. Si una rata durante 2 días consecutivos no se mueve la eliminamos del estudio. Se analizan (i) los errores de referencia espacial, que se definen como el número de veces que entra el animal en un brazo sin comida; (ii) los errores de memoria de trabajo, el número de veces que entra en un brazo que ya ha visitado durante ese mismo ensayo y (iii) el número de aciertos en cada ensayo, que corresponde al número de entradas en brazos con comida.



**Figura 10.** Laberinto radial de 8 brazos.

### **6.3. Laberinto acuático de Morris**

Este test mide aprendizaje y memoria espacial. Consiste en poner las ratas individualmente dentro de una piscina (Figura 11) que contiene una plataforma de escape escondida por debajo del agua de forma que la rata no la visualiza. La plataforma, que es de un material plástico y transparente, tiene que quedar sumergida pero sólo a 1-2 cm de profundidad de la superficie. El agua se tiñe con una pintura blanca inocua para que el agua quede turbia y la plataforma no sea visible para las ratas. La rata no quiere permanecer en el agua y busca la plataforma. Mediante pistas visuales como

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

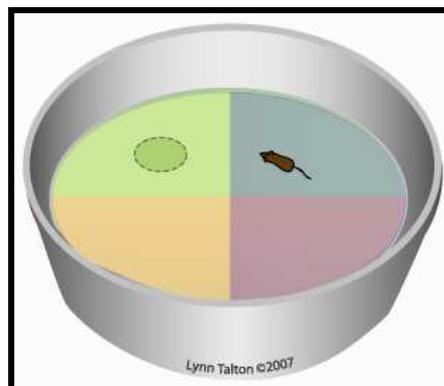
---

colores o figuras situadas alrededor de la piscina, el animal se ubica en el espacio para encontrar la plataforma.

Utilizamos una piscina circular de 190 cm de diámetro y 80 cm de altura. El test consta de 3 fases: pre-test, aprendizaje y test. En el pre-test, se acostumbra a las ratas a nadar en el agua sin la plataforma. Se deja que naden 90 segundos y, a continuación, se sacan de la piscina y se secan. Al día siguiente (día 1 de aprendizaje), se coloca la plataforma en una parte cualquiera de la piscina y ésta permanece en ese cuadrante de la piscina cada día de aprendizaje. Cada día de aprendizaje (días 1, 2 y 3), se realizan cinco ensayos en los que cada rata tiene que nadar y encontrar la plataforma. El tiempo máximo de permanencia en el agua es de 120 segundos. Si pasado este tiempo la rata no ha encontrado la plataforma, la colocamos encima de la plataforma y la dejamos 1 minuto. Cada vez que se realiza un ensayo hay que colocar la rata en el agua en un punto diferente de la piscina, por ejemplo en uno de los 4 puntos cardinales imaginarios (N, S, E y O) de la piscina.

Si llegan a la plataforma antes de los dos minutos se anotan los segundos que han tardado en encontrarla y subirse.

El cuarto día se realiza el test final (Memoria espacial): se quita la plataforma de la piscina y se coloca cada rata en la piscina, en un punto cualquiera de la piscina (el mismo para todas las ratas). Se deja la rata en la piscina durante 90 segundos y se cuentan los segundos que la rata nada en el cuadrante donde los días anteriores estaba colocada la plataforma.



**Figura 11.** Laberinto acuático de Morris.

### 6.4. Ensayos de actividad y coordinación motora

#### 6.4.1. Actividad motora

Estudiamos la actividad motora espontánea de los animales utilizando un actímetro (MED Associates). Los animales se dejaron durante 3 días en jaulas (43×43×30.5cm) provistas de células infrarrojas que detectan el movimiento del animal (Figura 12). El equipo dispone de dos filas de células infrarrojas o detectores que se encuentran a 1 y 6 cm del suelo de la jaula. Los datos se recogen automáticamente por el programa informático ‘Activity Monitor’ (MED System) para su posterior análisis. Cuando el animal interrumpe tres detectores infrarrojos consecutivamente el programa registra un movimiento ambulatorio. Un movimiento vertical o “rearing” se registra cuando el animal interrumpe la célula infrarroja situada a 6 cm del

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

suelo. Se determinó la actividad ambulatoria, actividad vertical y velocidad media.



**Figura 12.** Jaula para medir actividad motora.

### 6.4.2. Beam walking

Este test mide coordinación motora y equilibrio. Consiste en hacer pasar a la rata por un palo de 1 metro de longitud y 20 mm de anchura, situado a aproximadamente 1 metro del suelo, hasta alcanzar en el final del recorrido una caja cerrada y oscura, que proporciona un ambiente agradable para los roedores (Figura 13). Antes de realizar el test se entrenan a las ratas haciéndolas pasar tres veces por el palo dejándolas dentro de la caja final (unos 2 minutos) para que se sienta protegida. Hay algunas ratas que necesitan más ensayos y otras que tienen mucho miedo y que no pasan el palo (éstas ratas se eliminan del estudio).

En este test se mide el tiempo en segundos que el animal tarda en llegar a la caja y el número de resbalones que el animal tiene durante el recorrido por el palo. Un animal tiene incoordinación motora cuando tiene un mayor número de resbalones o cuando tarda mucho tiempo en pasar el palo.



**Figura 13.** Beam walking.

### **7. Determinación de factores inflamatorios en cerebelo e hipocampo**

Los animales con minibombas osmóticas fueron sacrificados con una guillotina. Se extrajo el cerebelo e hipocampo y fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido hasta su análisis por western blot.

Se homogenizaron el cerebelo e hipocampo siguiendo el siguiente protocolo: cada área se pesó y se trituró en el “Ultraturax” con 5 volúmenes

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

de tampón de homogenizado (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, PMSF 0.2 mM, 1 pastilla de Cocktail de inhibidores de proteasas Complete (Roche Diagnostics GMBH, Germany) en 50 ml y H<sub>2</sub>O). Se sonicó y determinamos la concentración de proteína con el método colorimétrico BCA (BCA Protein Assay Kit, Thermo). Todo el proceso se realizó en frío y los homogenados se almacenaron a -80 °C.

A continuación, los homogenados se diluyeron 1:2 en tampón de carga (Tris-HCl 20 mM a pH 6.8, Glicerol 20%, SDS 4 %, 2-Mercaptoetanol 10%, Bromofenol 1%) y se separaron las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida del 8 y 12% con SDS, en función de la masa molecular relativa de cada proteína. Se transfirieron a membrana de PVDF, se incubaron con los anticuerpos correspondientes y se cuantificó la intensidad de las bandas (*como se describe en Material y Métodos, apartado 4.2.*). Los anticuerpos primarios y secundarios que se utilizaron fueron los siguientes:

<b>Anticuerpo 1°</b>	<b>Dilución</b>	<b>Anticuerpo 2°</b>	<b>Dilución</b>
Anti-TNF $\alpha$ (R&D System)	1/250	Anti-IgG de cabra- peroxidasa (Sigma)	1/2000
Anti-Interleucina 1 $\beta$ (R&D System)	1/250	Anti-IgG de cabra- peroxidasa (Sigma)	1/2000
Anti-Interleucina 4 (Abcam)	1/500	Anti-IgG de conejo- peroxidasa (Sigma)	1/2000
Anti-Interleucina 10 (Abcam)	1/500	Anti-IgG de conejo- peroxidasa (Sigma)	1/2000
Anti-IBA 1 (Abcam)	1/500	Anti-IgG de cabra- peroxidasa (Sigma)	1/2000

### **8. Análisis estadístico**

Se emplearon distintos métodos de análisis estadístico dependiendo de los resultados a comparar. Todos ellos se realizaron con el programa Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). Se realizó un análisis de la varianza de una o dos vías (ANOVA) seguido de un test post-hoc Tukey cuando se comparan más de dos grupos o test t-Student cuando se comparan dos grupos. Se consideró como significativo un valor  $p < 0.05$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (Error estándar de las medias) del número de animales indicados en cada caso.



# **RESULTADOS**



**RESULTADOS**

**1. Efecto de la administración de GMPc extracelular sobre la actividad y coordinación motoras**

**1.1. Actividad motora**

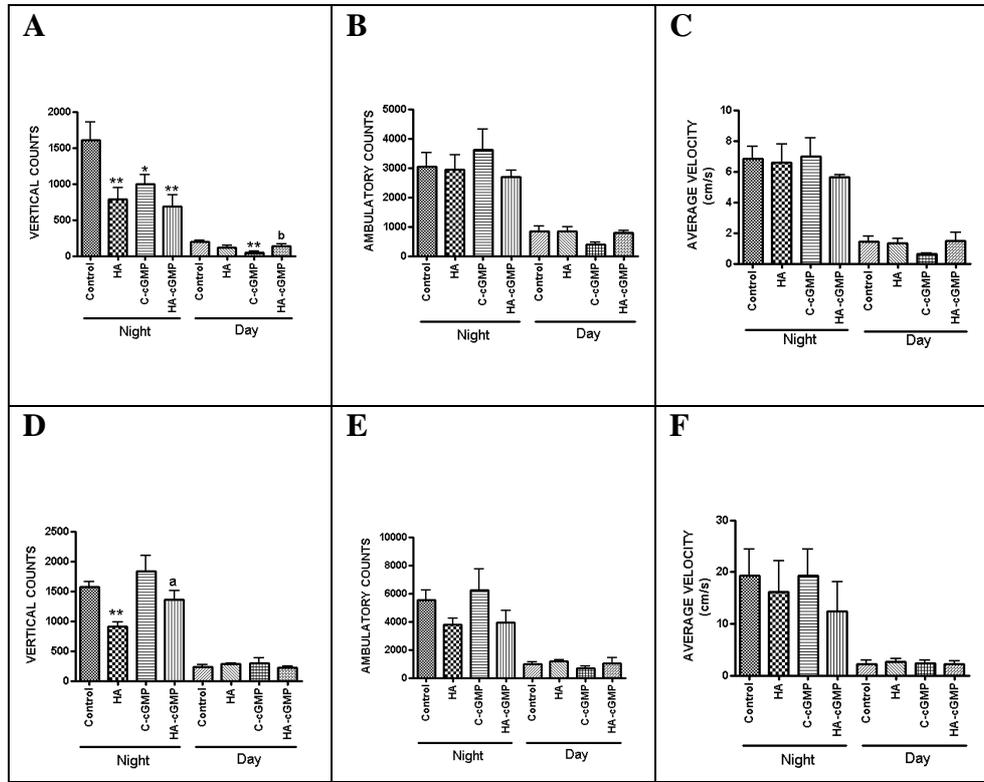
Se analizó continuamente la actividad motora durante 3 días en animales a 3 y 6 semanas de hiperamonemia midiendo los siguientes parámetros: actividad vertical, actividad ambulatoria y velocidad media.

Las ratas hiperamonémicas a las 3 semanas de dieta presentan una disminución, durante la noche, de la actividad vertical ( $783 \pm 164$  recuentos,  $p < 0.01$ ) respecto a las control ( $1608 \pm 250$  recuentos) (Figura 14A). El tratamiento con GMPc extracelular durante una semana no restaura la actividad vertical en hiperamonémicas ( $681 \pm 161$  recuentos) y la disminuye en ratas control durante la noche ( $997 \pm 133$  recuentos,  $p < 0.05$ ) y durante el día ( $43 \pm 19$  recuentos respecto a  $194 \pm 24$  recuentos en controles,  $p < 0.01$ ). La actividad ambulatoria y la velocidad media no están alteradas en hiperamonemia (Figuras 14B y 1C).

A las 6 semanas de dieta las ratas hiperamonémicas también tienen disminuida durante la noche la actividad vertical ( $904 \pm 82$  recuentos,  $p < 0.01$ ) respecto a las control ( $1571 \pm 93$  recuentos) (Figura 14D). El tratamiento durante tres-cuatro semanas con GMPc extracelular restaura la actividad vertical en hiperamonémicas ( $1356 \pm 152$  recuentos,  $p < 0.05$ ) y no altera a las control ( $1835 \pm 262$  recuentos). La actividad ambulatoria y la velocidad media están disminuidas en ratas hiperamonémicas durante la

## RESULTADOS

noche pero la diferencia no llega a ser significativa ( $p=0.07$  y  $p=0.14$ , respectivamente) (Figuras 14E y 14F).



**Figura 14. La hiperamonemia crónica reduce la actividad motora vertical durante la noche. El tratamiento crónico con GMPc extracelular la restaura. (A-C)** Actividad motora durante la noche y el día de ratas con 3 semanas de dieta y 1 semana de tratamiento con GMPc extracelular. **(D-F)** Actividad motora media durante la noche y el día de ratas con 6 semanas de dieta y 3-4 semanas de tratamiento con GMPc extracelular.

Los parámetros de actividad motora medidos son: A y D, actividad vertical (vertical counts); B y E actividad motora ambulatoria (número de recuentos= ambulatory counts); C y F velocidad media (average velocity). Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de ratas indicado (Control n=4, HA n=4, C-GMPc n=4, HA-GMPc n=4). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control. Las diferencias respecto a las ratas hiperamonémicas se indican con “a” y respecto a las ratas C-GMPc con “b”. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; “a”  $p<0.05$ ; “b”  $p<0.05$ .

Control= control tratada con vehículo, HA= hiperamonémica tratada con vehículo, C-GMPc= control tratada con GMPc, HA-GMPc= hiperamonémica tratada con GMPc.

### **1.1.1. La administración de GMPc extracelular reduce algunos factores inflamatorios en cerebro.**

Nuestro grupo ha demostrado que la neuroinflamación juega un papel esencial en la disminución de la actividad motora en ratas con hiperamonemia ó encefalopatía hepática crónicas (Cauli *et al.*, 2009, Rodrigo *et al.*, 2010). El tratamiento con antiinflamatorios (ibuprofeno) restaura la actividad motora en las ratas con hiperamonemia crónica (Rodrigo *et al.*, 2010). Por ello, estudiamos si la recuperación de la actividad motora en ratas hiperamonémicas tratadas con GMPc podría estar asociada a una reducción de la neuroinflamación. Analizamos los niveles de distintos marcadores inflamatorios en hipocampo y cerebelo. Los efectos observados en hipocampo y en cerebelo son diferentes.

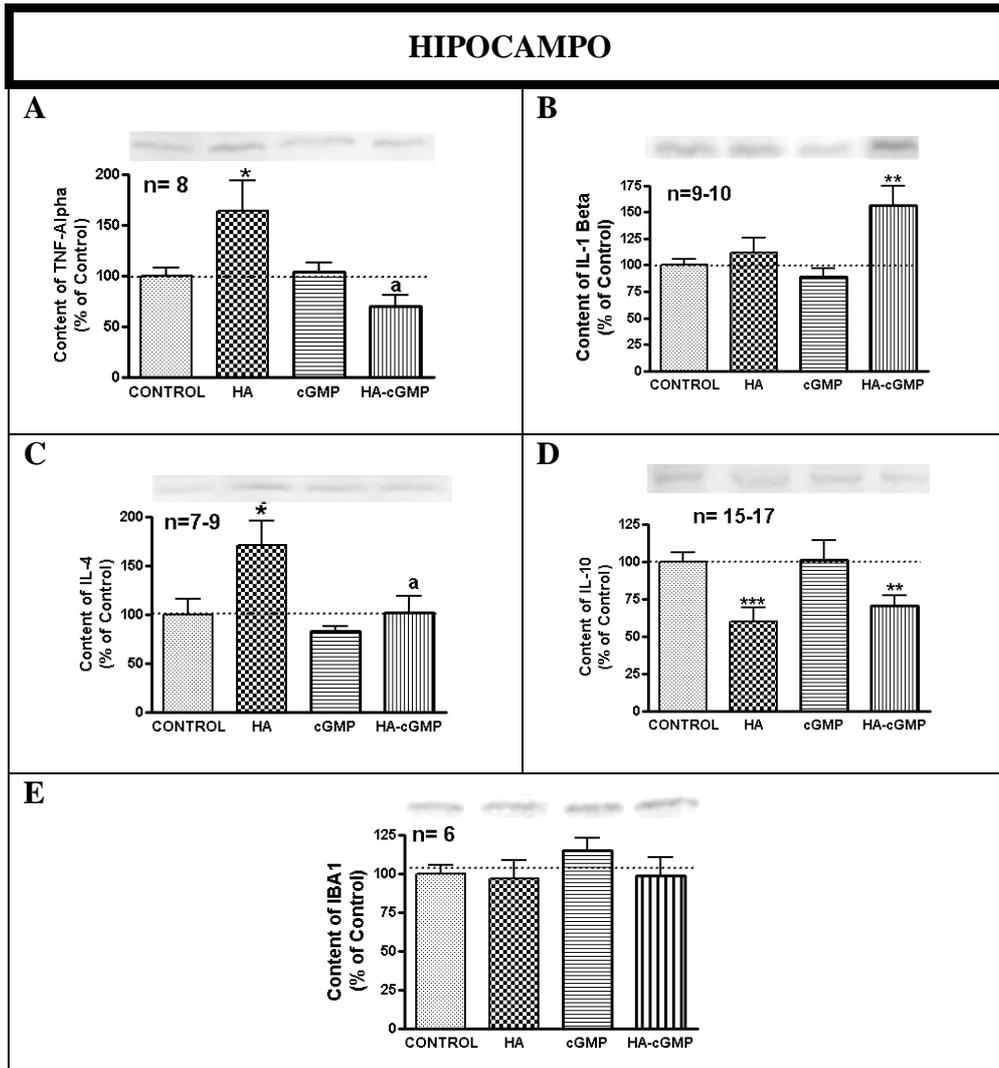
En hipocampo de ratas hiperamonémicas, los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-4 están aumentados ( $p < 0.05$ ) a un  $163 \pm 30\%$  y un  $170 \pm 25\%$  en comparación con las ratas control (Figura 15A y C). El tratamiento con GMPc normaliza los niveles de TNF- $\alpha$  y de IL-4 en ratas hiperamonémicas sin afectarlos en controles (Figura 15A y C). La IL-10 está disminuída en hipocampo de ratas hiperamonémicas ( $59 \pm 9\%$ ,  $p < 0.05$ ) y el GMPc no restaura sus niveles ( $70 \pm 7\%$ ) (Figura 15D). La IL-1B no está alterada en hipocampo de ratas hiperamonémicas. El GMPc aumenta sus niveles a un  $156 \pm 18\%$  en estas ratas pero no en las controles (Figura 15B). En el contenido de IBA-1, marcador de microglía activada, no observamos ninguna alteración en hipocampo (Figura 15E).

## RESULTADOS

---

En cerebelo, todos los marcadores inflamatorios que hemos analizado están aumentados en ratas hiperamonémicas (Figura 16). El TNF- $\alpha$  aumenta en hiperamonemia a un  $134 \pm 14\%$  del control ( $p < 0.05$ ). El tratamiento con GMPc no revierte este efecto en hiperamonémicas ( $126 \pm 7\%$ ) y aumenta el TNF- $\alpha$  en las ratas control al  $150 \pm 13\%$  ( $p < 0.01$ ) (Figura 16A). La IL-10 está aumentada en hiperamonemia ( $157 \pm 18\%$ ,  $p < 0.05$ ) y en ratas hiperamonémicas y control tratadas con GMPc a un  $149 \pm 12\%$  ( $p < 0.05$ ) y un  $136 \pm 17\%$  ( $p < 0.01$ ), respectivamente (Figura 16D). La IL-4 está aumentada en ratas hiperamonémicas aunque no de forma significativa (Figura 16C). La IL-1 Beta en ratas hiperamonémicas aumenta al  $126 \pm 9\%$  ( $p < 0.05$ ) y el tratamiento con GMPc normaliza la IL-1B en hiperamonemia sin afectar a las controles (Figura 16B). Lo mismo ocurre con el contenido de IBA-1 en cerebelo que está aumentado en hiperamonemia al  $129 \pm 9\%$  ( $p < 0.01$ ) respecto a las ratas control y el tratamiento con GMPc lo normaliza (Figura 16E).

Estos datos sugieren que la normalización de la actividad motora vertical por administración crónica de GMPc extracelular podría ser consecuencia de la disminución de la neuroinflamación en las ratas hiperamonémicas.

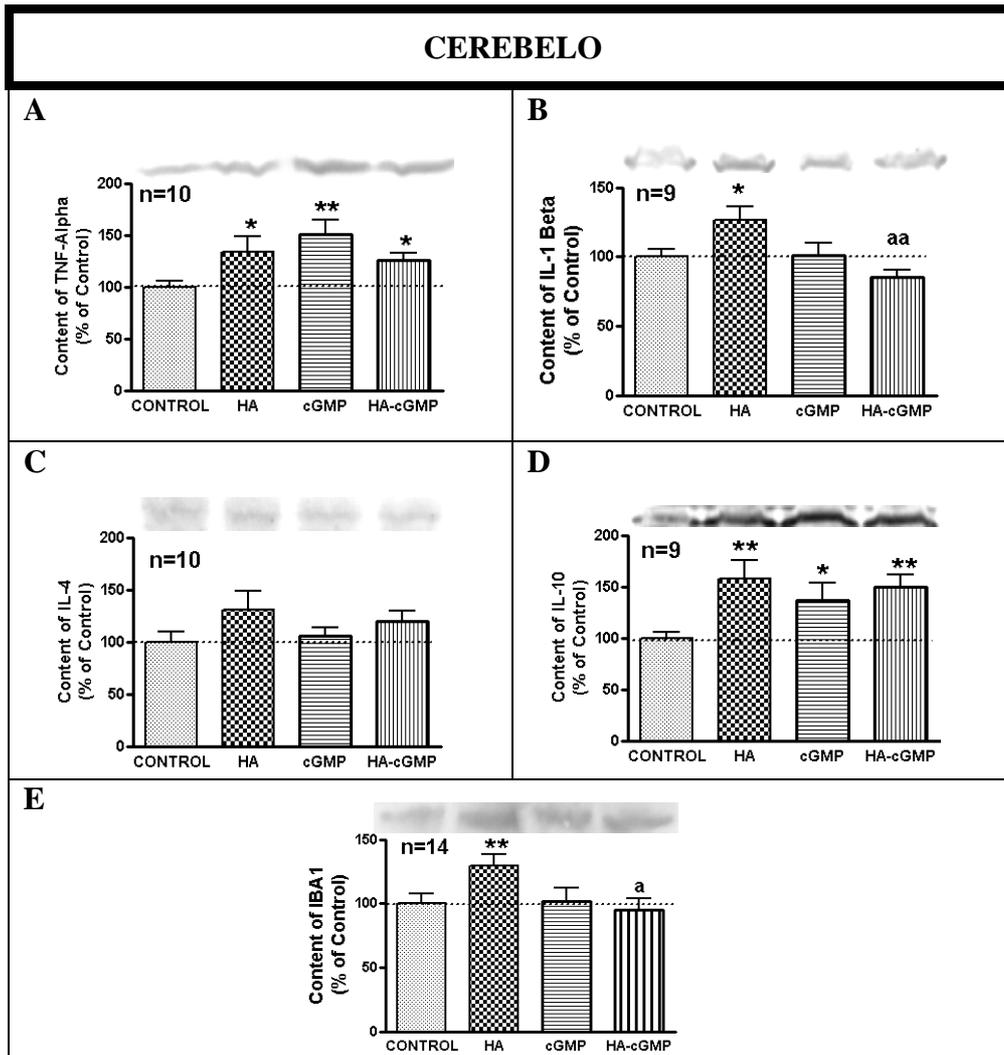


**Figura 15.** Efecto de la administración crónica de GMPc extracelular sobre los niveles de algunos marcadores inflamatorios en hipocampo.

Se analizó por Western blott el contenido en hipocampo de: **A)** TNF- $\alpha$ , **B)** Interleucina 1 beta (IL-1B), **C)** Interleucina 4 (IL-4), **D)** Interleucina 10 (IL-10) y **E)** IBA-1. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de ratas indicado en cada panel. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  “a” indica diferencias respecto al grupo HA, “a” $p < 0.05$

Control= control tratada con vehículo, HA= hiperamonémica tratada con vehículo, C-GMPc= control tratada con GMPc, HA-GMPc= hiperamonémica tratada con GMPc.

## RESULTADOS



**Figura 16. Efecto de la administración crónica de GMPc extracelular sobre los niveles de algunos marcadores inflamatorios en cerebelo.** Se analizó por Western blott el contenido en hipocampo de: **A)** TNF- $\alpha$ , **B)** Interleucina 1 beta (IL-1B), **C)** Interleucina 4 (IL-4), **D)** Interleucina 10 (IL-10) y **E)** IBA-1. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de ratas indicado en cada panel. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  “a” indica diferencias respecto al grupo HA, “a” $p < 0.05$

Control= control tratada con vehículo, HA= hiperamonémica tratada con vehículo, C-GMPc= control tratada con GMPc, HA-GMPc= hiperamonémica tratada con GMPc.

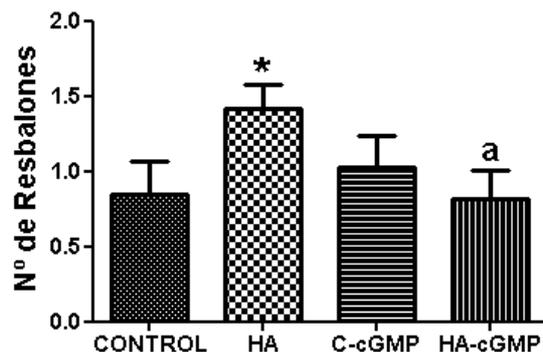
### **1.2. La administración de GMPc extracelular en el ventrículo cerebral restaura la coordinación motora y el GABA extracelular en ratas con hiperamonemia crónica**

Las ratas hiperamonémicas tuvieron un mayor número de resbalones en el test del “beam walking” que las ratas control ( $1.4 \pm 0.1$  y  $0.8 \pm 0.2$  respectivamente,  $p < 0.05$ ) indicando una disminución de la coordinación motora. El tratamiento con GMPc extracelular revierte este efecto en las ratas hiperamonémicas ( $0.8 \pm 0.2$ ,  $p < 0.05$ ) recuperando la coordinación motora y no afecta la coordinación de las ratas control ( $1 \pm 0.2$ ) (Figura 17).

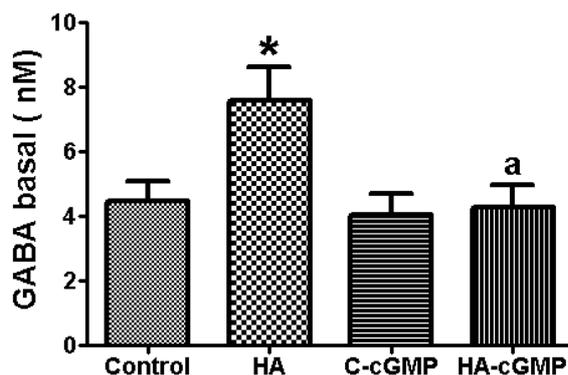
La concentración basal de GABA extracelular está aumentada en cerebelo de ratas hiperamonémicas ( $7.6 \pm 1$  nM,  $p < 0.01$ ) respecto a las control ( $4.4 \pm 0.6$  nM). La administración de GMPc extracelular normaliza la concentración de GABA extracelular en hiperamonemia ( $4.2 \pm 0.7$  nM) y no afecta a las control ( $4 \pm 0.6$  nM) (Figura 18). Los datos presentados en la Figura 19 muestran que existe una correlación positiva ( $r = 0.52$ ,  $p = 0.01$ ) entre la concentración de GABA extracelular y el número de resbalones en el test del Beam-Walking.

Así pues, la administración de GMPc restaura los niveles de GABA extracelular en cerebelo de ratas hiperamonémicas y la coordinación motora.

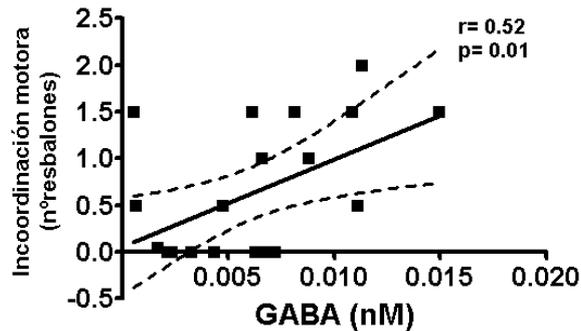
## RESULTADOS



**Figura 17. La administración de GMPc extracelular restaura la coordinación motora en ratas hiperamonémicas.** Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de ratas indicado (Control n=16, HA n=17, C-GMPc n=17, HA-GMPc n=14). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p < 0.05$ , “a” indica diferencias respecto al grupo HA, “a” $p < 0.05$ . Control= control tratada con vehículo, HA= hiperamonémica tratada con vehículo, C-GMPc= control tratada con GMPc, HA-GMPc= hiperamonémica tratada con GMPc.



**Figura 18. El GMPc extracelular normaliza la concentración de GABA extracelular en ratas hiperamonémicas.** Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de ratas indicado (Control n=26, HA n=33, Control-GMPc n=35, HA-GMPc n=35). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p < 0.05$ , “a” indica diferencias respecto al grupo HA, “a” $p < 0.05$ . Control= control tratada con vehículo, HA= hiperamonémica tratada con vehículo, C-GMPc= control tratada con GMPc, HA-GMPc= hiperamonémica tratada con GMPc.



**Figura 19.** Correlación entre la concentración de GABA extracelular y la incoordinación motora. Se representa, para cada rata individual, los valores de incoordinación motora expresada como el número de resbalones en el test del Beam-walking y la concentración de GABA extracelular.

## 2. Efecto de la administración de GMPc extracelular sobre la capacidad de aprendizaje y memoria espacial

### 2.1. La administración de GMPc extracelular recupera la memoria de referencia y el índice de aprendizaje pero no la memoria de trabajo en el laberinto radial

Se analizaron las memorias de referencia y de trabajo utilizando el test del laberinto radial de ocho brazos. Las ratas hiperamonémicas cometieron más errores de referencia ( $75 \pm 5$ ,  $p < 0.05$ ) que las ratas control ( $59 \pm 4$ ) (Figura 20A).

También cometieron más errores en la memoria de trabajo ( $26 \pm 3$ ,  $p < 0.05$ ) que las ratas control ( $17 \pm 2$ ), indicando una disminución en su memoria espacial (Figura 20B).

El tratamiento con GMPc disminuyó en las ratas hiperamonémicas el número de errores de referencia de forma significativa ( $p < 0.05$ ) hasta un

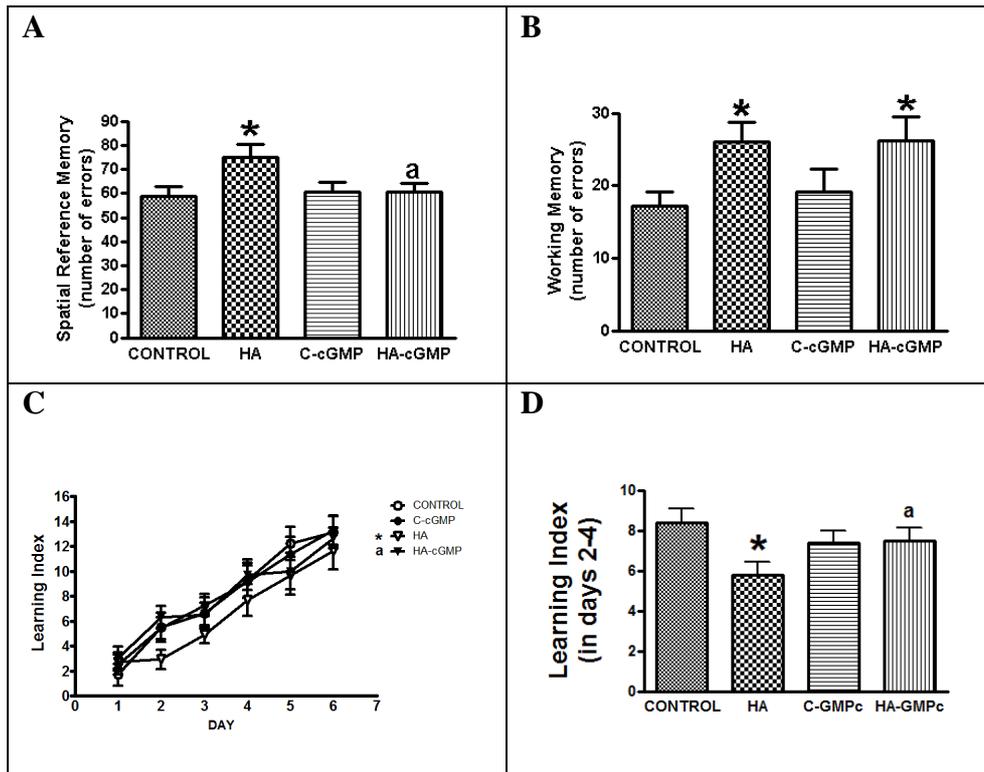
## RESULTADOS

---

valor de  $61 \pm 4$ , que no es distinto del de las ratas control. Esto indica que el GMPc restaura la memoria de referencia en ratas hiperamonémicas (Figura 20A).

En cambio, el GMPc no ejerció ningún efecto sobre la memoria de trabajo (Figura 20B).

El índice de aprendizaje se calcula como la diferencia entre el número de aciertos y errores de referencia espacial. Como se observa en la figura 20C, este índice de aprendizaje va mejorando con el tiempo en los cuatro grupos experimentales y es menor en ratas hiperamonémicas que en las control ( $p < 0.05$ ). El tratamiento con GMPc restaura la capacidad (el índice) de aprendizaje ( $p < 0.05$ ) de las ratas hiperamonémicas y no afecta el de las ratas control en el laberinto radial (Figura 20C). En la figura 20D, se presenta la media del índice de aprendizaje del segundo al cuarto día de test. El aprendizaje está disminuido en ratas hiperamonémicas ( $5.7 \pm 0.6$ ,  $p < 0.05$ ) respecto a las control ( $8.3 \pm 0.7$ ). El tratamiento con GMPc restaura el índice de aprendizaje en ratas hiperamonémicas ( $7.5 \pm 0.6$ ,  $p < 0.05$ ) y no altera a las control ( $7.3 \pm 0.6$ ).



**Figura 20.** La administración crónica de GMPc extracelular restaura la memoria de referencia (A) y el índice de aprendizaje (C, D) pero no la memoria de trabajo (B) en el laberinto radial en ratas hiperamonémicas. (A) Los valores son la media  $\pm$  SEM de errores de referencia espacial acumulados durante los seis días de test del número de ratas indicado, (B) Los valores son la media  $\pm$  SEM de errores de memoria de trabajo acumulados durante los seis días de test, (C) Los valores son la media  $\pm$  SEM del índice de aprendizaje de cada día, (D) Los valores son la media  $\pm$  SEM del índice de aprendizaje del segundo al cuarto día de test del número de ratas indicado (Control n=14, HA n=13, C-GMPc n=14, HA-GMPc n=14). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*p<0.05, "a" p<0.05 indica diferencias respecto al grupo HA. Control= control tratada con vehículo, HA= hiperamonémica tratada con vehículo, C-GMPc= control tratada con GMPc, HA-GMPc= hiperamonémica tratada con GMPc.

## RESULTADOS

---

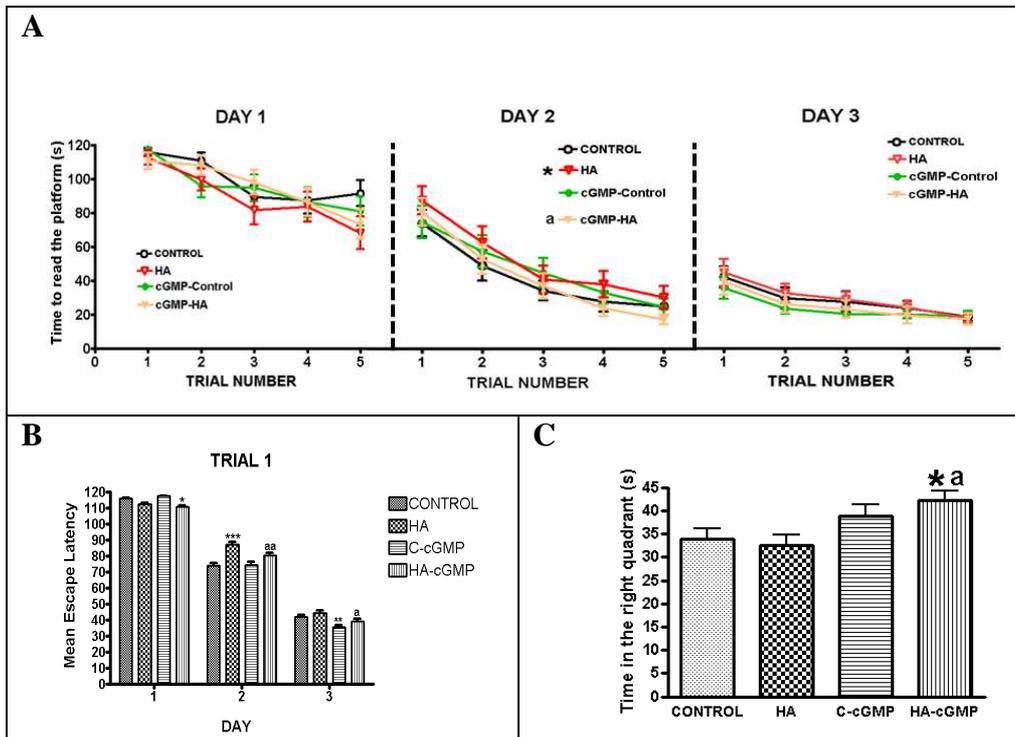
### 2.2. La administración crónica de GMPc extracelular restaura la capacidad de aprendizaje espacial en el test del laberinto acuático de Morris

Se analizaron el aprendizaje y la memoria espacial en el test del laberinto acuático de Morris. En el segundo día de aprendizaje, las ratas hiperamonémicas necesitaron más tiempo ( $52 \pm 8$  segundos,  $p < 0.05$ ) para alcanzar la plataforma que las ratas control ( $42 \pm 7$  segundos), indicando una disminución en la capacidad de aprendizaje espacial. La administración de GMPc extracelular disminuyó de forma significativa ( $p < 0.05$ ) el tiempo requerido por las ratas hiperamonémicas ( $42 \pm 6$  segundos) para encontrar la plataforma (Figura 21A). Este tiempo es el mismo requerido por las ratas control, indicando que el GMPc extracelular restaura la capacidad de aprendizaje.

Si analizamos las diferencias en el aprendizaje sólo en el primer ensayo de cada día, se observa que también, en el segundo día, las ratas hiperamonémicas necesitaban más tiempo ( $87 \pm 8$  segundos,  $p < 0.001$ ) para alcanzar la plataforma que las ratas control ( $73 \pm 7$  segundos). La administración de GMPc extracelular disminuyó el tiempo requerido por las ratas hiperamonémicas ( $80 \pm 8$  segundos,  $p < 0.01$ ) para encontrar la plataforma (Figura 21B).

En el test de memoria realizado el 4º día no se observan diferencias entre las ratas control y las hiperamonémicas. Sin embargo, las ratas hiperamonémicas tratadas con GMPc permanecieron más tiempo ( $41 \pm 2$  segundos) en el cuadrante de la piscina en el que se hallaba la plataforma de

escape que las ratas control ( $33 \pm 2$  segundos) y que las ratas hiperamonémicas sin GMPc ( $32 \pm 2$  segundos,  $p < 0.05$ ) (Figura 21C). Estos datos indican que, con el tiempo, las ratas hiperamonémicas acaban aprendiendo la localización de la plataforma, pero aprenden más lentamente que las ratas control. El GMPc normaliza su capacidad de aprendizaje.



**Figura 21. La administración crónica de GMPc restaura el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris en las ratas hiperamonémicas.** (A) Muestra el tiempo que tardan las ratas en encontrar la plataforma en los cinco ensayos (trials) de cada día, (B) Primer ensayo de cada día, (C) Tiempo que permanecieron las ratas en el cuadrante donde se encontraba la plataforma durante el test de memoria realizado el 4° día. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de ratas indicado (Control  $n=24$ , HA  $n=25$ , C-GMPc  $n=24$ , HA-GMPc  $n=25$ ). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control  $*p < 0.05$ , “a”  $p < 0.05$  y “aa”  $p < 0.01$  indica diferencias respecto al grupo HA. Control= control tratada con vehículo, HA= hiperamonémica tratada con vehículo, C-GMPc= control tratada con GMPc, HA-GMPc= hiperamonémica tratada con GMPc.

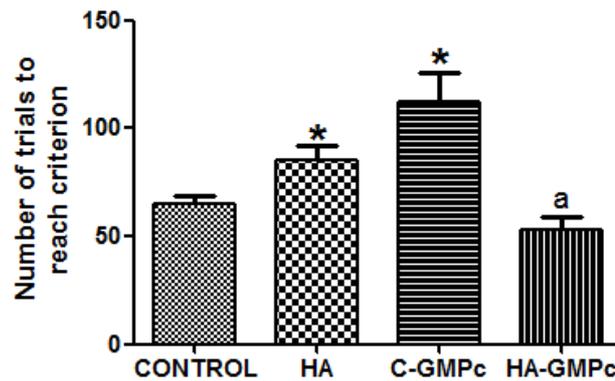
## RESULTADOS

---

### 3. El GMPc extracelular restaura la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y

Se ha demostrado anteriormente que la hiperamonemia crónica moderada disminuye la capacidad de las ratas para aprender una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y (Aguilar *et al.*, 2000).

Como muestra la Figura 22, y de acuerdo con estudios anteriores, las ratas con hiperamonemia crónica moderada mostraron una disminución de la capacidad de aprendizaje, aumentando significativamente ( $p < 0.05$ ) el número de ensayos necesarios para aprender la tarea a  $85 \pm 7$  mientras que las ratas control necesitaron  $65 \pm 4$  ensayos. La administración intracerebral continua de cGMP extracelular en ratas hiperamonémicas normalizó completamente su capacidad de aprendizaje de esta tarea, reduciéndose el número de ensayos necesarios para aprender a  $53 \pm 6$  ( $p < 0.02$ ) que es significativamente menor que el de las ratas hiperamonémicas tratadas con suero fisiológico y es similar al número de ensayos que necesitan las ratas control. Por otra parte, las ratas control tratadas con GMPc mostraron una disminución de la capacidad de aprendizaje, aumentando significativamente ( $p < 0.02$ ) el número de ensayos necesarios para aprender la tarea hasta  $112 \pm 14$ , un 172% del correspondiente a las ratas control tratadas con suero fisiológico (Figura 22).



**Figura 22.** La administración intracerebral de GMPc extracelular restaura la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en un laberinto en Y. Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de ensayos requeridos para aprender la tarea de 6 ratas por cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p < 0.05$ , "a"  $p < 0.05$  indica diferencias respecto al grupo HA.

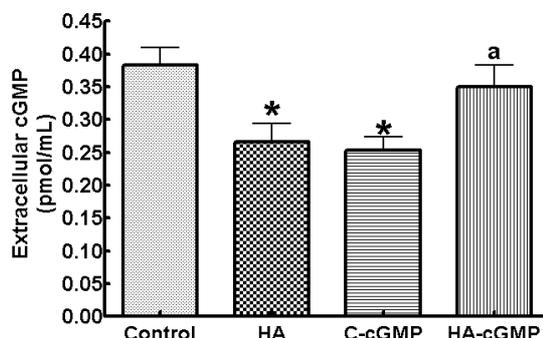
Control= control tratada con vehículo, HA= hiperamonémica tratada con vehículo, C-GMPc= control tratada con GMPc, HA-GMPc= hiperamonémica tratada con GMPc.

#### 4. La administración crónica de GMPc extracelular restaura la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc en cerebelo in vivo

La concentración basal de GMPc extracelular en cerebelo in vivo de ratas hiperamonémicas ( $0.26 \pm 0.02$  nM) es significativamente ( $p < 0.05$ ) menor que en ratas control ( $0.38 \pm 0.02$  nM). La administración de GMPc extracelular en el ventrículo mediante minibombas osmóticas disminuye el nivel basal del GMPc en las ratas control respecto a las ratas control tratadas con vehículo ( $0.25 \pm 0.02$ ,  $p < 0.05$ ). En ratas hiperamonémicas la administración de GMPc restaura la concentración basal de GMPc

## RESULTADOS

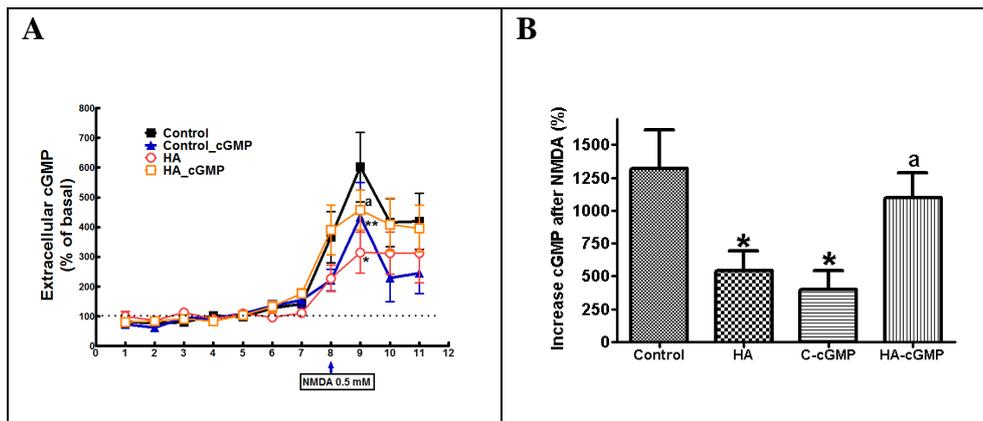
extracelular a niveles similares a los de las ratas control ( $0.35 \pm 0.03$  nM) (Figura 23).



**Figura 23. Efecto de la hiperamonemia crónica y de la administración crónica de GMPc extracelular sobre los niveles basales de GMPc extracelular en cerebelo de rata in vivo.** Los valores son la media  $\pm$  SEM del número de ratas indicado (Control n=10, HA n=8, C-GMPc n=10, HA-GMPc n=7). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p < 0.05$ , y “a”  $p < 0.05$  indica diferencias respecto al grupo HA. Control= control tratada con vehículo, HA= hiperamonémica tratada con vehículo, C-GMPc= control tratada con GMPc, HA-GMPc= hiperamonémica tratada con GMPc.

Como se muestra en la Figura 24A, la administración de NMDA a través de la sonda de microdiálisis activa la vía glutamato-NO-GMPc, aumentando el GMPc extracelular. El aumento es mucho menor en las ratas hiperamonémicas que en las control (Figura 24A). Para cuantificar el grado de activación de la vía glutamato-NO-GMPc tras la administración de NMDA calculamos el aumento de GMPc acumulado en las 4 fracciones siguientes (fracciones 8-11 de Figura 24A). Los datos para cada grupo se presentan en la figura 24B. En ratas control, el GMPc aumentó un  $1320 \pm 290\%$ . El aumento de GMPc tras la administración de NMDA es

significativamente menor en ratas hiperamonémicas ( $539 \pm 155\%$ ,  $p < 0.05$ ). La administración de GMPc mediante minibombas osmóticas restaura la función de la vía en ratas hiperamonémicas aumentando los niveles de GMPc inducido por NMDA ( $1096 \pm 191\%$ ,  $p < 0.05$ ). En cambio, en las ratas control tratadas con GMPc los niveles de GMPc tras la administración de NMDA son significativamente menores que en las ratas control con vehículo ( $539 \pm 155\%$ ,  $p < 0.05$ ).



**Figura 24. Efecto de la administración crónica de GMPc extracelular sobre la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc en cerebelo de rata *in vivo*.** Se recogieron fracciones cada 30 min. Se administró NMDA a través de la sonda de microdiálisis en la octava fracción (indicado por la flecha ↑) y se analizó (A) la concentración de GMPc extracelular en cada fracción expresada en porcentaje de los valores basales (la media de las siete primeras fracciones), (B) Aumento de GMPc extracelular tras la administración de NMDA. Los valores son la diferencia del sumatorio de las fracciones 8 a 11 respecto a las fracciones 1-7. Cada dato representa la media  $\pm$  SEM del número de ratas indicado (Control n=8, HA n=7, C-GMPc n=7, HA-GMPc n=7). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y “a”  $p < 0.05$  indica diferencias respecto al grupo HA. Control= control tratada con vehículo, HA= hiperamonémica tratada con vehículo, C-GMPc= control tratada con GMPc, HA-GMPc= hiperamonémica tratada con GMPc.

## RESULTADOS

---

### **5. Efecto de la administración aguda de diferentes concentraciones de GMPc extracelular a través de la sonda de microdiálisis sobre la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo analizada por microdiálisis in vivo**

Para avanzar en el conocimiento de los mecanismos por los que la administración crónica intracerebral de GMPc extracelular restaura la función de la vía glutamato-NO-cGMP en ratas hiperamonémicas y en consecuencia la capacidad de aprendizaje, realizamos experimentos de microdiálisis en los que administramos de forma aguda GMPc extracelular a través de la sonda de microdiálisis y analizamos las respuestas que produce. En primer lugar, determinamos la concentración óptima de GMPc extracelular a administrar agudamente para reproducir la recuperación de la función de la vía en ratas hiperamonémicas. Basándonos en los datos de concentración de GMPc extracelular en ratas control e hiperamonémicas (Figura 23), comenzamos ensayando una concentración de GMPc 2 nM. Los resultados obtenidos (ver apartados siguientes) aconsejaron reducir la concentración a 0.5 nM y, posteriormente, a 0.1 nM. Se presentan resultados para estas tres concentraciones.

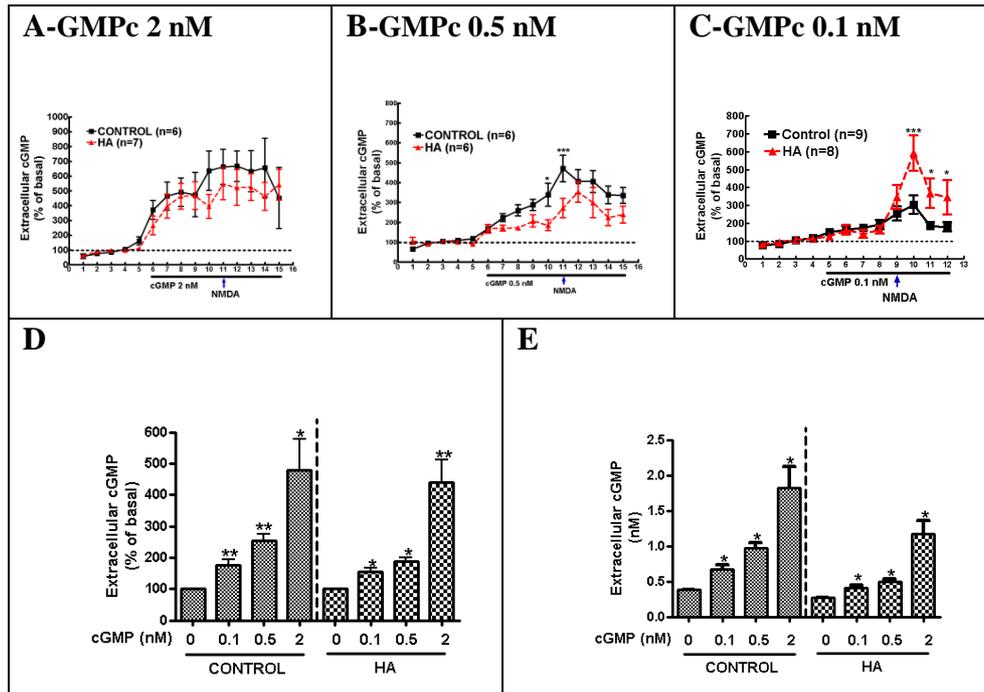
Las Figuras 9-11 muestran el efecto de diferentes concentraciones de GMPc extracelular administrado por la sonda de microdiálisis sobre los niveles de GMPc basales y tras la activación de la vía glutamato-NO-GMPc por NMDA.

Como se ha indicado en el punto 4, en condiciones basales, la concentración de GMPc extracelular en cerebelo es de  $0.38 \pm 0.02$  nM en ratas control y es menor ( $0.26 \pm 0.02$  nM,  $p < 0.05$ ) en ratas hiperamonémicas.

La administración de GMPc 2 nM aumenta el GMPc al  $471 \pm 100\%$  del basal en controles ( $p < 0.05$ ) y al  $400 \pm 74\%$  en hiperamonémicas ( $p < 0.01$ ) (Figura 25A y D). La administración de GMPc 0.5 nM aumenta el GMPc al  $217 \pm 19\%$  del basal en controles ( $p < 0.01$ ) y al  $157 \pm 12\%$  en hiperamonémicas ( $p < 0.05$ ) (Figura 25B y D). Y la administración de GMPc 0.1 nM aumenta el GMPc al  $167 \pm 18\%$  en controles ( $p < 0.01$ ) y al  $153 \pm 13\%$  en hiperamonémicas ( $p < 0.05$ ) (Figura 25C y D).

Las concentraciones (nM) de GMPc extracelular que se alcanzan tras la administración de las distintas concentraciones de GMPc exógeno se presentan en la Figura 25E y se resumen en la Tabla 3 (en la página 142).

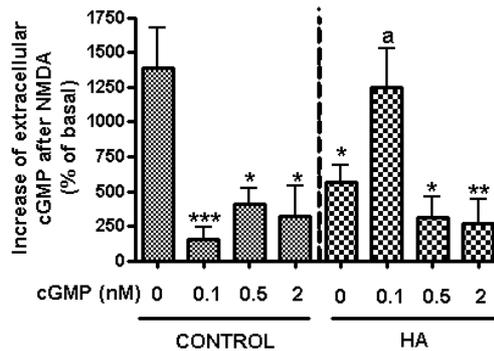
## RESULTADOS



**Figura 25. Efecto de la perfusión de diferentes concentraciones de GMPc exógeno sobre los niveles extracelulares de GMPc.** Se realizó la perfusión con un flujo de 3  $\mu\text{l}/\text{min}$  y se recogieron muestras cada 30 minutos. En la fracción 6 (en A y B) ó 5 (en C), se administró GMPc extracelular a 2 nM (A), 0.5 nM (B) ó 0.1 nM (C) y en la fracción 11 (A y B) ó 9 (C) se administró NMDA 0.3 mM a través de la sonda de microdiálisis. Se determinó el GMPc en el fluido extracelular del cerebelo. En A-C, los niveles de GMPc extracelular se expresan en porcentaje respecto al basal (media de las 5 primeras fracciones en A y B, y de las 4 primeras fracciones en C) y cada punto es la media  $\pm$  SEM de 7 ratas. En D y E se muestran los niveles de GMPc extracelular que se alcanzan tras la administración del GMPc. Los valores se expresan en porcentaje del basal en D y en nM en E y son la media  $\pm$  SEM de las fracciones 6 a 10 (en GMPc a 2 y 0.5 nM) ó 5 a 8 (en GMPc 0.1 nM). El asterisco indica la diferencia respecto al basal correspondiente (sin añadir GMPc). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

El efecto de la administración por la sonda de GMPc extracelular exógeno sobre la función de la vía glutamato-NO-GMPc (el aumento de GMPc extracelular inducido por NMDA) se resume en la Figura 26. En ausencia de GMPc extracelular añadido, la adición de NMDA aumenta el GMPc extracelular un 1320% en las ratas control y mucho menos (539%,  $p < 0.05$ ) en las hiperamonémicas. Cuando administramos GMPc 2 nM el aumento de GMPc inducido por NMDA es del  $318 \pm 223\%$  en las ratas control y del  $270 \pm 170\%$  en hiperamonémicas (Figura 10) y para GMPc 0.5 nM del  $407 \pm 116\%$  en controles y  $313 \pm 145\%$  en hiperamonémicas (Figura 26). El aumento de GMPc inducido por NMDA es mayor en las hiperamonémicas cuando administramos GMPc 0.1 nM ( $1244 \pm 281\%$ ), mientras que en las control el aumento es del  $157 \pm 85\%$  (Figura 26).

## RESULTADOS

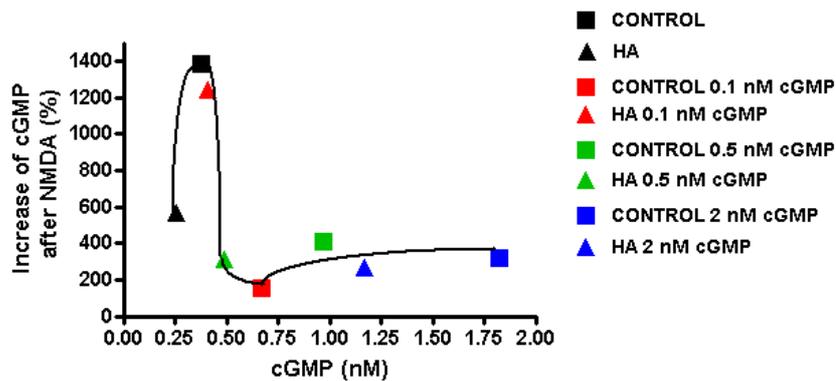


**Figura 26. Efecto de la perfusión de diferentes concentraciones de GMPc extracelular exógeno sobre la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo in vivo.** Los datos son los mismos de la Figura 9A-C. Se realizó la perfusión con un flujo de 3  $\mu$ l/min y se recogieron muestras cada 30 minutos. En la fracción 6 ó 5, se administró GMPc extracelular a 2 nM, 0.5 nM ó 0.1 nM y en la fracción 11 ó 9 se administró NMDA 0.3 mM a través de la sonda de microdialísis. Se determinó el GMPc en el fluido extracelular del cerebelo. Se muestra el aumento de GMPc extracelular inducido por NMDA y se expresa como la diferencia entre el sumatorio de los porcentajes en las fracciones 11 a 14 (en 2 y 0.5 nM) ó 9 a 12 (en 0.1 y 0 nM) y el porcentaje promedio de las fracciones 8 a 10 (en 2 y 0.5 nM) ó 6 a 8 en (en 0.1 y 0 nM). El asterisco indica la diferencia respecto al grupo control (sin añadir GMPc) y “a” respecto a las ratas hiperamonémicas (HA) perfundidas sin añadir GMPc. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 y “a” $p$ <0.05.

Estos datos indican que la administración de GMPc 0.1 nM restaura la función de la vía glutamato-NO-GMPc en ratas hiperamonémicas y la inhibe en controles. El GMPc 0.5 ó 2 nM reduce la función de la vía en ambos grupos.

Los datos anteriores sugieren que el grado de activación de la vía glutamato-NO-GMPc por NMDA está modulado por la concentración de GMPc extracelular presente cuando se administra el NMDA. En la Figura 27 se muestra el grado de activación de la vía (aumento de GMPc) por NMDA en función de la concentración extracelular de GMPc (nM) presente en el momento de administrar el NMDA en las distintas condiciones

experimentales (sin perfundir GMPc, y perfundiendo GMPc a 0.1, 0.5 y 2 nM) en ratas control e hiperamonémicas. Estos datos indican que existe un rango de concentración de GMPc extracelular óptimo para la activación de la vía. Si no alcanzamos ó excedemos este rango de concentración, la función de la vía glutamato-NO-GMPc disminuye.

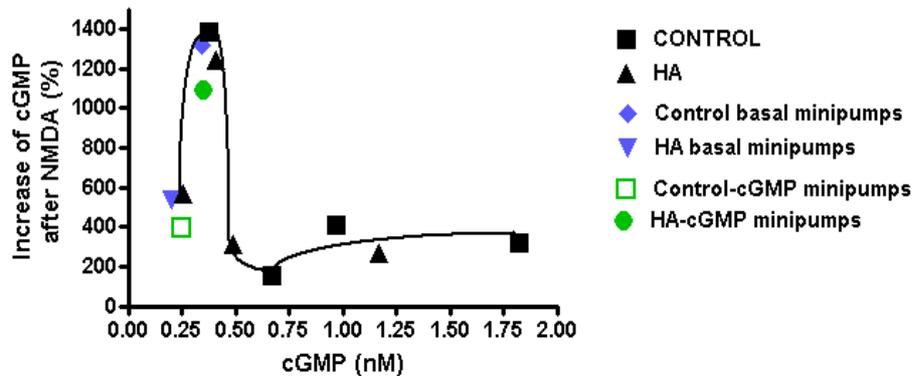


**Figura 27. Efecto de la concentración basal de GMPc extracelular sobre la activación de la vía glutamato-NO-GMPc por NMDA.** Los datos son los mismos de la Figura 10. Se muestra el aumento de GMPc inducido por NMDA en función de la concentración de GMPc basal (en nM) alcanzado en el momento de añadir NMDA (sin perfundir GMPc, y perfundiendo GMPc a 0.1, 0.5 y 2 nM). □ ratas control y Δ ratas hiperamonémicas. Los distintos colores indican la concentración de GMPc exógeno perfundido: negro, 0 nM; rojo, 0.1 nM; verde, 0.5 nM; azul, 2 nM.

Como se ha mostrado en la Figura 24, la administración crónica de GMPc mediante minibombas osmóticas aumenta la función de la vía glutamato-NO-GMPc en ratas hiperamonémicas a niveles similares a los de las ratas control. Para comprobar si esto puede ser debido a una normalización de la concentración de GMPc extracelular basal intercalamos sus valores de concentración basal de GMPc extracelular y su aumento tras adición de NMDA en la curva de la Figura 27. Como se muestra en la

## RESULTADOS

Figura 28 estos datos concuerdan con dicha curva, apoyando la idea de que el aumento de GMPc inducido por NMDA depende de la concentración de GMPc basal presente cuando se administra.



**Figura 28. Efecto del nivel basal de GMPc sobre la activación de la vía glutamato-NO-GMPc por NMDA.** Se muestra el aumento de GMPc inducido por NMDA en función del nivel de GMPc basal alcanzado en el momento de añadir NMDA (sin perfundir GMPc, y perfundiendo GMPc a 0.1, 0.5 y 2 nM). ■ ratas control y ▲ ratas hiperamonémicas; ◆ ratas control y ▼ ratas hiperamonémicas con minibombas osmóticas conteniendo suero fisiológico; ● ratas control y □ ratas hiperamonémicas con minibombas osmóticas conteniendo GMPc.

### 6. La administración de GMPc extracelular aumenta la actividad de la óxido nítrico sintasa en cortes frescos de cerebelo de ratas hiperamonémicas

Los resultados anteriores muestran que la administración de GMPc extracelular 0.1 nM restaura la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo de ratas hiperamonémicas in vivo. Nos propusimos estudiar los

mecanismos moleculares por los que el GMPc extracelular restaura la función de la vía. Dado que es técnicamente imposible realizar estos estudios in vivo, utilizamos como sistema experimental cortes frescos de cerebelo de ratas control o hiperamonémicas (ver material y métodos, apartado 4, página 81). Este modelo ex vivo reproduce las alteraciones en la función de la vía glutamato-NO-GMPc encontradas en cerebelo de ratas hiperamonémicas in vivo (El-Mlili *et al.*, 2008).

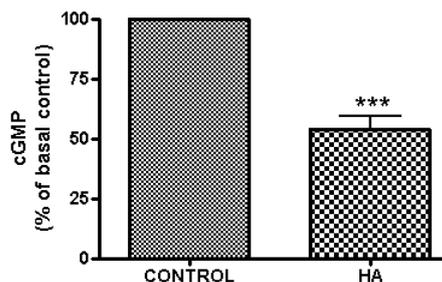
En cortes de cerebelo ex vivo de ratas con hiperamonemia crónica los niveles basales de GMPc están disminuidos ( $56 \pm 5\%$ ,  $p < 0.001$ ) respecto a las ratas control (Figura 29) como ocurre con el GMPc extracelular in vivo.

Datos anteriores del grupo muestran que en cortes frescos de cerebelo de ratas hiperamonémicas están disminuidas la función de la vía glutamato-NO-GMPc, la actividad NOS y su activación en respuesta a la activación del receptor NMDA (El-Mlili *et al.*, 2008; 2010). Por ello, estudiamos el efecto de la adición de GMPc extracelular sobre la actividad NOS.

La experiencia previa del laboratorio muestra que en el sistema de perfusión ex-vivo las concentraciones de sustancias añadidas que alcanzan las células diana son mucho menores que las aplicadas debido a cuestiones como la difusión dentro del tejido ó el flujo de perfusión. Por tanto realizamos los estudios en cortes perfundiendo soluciones con concentraciones de GMPc de 10 nM y 2 nM.

## RESULTADOS

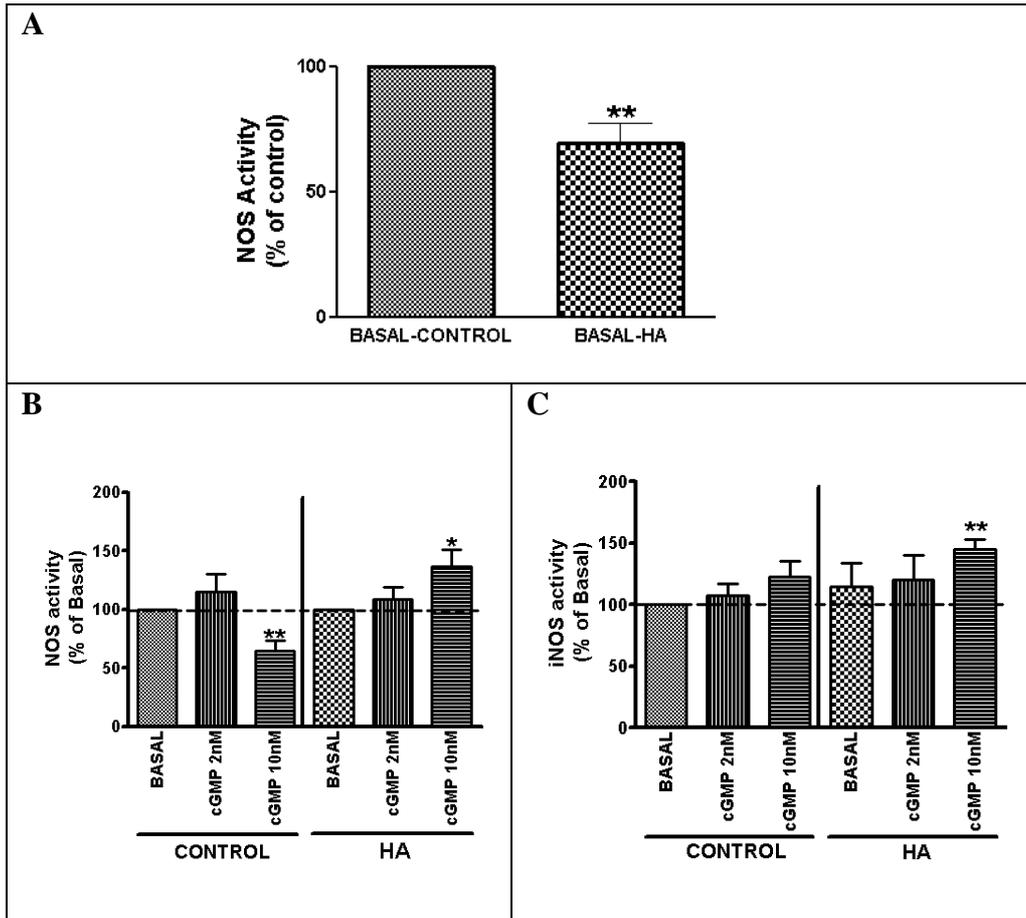
---



**Figura 29.** Los niveles basales de GMPc están disminuídos en cortes de cerebelo ex vivo de ratas con hiperamonemia crónica (HA). Los valores son la media  $\pm$  SEM de 18 ratas por grupo y se expresan en porcentaje de los niveles basales en cortes de ratas control. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*\*\* $p$ <0.001.

En cortes de ratas control la actividad NOS es de  $587 \pm 189$  cpm/mg/min. La actividad basal de la NOS está disminuida ( $p$ <0.05) en ratas hiperamonémicas ( $69 \pm 7\%$ ) (Figura 30A). El GMPc extracelular 10 nM aumenta la actividad NOS en ratas hiperamonémicas un  $37 \pm 15\%$  ( $p$ <0.05) y la disminuye en ratas control ( $64 \pm 9\%$ ) (Figura 30B). La adición de GMPc 2 nM no afecta la actividad NOS en ratas control ( $115 \pm 14\%$ ), ni en hiperamonémicas ( $108 \pm 10\%$ ).

El GMPc 10 nM tiende a aumentar la actividad de la NOS independiente de  $Ca^{2+}$  (NOS inducible) tanto en ratas control ( $122 \pm 12\%$ ) como en hiperamonémicas ( $145 \pm 7\%$ ,  $p$ <0.01) pero esta actividad representa una mínima parte ( $\approx 0,1\%$ ) de la actividad NOS total (Figura 30C).



**Figura 30.** Efecto de la adición de GMPc extracelular sobre la actividad NOS en cortes de cerebelo de ratas control e hiperamonémicas (HA). Se prepararon cortes frescos de cerebelo de ratas control e hiperamonémicas (HA), se incubaron en presencia o ausencia de GMPc extracelular a 2 y 10 nM y se determinó la actividad NOS como se describe en métodos. **(A)** Efecto de la hiperamonemia crónica sobre la actividad NOS. **(B)** Efecto del GMPc extracelular 2 y 10 nM sobre la actividad NOS. **(C)** Efecto del GMPc extracelular 2 y 10 nM sobre la actividad de la NOS independiente de  $Ca^{2+}$  (iNOS). Los valores son la media  $\pm$  SEM de 10 ratas por grupo y se expresan en porcentaje de la actividad en cortes de ratas control en A y en porcentaje de la actividad basal de cada grupo en B y C. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control en A y respecto al basal en B y C. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

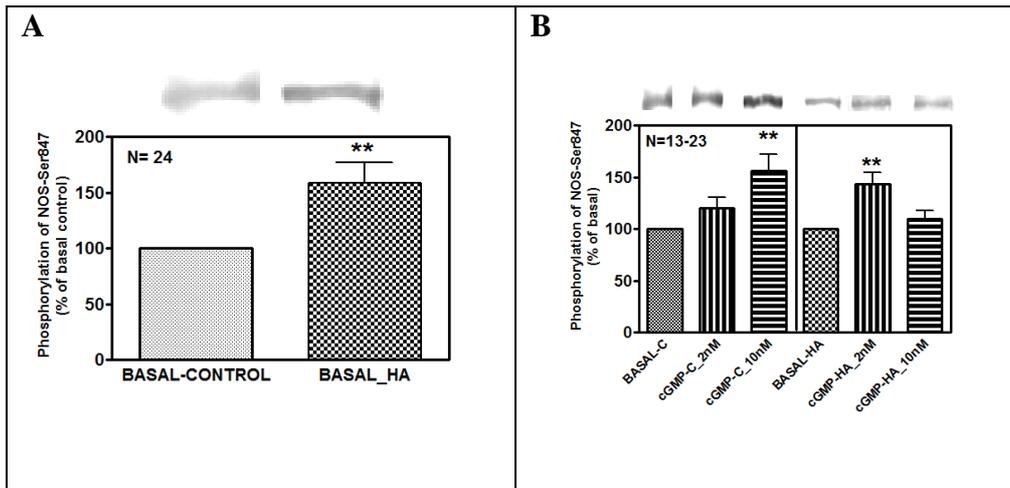
## **RESULTADOS**

---

### **7. Efecto de la adición de GMPc extracelular sobre la fosforilación de la nNOS en la serina 847 en cortes de cerebelo**

La fosforilación de la nNOS en el residuo de Ser847 reduce su actividad. Las ratas hiperamonémicas tienen aumentada esta fosforilación ( $p < 0.01$ ) respecto a las ratas control (Figura 31A) lo que contribuye a reducir su actividad. Uno de los mecanismos por los cuales el GMPc extracelular podría estar regulando la actividad de la NOS podría ser alterando la fosforilación de la Ser847. Por ello, estudiamos el efecto del GMPc extracelular sobre el grado de fosforilación de la Ser847 de la NOS por "immunoblotting". En ratas control el tratamiento con GMPc 2 nM no altera y el GMPc 10 nM aumenta ( $156 \pm 16\%$ ,  $p < 0.01$ ) la fosforilación de la Ser847 de la NOS. En ratas hiperamonémicas el GMPc 2 nM aumenta ( $143 \pm 11\%$ ,  $p < 0.01$ ) y el GMPc 10 nM no altera la fosforilación de la Ser847 de la NOS (Figura 31B).

Estos resultados indican que el GMPc extracelular modula la fosforilación de la nNOS en la Ser847 y, por tanto, su actividad.



**Figura 31. Efecto del GMPc extracelular sobre el grado de fosforilación de la nNOS en la Ser847 en cortes frescos de cerebelo.** (A) Efecto de la hiperamonemia crónica (HA) sobre los niveles basales de la fosforilación de la NOS en la Ser847. (B) Efecto del GMPc extracelular 2 y 10 nM sobre la fosforilación de la NOS en la Ser847. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 24 ratas y se expresan en porcentaje de los niveles de fosforilación en cortes de ratas control en A y en porcentaje de los niveles de fosforilación basal de cada grupo en B. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control en A y respecto a los basales en B, \*\*  $p < 0.01$ .

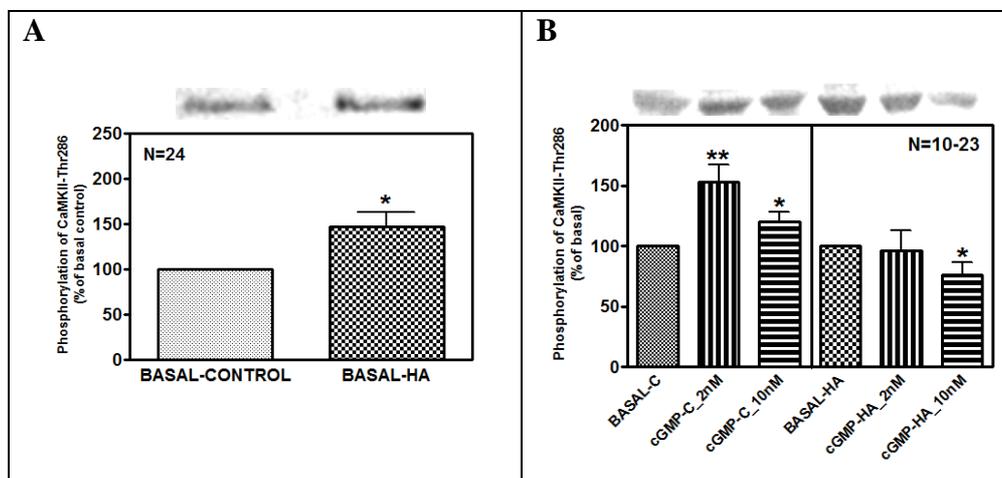
### 8. Efecto del GMPc extracelular sobre la fosforilación de la CaMKII en la treonina 286 en cortes de cerebelo de ratas control e hiperamonémicas

La fosforilación de la nNOS en la Ser847 la realiza la CaMKII que se activa por fosforilación en la Thr286. La hiperamonemia aumenta ( $147 \pm 15\%$ ,  $p < 0.01$ ) la fosforilación de la CaMKII en la Thr286 respecto a las ratas control (Figura 32A). Uno de los mecanismos por los que el GMPc extracelular podría estar regulando la fosforilación y la actividad de la NOS podría ser alterando la fosforilación de la Thr286 (y la actividad) de la CaMKII. Por ello, estudiamos el efecto del GMPc extracelular sobre el

## RESULTADOS

grado de fosforilación de la Thr286 de la CaMKII por “immunoblotting”. En ratas control, el tratamiento con GMPc 2 ó 10 nM aumenta la fosforilación de la CaMKII en la Thr286 ( $153 \pm 14\%$ ,  $p < 0.01$  y  $120 \pm 8\%$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente). En ratas hiperamonémicas el GMPc 2 nM no induce ningún cambio en la fosforilación de la CaMKII mientras que el tratamiento con GMPc 10 nM disminuye la fosforilación de la CaMKII en la Thr286 ( $76 \pm 10\%$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 32B).

Estos resultados indican que el GMPc extracelular modula la fosforilación de la CaMKII en la Thr286 y, por tanto, su actividad.



**Figura 32. Efecto del GMPc extracelular sobre la fosforilación en la Thr286 de la CaMKII en cortes frescos de cerebelo.** (A) Efecto de la hiperamonemia crónica (HA) sobre la fosforilación basal de la CaMKII-Thr286. (B) Efecto del GMPc extracelular 2 y 10 nM en ratas control (C) e hiperamonémicas (HA) sobre la fosforilación en la Thr286 de la CaMKII. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 24 ratas en A y de 10-23 ratas en B. Se expresan en porcentaje de los niveles de fosforilación en cortes de ratas control en A y en porcentaje de los niveles de fosforilación basal de cada grupo en B. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control en A y respecto a los basales en B, \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ .

**9. Efecto de la inhibición de la CaMKII sobre la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo in vivo analizada por microdiálisis**

Puesto que los resultados anteriores indican que el GMPc extracelular está inhibiendo la CaMKII en ratas hiperamonémicas, estudiamos por microdiálisis si en cerebelo in vivo un inhibidor de la CaMKII reproducía los efectos de la adición de GMPc sobre los niveles de GMPc extracelular basal y sobre la activación de la vía glutamato-NO-GMPc por NMDA.

Cuando administramos sólo inhibidor de CaMKII aumenta lenta y progresivamente el GMPc extracelular ligeramente en ratas control, alcanzando en la fracción 12 un  $136 \pm 31\%$  y marcadamente en las hiperamonémicas alcanzando un  $318 \pm 138\%$  del basal en la fracción 12 (Figura 33A).

La administración de NMDA en presencia del inhibidor aumenta el GMPc extracelular más en ratas hiperamonémicas (un  $700 \pm 137\%$ ) (Figura 34) que en las control (un  $374 \pm 168\%$ ). El aumento se calcula como el sumatorio de las diferencias entre los niveles de GMPc de las fracciones 13 a 16 y de la fracción 12 (Figura 34).

Analizamos a continuación el efecto de la administración de GMPc tras haber administrado el inhibidor de CaMKII (Figura 33B).

La administración del inhibidor de la CaMKII induce, como antes, un aumento de GMPc extracelular alcanzando un  $214 \pm 39\%$  del basal en la fracción 8 en ratas control y un  $193 \pm 43\%$  en las hiperamonémicas. A

## RESULTADOS

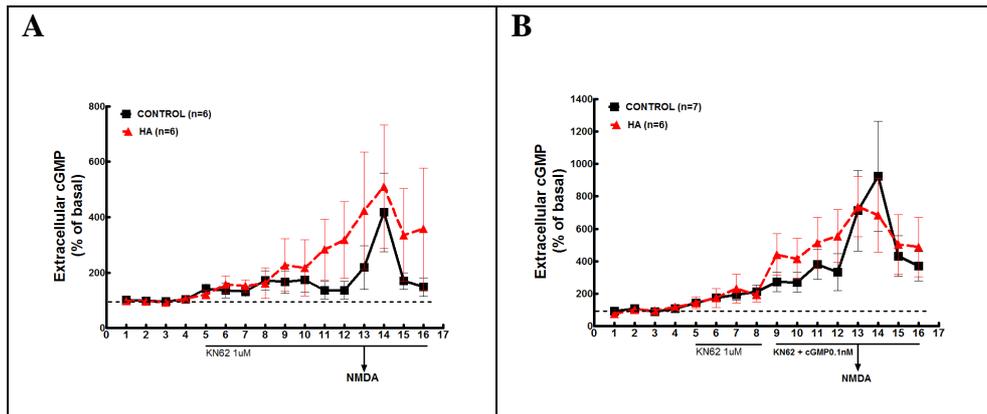
---

continuación, se añade GMPc 0.1 nM que continua aumentando los niveles de GMPc extracelular alcanzando en la fracción 12 un  $332 \pm 114\%$  en las control y un  $555 \pm 162\%$  del basal en hiperamonémicas (Figura 33B). En la fracción 13 se añade NMDA que aumenta el GMPc extracelular en hiperamonémicas un  $168 \pm 47\%$  (Figura 34) y en las control un  $338 \pm 180\%$  (Figura 34), expresado como el sumatorio del aumento de GMPc en las fracciones 13 a 16 con respecto a la fracción 12.

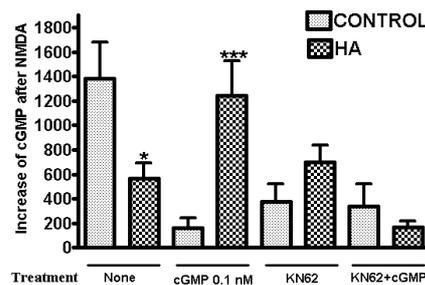
En la figura 34, se compara el aumento de GMPc inducido por NMDA tras los diferentes tratamientos administrados por microdiálisis: (i) ninguno, (ii) GMPc 0.1 nM, (iii) Inhibidor de la CaMKII 1  $\mu$ M (KN62) y (iv) KN62 y GMPc.

En las ratas control el aumento de GMPc tras la administración de NMDA es de  $1385 \pm 295\%$  y se reduce significativamente cuando administramos GMPc ( $157 \pm 85\%$ ,  $p= 0.001$ ), KN62 ( $374 \pm 147\%$ ) ó la combinación de KN62 y GMPc ( $338 \pm 180\%$ ) (Figura 34).

En las ratas hiperamonémicas el aumento de GMPc tras la administración de NMDA es de  $568 \pm 122\%$ . Con KN62 alcanza niveles ligeramente más altos ( $700 \pm 137\%$ ). Cuando administramos GMPc 0.1 nM hay un mayor aumento ( $1244 \pm 281\%$ ). En cambio, la combinación de KN62 y GMPc reduce el aumento de GMPc a  $168 \pm 47\%$  (Figura 34).



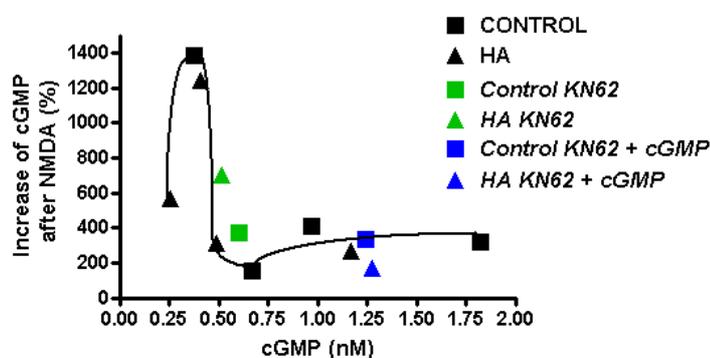
**Figura 33.** Efecto de un inhibidor de la CaMKII (KN62) y del GMPc exógeno sobre los niveles de GMPc extracelular y sobre la activación de la vía glutamato-NO-GMPc por NMDA en cerebelo de rata in vivo. Se realizó la perfusión con un flujo de 3 µl/min y se recogieron muestras cada 30 minutos. (A) En la fracción 5, se administró KN62 (1 µM) y en la fracción 13 se administró NMDA 0.3 mM a través de la sonda de microdialísis. (B) En la fracción 5, se administró KN62 (1 µM), en la fracción 9 el GMPc 0.1 nM y en la 13 NMDA 0.3 mM. El GMPc en el fluido extracelular del cerebelo se expresa en porcentaje del basal (las cuatro primeras fracciones). Cada punto es la media ± SEM de 6 ratas por grupo.



**Figura 34.** Efecto de un inhibidor de la CaMKII y del GMPc exógeno sobre el aumento de GMPc extracelular tras la activación de la vía glutamato-NO-GMPc por administración de NMDA en ratas control e hiperamonémicas (HA). Los datos son los mismos de la Figura 25C para GMPc 0.1 nM y de la Figura 33 para KN62 y KN62 + GMPc. El aumento de GMPc extracelular se expresa como el sumatorio de la diferencia entre los porcentajes de la fracción a partir de la cual se administra NMDA y las tres siguientes, respecto al porcentaje de la fracción anterior a la administración de NMDA. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control, \* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

## RESULTADOS

Para comprobar si los distintos grados de activación de la vía glutamato-NO-GMPc podrían estar asociados a diferentes concentraciones de GMPc extracelular basal alcanzadas, añadimos los valores correspondientes a la curva obtenida anteriormente (Figura 27). La administración de KN62 aumenta el GMPc basal, siendo éste ligeramente mayor en ratas control que en hiperamonémicas. La concentración de GMPc alcanzada supera el umbral óptimo de GMPc extracelular, reduciéndose la activación de la vía glutamato-NO-GMPc por NMDA en ratas control (Figura 35). La adición de KN62 y GMPc juntos induce un aumento mayor del GMPc extracelular basal, tanto en ratas control como en hiperamonémicas, reduciéndose la función de la vía glutamato-NO-GMPc (Figura 35).



**Figura 35. Efecto del nivel basal de GMPc sobre la activación de la vía glutamato-NO-GMPc por NMDA.** Se muestra el aumento de GMPc inducido por NMDA en función del nivel de GMPc basal alcanzado en el momento de añadir NMDA (sin perfundir GMPc, y perfundiendo GMPc a 0.1, 0.5 y 2 nM). ■ ratas control y ▲ ratas hiperamonémicas; ■ ratas control y ▲ ratas hiperamonémicas tratadas con KN62; ■ ratas control y ▲ ratas hiperamonémicas tratadas con KN62 en combinación con GMPc.

**10. Efecto de un inhibidor de la CaMKII en cortes frescos de cerebelo sobre los niveles de GMPc**

Puesto que en hiperamonemia la adición de GMPc extracelular disminuye la fosforilación de la CaMKII y en consecuencia su actividad, un inhibidor de la CaMKII debería reproducir los efectos del GMPc extracelular. Para comprobarlo analizamos los efectos sobre la concentración de GMPc de la administración de KN62 (inhibidor de la CaMKII) en cortes de cerebelo ex vivo.

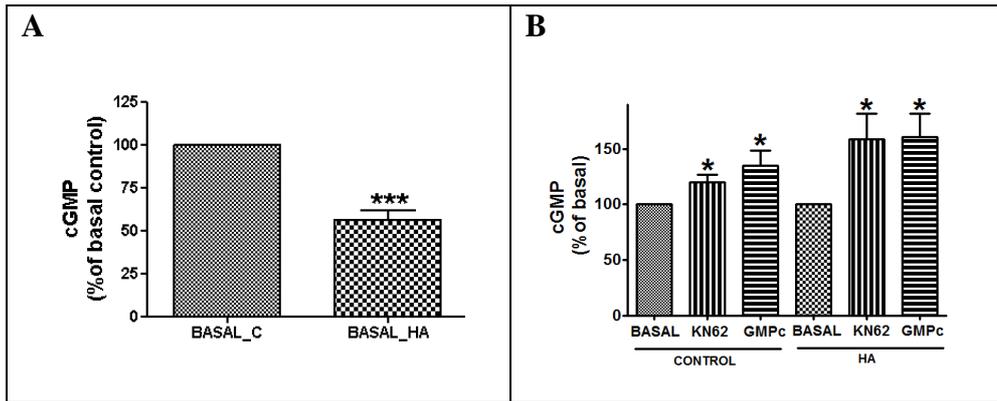
Como se ha descrito anteriormente, los niveles basales de GMPc están disminuidos en ratas hiperamonémicas ( $56 \pm 5\%$ ,  $p < 0.001$ ) respecto a las control (Figura 36A).

En las ratas hiperamonémicas, se produce un aumento de GMPc tanto si administramos KN62 ( $158 \pm 23\%$ ) como si administramos GMPc extracelular 10 nM ( $160 \pm 21\%$ ) (Figura 36B).

En ratas control la adición de KN62 tiende a aumentar el GMPc ( $120 \pm 6\%$ ) y la adición de GMPc 10 nM lo aumenta ( $134 \pm 13\%$ ) (Figura 36B).

Estos datos muestran que la adición de GMPc induce el mismo efecto que la de un inhibidor de la CaMKII.

## RESULTADOS

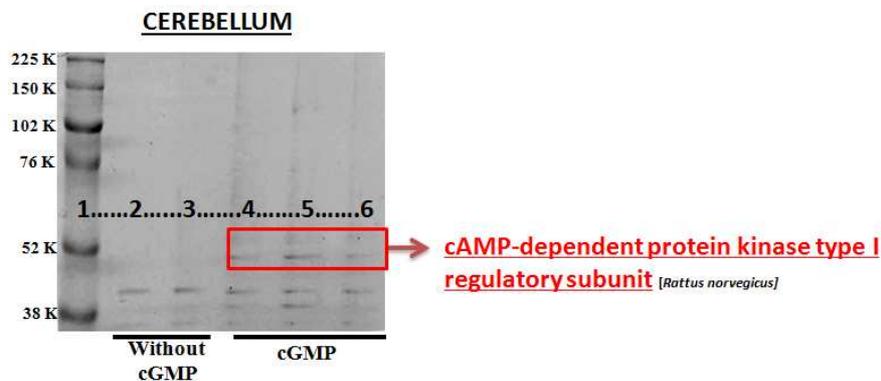


**Figura 36. Efecto del inhibidor de la CaMKII (KN62) sobre los niveles de GMPc en cortes frescos de cerebelo.** (A) Los niveles basales de GMPc están disminuidos en cortes de cerebelo de ratas con hiperamonemia crónica (HA) comparados con ratas control (C). (B) Efecto del KN62 10  $\mu$ M y de la adición de GMPc extracelular 10 nM sobre los niveles de GMPc. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 4 ratas por grupo y se expresan en porcentaje de la concentración basal de GMPc en cortes de ratas control en A y en porcentaje de la concentración basal de cada grupo en B. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto a las ratas control en A y respecto al basal de cada grupo en B; \* $p$ <0.05 \*\*\* $p$ <0.001.

### 11. Aislamiento de proteínas de membrana de cerebelo que unen GMPc extracelular

Los resultados anteriores muestran que el GMPc extracelular es capaz de modular la fosforilación y la actividad de la CaMKII y de la nNOS intracelulares y modular de este modo la función de la vía glutamato-NO-GMPc. Para ello debería unirse a alguna molécula de la membrana celular que transmitiría la señal al interior de la célula. Como un primer paso para intentar identificar la molécula que transmitiría dicha señal, aislamos las proteínas de membrana que unen GMPc. Las proteínas extraídas de membranas de cerebelo (ver material y métodos, apartado 5, página 88) se

incubaban con esferas de agarosa con o sin GMPc unido. La figura 37 muestra las proteínas que se han unido a las esferas separadas por electroforesis y teñidas con azul de Coomassie. Las bandas de las carreras de muestras incubadas con esferas de agarosa sin GMPc son uniones inespecíficas. Las bandas que se ven en las carreras de muestras incubadas con esferas con GMPc y que no aparecen en las de muestras incubadas con esferas sin GMPc son las proteínas de membrana que unen específicamente GMPc. Se enviaron a secuenciar y por espectrometría de masas, se identificó que la banda de Mr= 42 Kda que se observa en la figura 37 corresponde a la subunidad reguladora I de la proteína-quinasa dependiente de AMPc.



**Figura 37. Proteínas de membrana de cerebelo que unen GMPc.** Se aislaron las proteínas de membrana y tras incubar con agarosa con y sin GMPc unido se separaron por electroforesis en un gel de acrilamida al 8% y se tiñeron con azul de Coomassie. La carrera 1 muestra los marcadores de masas moleculares. Las carreras 2 y 3 son muestras de proteínas incubadas con esferas de agarosa sin GMPc. Las carreras 4-6 son muestras de proteínas incubadas con esferas de agarosa que tienen unido GMPc. Cuadrado rojo: bandas ( $\approx 42$  Kda) enviadas a secuenciar por espectrometría de masas que corresponden a la subunidad reguladora I de la proteína-quinasa dependiente de AMPc.

## RESULTADOS

---

### **12. Efecto de un inhibidor impermeable de PKA sobre la función de la vía glutamato-NO-GMPc analizada por microdiálisis en cerebelo in vivo**

Los resultados anteriores muestran que el GMPc extracelular se une en la membrana a la subunidad reguladora I de la proteína-quinasa dependiente de AMPc (PKA). En base a estos resultados, decidimos estudiar si la recuperación de la función de la vía glutamato-NO-GMPc en ratas hiperamonémicas tras administrarles GMPc extracelular, es un efecto mediado por la PKA. Para ello, administramos un inhibidor impermeable de PKA, que no atraviesa la membrana celular, a través de una sonda de microdiálisis colocada en cerebelo y tras 4 fracciones con inhibidor añadimos el GMPc extracelular.

Cuando administramos sólo inhibidor impermeable de PKA se induce un aumento de GMPc extracelular tanto en ratas control como en hiperamonémicas alcanzando en la fracción 9 un  $209 \pm 48\%$  y un  $264 \pm 61\%$  del basal, respectivamente (Figura 38A). La administración de NMDA en presencia del inhibidor de PKA aumenta el GMPc extracelular en ratas hiperamonémicas un  $915 \pm 115\%$  ( $p < 0.01$ ) y en las control un  $198 \pm 126\%$ , expresado como el sumatorio del aumento de GMPc en las fracciones 10 a 13 respecto al de la fracción 9 (Figura 39).

Estos datos muestran que el inhibidor impermeable de PKA aumenta el GMPc extracelular basal tanto en ratas control como en hiperamonémicas. En ratas hiperamonémicas mejora la función de la vía glutamato-NO-GMPc

y en ratas control la reduce, actuando de modo similar al GMPc 0.1 nM añadido exógenamente.

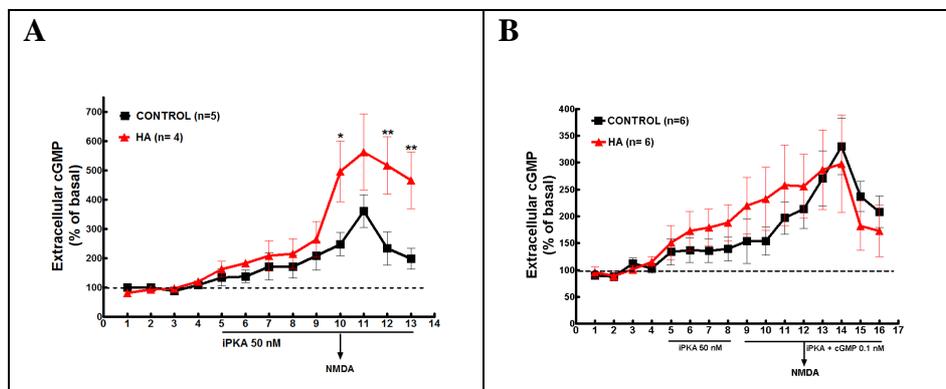
Analizamos a continuación el efecto de la administración de GMPc tras haber administrado el inhibidor de PKA (Figura 38B). La administración del inhibidor impermeable de PKA aumenta el GMPc extracelular alcanzando un  $139 \pm 22\%$  del basal en la fracción 8 en ratas control y un  $188 \pm 33\%$  en las hiperamonémicas. A continuación, se añade GMPc que continua aumentando los niveles de GMPc extracelular alcanzando en las control un  $197 \pm 30\%$  y un  $258 \pm 75\%$  en hiperamonémicas en la fracción 11 (Figura 38B). En la fracción 12 se añade NMDA que aumenta muy poco el GMPc extracelular en hiperamonémicas, un  $61 \pm 57\%$  ( $p < 0.05$ ) y lo aumenta más en las control, un  $419 \pm 144\%$ , expresado como el sumatorio del aumento de GMPc en las fracciones 12 a 15 respecto al de la fracción 11 (Figura 39).

La administración independiente de GMPc extracelular o del inhibidor de PKA aumentan la función de la vía glutamato-NO-GMPc en ratas hiperamonémicas y la inhiben en las control. En cambio, si administramos ambos compuestos conjuntamente, el aumento de GMPc tras NMDA es menor tanto en las control como en las hiperamonémicas, por tanto hay una disminución de la función de la vía en ambos grupos.

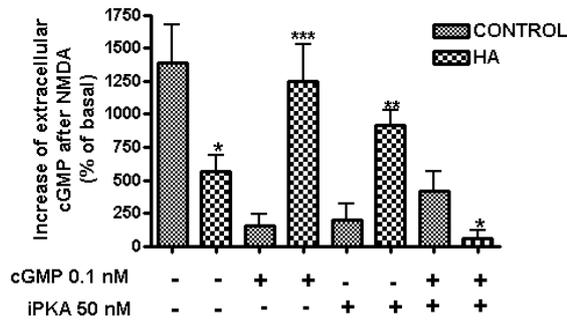
Para analizar si estos efectos sobre la función de la vía glutamato-NO-GMPc podrían ser debidos a los diferentes niveles de GMPc extracelular basal alcanzado, añadimos estos valores a la curva obtenida anteriormente (Figura 27). La administración de inhibidor impermeable de PKA aumenta el GMPc basal. En ratas hiperamonémicas la concentración de GMPc

## RESULTADOS

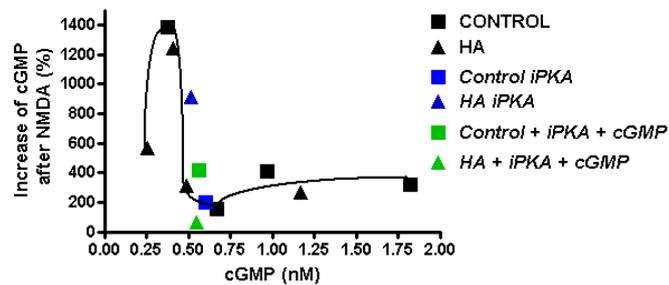
alcanzada (0.52 nM) está en el rango óptimo de funcionamiento de la vía glutamato-NO-GMPc, por lo que su función aumenta respecto a las ratas hiperamonémicas sin tratamiento (Figura 40). En ratas control el GMPc basal alcanzado supera del umbral óptimo de concentración de GMPc extracelular, reduciéndose la activación de la vía glutamato-NO-GMPc por NMDA (Figura 40). La adición conjunta de inhibidor impermeable de PKA y GMPc induce un aumento mayor del nivel basal de GMPc extracelular, tanto en ratas control como en hiperamonémicas, reduciéndose la función de la vía glutamato-NO-GMPc (Figura 40).



**Figura 38.** Efecto de un inhibidor impermeable de la PKA sólo ó en combinación con GMPc exógeno sobre los niveles de GMPc extracelular y sobre la activación de la vía glutamato-NO-GMPc por NMDA en cerebelo de rata *in vivo*. Se realizó la perfusión con un flujo de 3  $\mu$ l/min y se recogieron muestras cada 30 minutos. Se determinó el GMPc en el fluido extracelular del cerebelo. Se representan los niveles de GMPc extracelular expresado en porcentaje respecto al basal (las cuatro primeras fracciones). Cada punto es la media  $\pm$  SEM del número de ratas indicado. (A) Efecto del inhibidor impermeable de la PKA. En la fracción 5, se administró inhibidor impermeable de PKA (50 nM) y en la fracción 10 se administró NMDA 0.3 mM a través de la sonda de microdiálisis. (B) Efecto del inhibidor impermeable de la PKA en combinación con GMPc. En la fracción 5, se administró inhibidor impermeable de PKA (50 nM), en la fracción 9 GMPc 0.1nM y en la fracción 12 NMDA 0.3 mM a través de la sonda de microdiálisis.. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \*p<0.05 y \*\*p<0.01.



**Figura 39.** Efecto de un inhibidor impermeable de PKA y del GMPc exógeno sobre el aumento del GMPc extracelular tras la activación de la vía glutamato-NO-GMPc por administración de NMDA en ratas control e hiperamonémicas (HA). Los datos son los mismos de la Figura 25C para GMPc 0.1 nM y de la Figura 38 para iPKA y iPKA + GMPc. El aumento de GMPc extracelular se expresa como el sumatorio de la diferencia entre los porcentajes de la fracción a partir de la cual se administra NMDA y las tres siguientes, respecto al porcentaje de la fracción anterior a la administración de NMDA. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figura 40.** Efecto del nivel basal de GMPc sobre la activación de la vía glutamato-NO-GMPc por NMDA. Se muestra el aumento de GMPc inducido por NMDA en función del nivel de GMPc basal alcanzado en el momento de añadir NMDA (sin perfundir GMPc, y perfundiendo GMPc a 0.1, 0.5 y 2 nM). ■ ratas control y ▲ ratas hiperamonémicas; ■ ratas control y ▲ ratas hiperamonémicas tratadas con inhibidor impermeable de PKA (iPKA); ■ ratas control y ▲ ratas hiperamonémicas tratadas con iPKA en combinación con GMPc.

## RESULTADOS

---

Las concentraciones de GMPc extracelular en condiciones basales y tras los distintos tratamientos descritos se resumen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Concentración de GMPc extracelular alcanzado en ratas control (C) e hiperamonémicas (HA) tras diferentes tratamientos.

<u>Tratamiento</u>	GMPc Extracelular (nM)	
	C	HA
SIN	0.38 ± 0.02	0.26 ± 0.02
Minibombas osmóticas (sin tratamiento)	0.38 ± 0.02	0.26 ± 0.02
Minibombas osmóticas (con GMPc)	0.25 ± 0.02	0.35 ± 0.03
cGMP 2 nM	1.82 ± 0.3	1.17 ± 0.2
cGMP 0.5 nM	0.97 ± 0.1	0.49 ± 0.03
cGMP 0.1 nM	0.67 ± 0.1	0.41 ± 0.01
KN62	0.60 ± 0.1	0.52 ± 0.2
KN62 + cGMP	1.24 ± 0.2	1.28 ± 0.2
Inhibidor de PKA	0.60 ± 0.1	0.52 ± 0.08
Inhibidor de PKA + GMPc	0.56 ± 0.1	0.55 ± 0.1

Los valores son la media ± SEM del nivel de GMPc extracelular tras los tratamientos indicados.

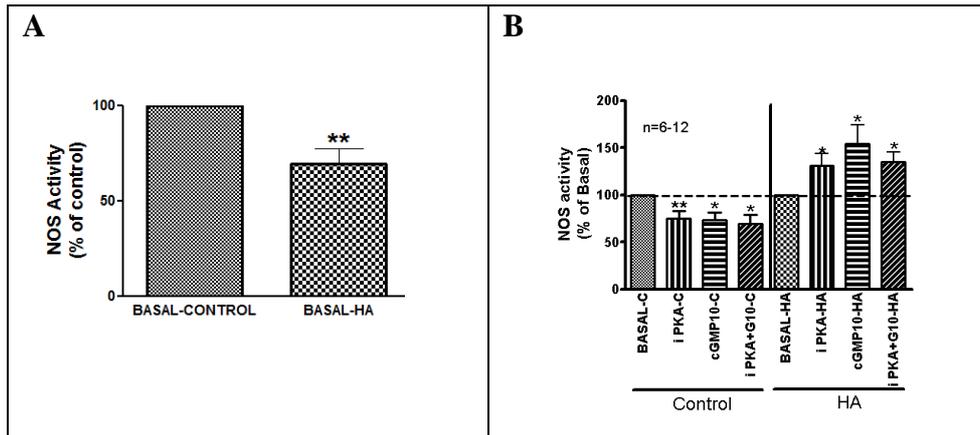
**13. Efecto de un inhibidor impermeable de PKA sobre la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cortes frescos de cerebelo**

**13.1. Efecto de un inhibidor impermeable de PKA sobre la actividad de la óxido nítrico sintasa**

Para estudiar si los efectos del GMPc extracelular en cortes sobre la actividad NOS son mediados por la PKA, incubamos cortes frescos de cerebelo con un inhibidor impermeable de la PKA. Como se ha descrito anteriormente, en cortes de ratas control la actividad NOS es de  $587 \pm 189$  cpm/mg/min y en ratas hiperamonémicas está disminuida ( $69 \pm 7\%$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 41A). El tratamiento con GMPc extracelular 10 nM aumenta la actividad NOS en ratas hiperamonémicas a un  $154 \pm 20\%$  ( $p < 0.05$ ) y la disminuye en ratas control ( $73 \pm 8\%$ ) (Figura 41B).

La adición de un inhibidor impermeable de la PKA ( $1 \mu\text{M}$ ), al igual que el GMPc extracelular, también disminuye la actividad NOS en las ratas control ( $75 \pm 7\%$ ,  $p < 0.01$ ), y la aumenta en ratas hiperamonémicas ( $131 \pm 13\%$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 41B). Si administramos inhibidor de PKA y, a continuación, GMPc, también hay un aumento de actividad NOS en ratas hiperamonémicas ( $135 \pm 10\%$ ,  $p < 0.05$ ) y una disminución en las control ( $69 \pm 9\%$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 41B). Así pues, el inhibidor impermeable de la PKA induce el mismo efecto que la adición de GMPc extracelular.

## RESULTADOS



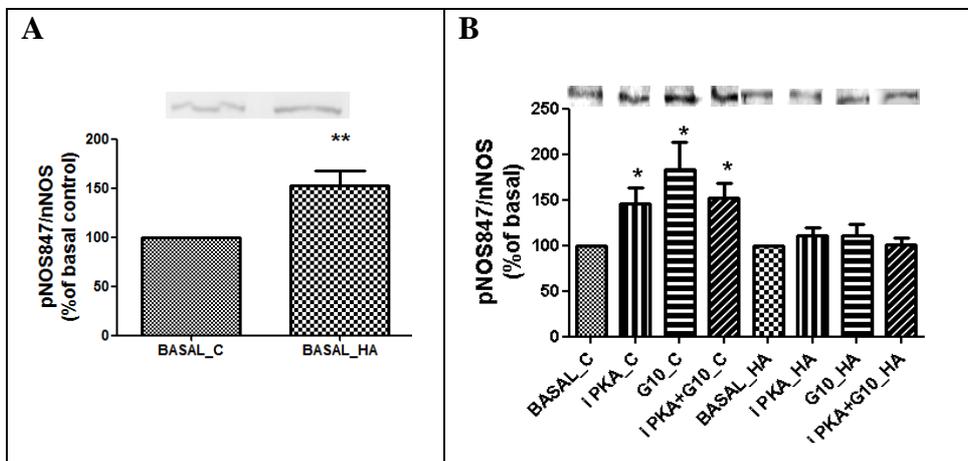
**Figura 41. Efecto de la adición del inhibidor impermeable de PKA sobre la actividad de la NOS en cortes de cerebelo.** Se prepararon cortes frescos de cerebelo de ratas control e hiperamonémicas (HA) y se incubaron en presencia o ausencia de GMPC extracelular 10 nM y/o del inhibidor impermeable de PKA (iPKA) 1  $\mu$ M, como se describe en métodos. **(A)** Efecto de la hiperamonemia crónica (HA) sobre los niveles basales de la actividad NOS. **(B)** Efecto del inhibidor impermeable de PKA sobre la actividad NOS. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 6-12 ratas por grupo y se expresan en porcentaje de la actividad en cortes de ratas control en A y en porcentaje de la actividad basal de cada grupo en B. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01.

### 13.2. Efecto del inhibidor impermeable de PKA sobre la fosforilación de la nNOS en la serina 847 en cortes de cerebelo

Las ratas hiperamonémicas tienen aumentada la fosforilación de la nNOS en la serina 847 ( $p$ <0.01) respecto a las ratas control (Figura 42A) lo que contribuye a reducir su actividad. Como se ha indicado anteriormente, el tratamiento con GMPC 10 nM aumenta la fosforilación de la Ser847 de la NOS en ratas control pero no en las hiperamonémicas. Estudiamos el efecto del inhibidor impermeable de PKA en cortes frescos de cerebelo y comprobamos que, en ratas control, también aumenta la fosforilación de la

NOS en la Ser847 tanto si se administra solo ( $145 \pm 18\%$ ,  $p < 0.05$ ) como en combinación con GMPc ( $151 \pm 17\%$ ,  $p < 0.05$ ). En ratas hiperamonémicas ni el GMPc 10 nM ni el inhibidor impermeable de PKA alteran la fosforilación de la NOS en la Ser847 (Figura 42B).

Estos resultados sugieren que el GMPc extracelular, en las ratas control, podría estar aumentando la fosforilación y disminuyendo la actividad de la nNOS mediante la inhibición de la PKA. El inhibidor impermeable de la PKA estaría reproduciendo ese mismo efecto.



**Figura 42. Efecto del inhibidor impermeable de PKA sobre el grado de fosforilación de la nNOS en la Ser847 en cortes frescos de cerebelo. (A)** Efecto de la hiperamonemia crónica (HA) sobre la fosforilación de la NOS en la Ser847. **(B)** Efecto del inhibidor impermeable de PKA (iPKA) 1  $\mu$ M y/o del GMPc 10 nM sobre la fosforilación de la NOS en la Ser847. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 9-12 ratas y se expresan en porcentaje de los niveles de fosforilación en cortes de ratas control en A y en porcentaje de los niveles de fosforilación basal de cada grupo en B. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ .

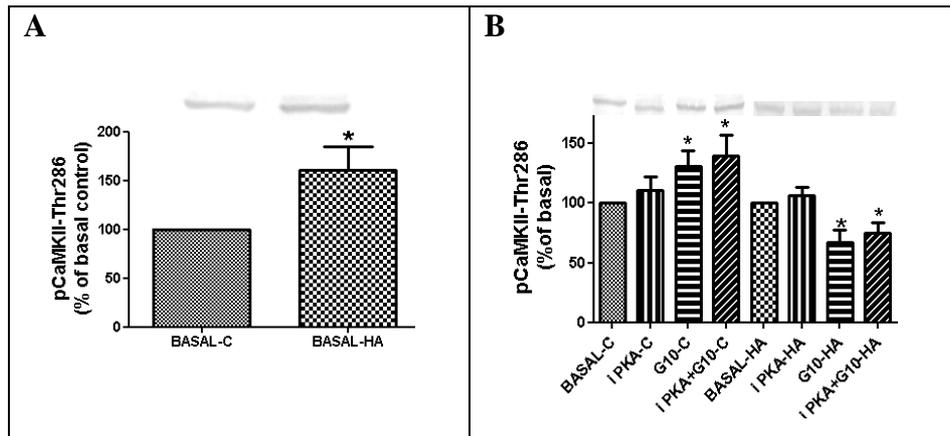
## **RESULTADOS**

---

### **13.3. Efecto del inhibidor impermeable de PKA sobre la fosforilación de la CaMKII en la treonina 286 en cortes de cerebelo**

Como se ha indicado anteriormente, en ratas control el tratamiento con GMPc 10 nM aumenta la fosforilación de la CaMKII en la Thr286 ( $p < 0.05$ ). Para estudiar si este efecto está mediado por la PKA añadimos el inhibidor impermeable de PKA en cortes frescos de cerebelo y analizamos la fosforilación por “immunobloting”. En las ratas control, el inhibidor no ejerce ningún efecto sobre la fosforilación de la CaMKII ni impide el aumento en la fosforilación que se produce al añadir GMPc. En ratas hiperamonémicas, el tratamiento con GMPc 10 nM disminuye la fosforilación de la CaMKII en la Thr286 ( $p < 0.05$ ) y el inhibidor impermeable de PKA no anula este efecto (Figura 43B).

Estos resultados indican que el GMPc extracelular modula la fosforilación de la CAMKII en la Thr286 y, por tanto, su actividad, pero estos efectos no se reproducen con un inhibidor de PKA.



**Figura 43. Efecto del inhibidor impermeable de PKA sobre la fosforilación en la Thr286 de la CaMKII en cortes frescos de cerebelo.** (A) Efecto de la hiperamonemia crónica (HA) sobre la fosforilación basal de la CaMKII-Thr286. (B) Efecto del inhibidor impermeable de PKA (iPKA) 1  $\mu$ M sobre la fosforilación en la Thr286 de la CaMKII. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 12 ratas en A y de 9-12 ratas en B. Se expresan en porcentaje de los niveles de fosforilación en cortes de ratas control en A y en porcentaje de los niveles de fosforilación basal de cada grupo en B. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p < 0.05$ .

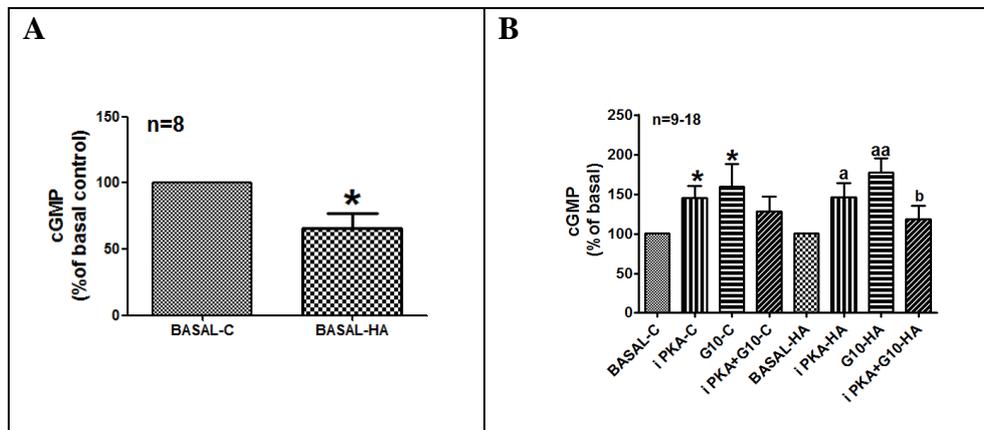
#### 13.4. Efecto del inhibidor impermeable de PKA sobre el GMPc total en cortes de cerebelo

Para comprobar si en cortes de cerebelo ex vivo el GMPc exógeno restaura los niveles de GMPc a través de la PKA, administramos un inhibidor impermeable de la PKA sólo ó en combinación con GMPc extracelular y analizamos los efectos sobre la concentración de GMPc.

Como se ha descrito anteriormente, los niveles basales de GMPc están disminuidos en ratas hiperamonémicas respecto a las control (Figura 44A). En las ratas hiperamonémicas, hay un aumento de GMPc si administramos

## RESULTADOS

inhibidor impermeable de PKA ( $146 \pm 17\%$ ,  $p < 0.05$ ), ó GMPc exógeno ( $177 \pm 18\%$ ,  $p < 0.01$ ) y este aumento es significativamente menor ( $118 \pm 16\%$ ) si añadimos, previamente, el inhibidor impermeable de PKA ( $p < 0.05$ ) (Figura 44B). En ratas control, la adición de inhibidor impermeable de PKA induce un aumento significativo de GMPc ( $145 \pm 14\%$ ,  $p < 0.05$ ) que no se observa cuando se añade GMPc exógeno. Si administramos los dos compuestos el aumento de GMPc es menor ( $128 \pm 18\%$ ) (Figura 44B).



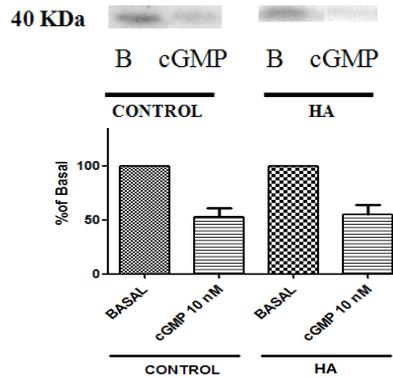
**Figura 44. Efecto del inhibidor impermeable de PKA sobre el GMPc total en cortes de cerebelo. (A)** Los niveles basales de GMPc están disminuidos en cortes de cerebelo de ratas con hiperamonemia crónica (HA). **(B)** Efecto del GMPc extracelular 10 nM y/o del inhibidor impermeable de PKA 1  $\mu$ M sobre los niveles de GMPc total. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 8-18 ratas por grupo y se expresan en porcentaje de la concentración basal de GMPc en cortes de ratas control en A y en porcentaje de la concentración basal de GMPc de cada grupo en B. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control \* $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ , "a"  $p < 0.05$  y "aa"  $p < 0.01$  respecto al grupo de hiperamonemia y "b"  $p < 0.05$  respecto al grupo GMPc de hiperamonemia.

### **14. Efecto del GMPc extracelular sobre la fosforilación de proteínas de membrana de cerebelo**

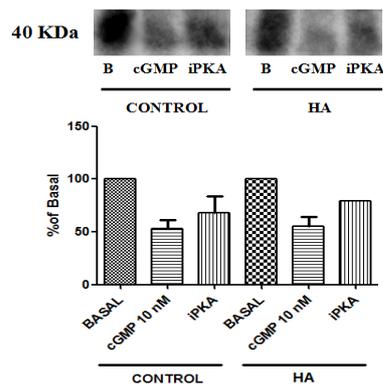
Los resultados anteriores muestran que el GMPc extracelular se une a la subunidad reguladora I de la proteín-quinasa A. Para intentar comprobar si modula su actividad estudiamos si en cortes frescos de cerebelo alteraba la fosforilación de alguna proteína de membrana. Para ello añadimos  $^{32}\text{P}$ -ATP y analizamos por fluorografía las proteínas fosforiladas (ver material y métodos, apartado 4.4, página 86). Los resultados muestran que el GMPc extracelular disminuye la fosforilación de una proteína de membrana con una masa molecular relativa de  $\approx 40$  KDa (Figura 45).

Para evaluar si el efecto del GMPc sobre la fosforilación está mediado por la PKA, estudiamos el efecto del inhibidor impermeable. Al añadir el inhibidor impermeable de la PKA se observa una disminución similar en la fosforilación de esta proteína (Figura 46). Estos resultados y los obtenidos anteriormente sugieren que el GMPc extracelular actúa sobre la proteín-quinasa A inhibiéndola.

## RESULTADOS



**Figura 45.** El GMPc extracelular disminuye la fosforilación de una proteína de membrana de  $M_r \approx 40$  KDa en cortes de cerebelo. La adición de GMPc extracelular 10 nM en cortes frescos de cerebelo disminuye la fosforilación de una proteína de 40 KDa en membrana de cerebelo de ratas control e hiperamónémicas. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 2 ratas por grupo y se expresan en porcentaje de los niveles de fosforilación basal de cada grupo.



**Figura 46.** El GMPc extracelular y el inhibidor impermeable de PKA reducen la fosforilación de una proteína de membrana de  $M_r \approx 40$  KDa en cortes de cerebelo. La adición de GMPc extracelular 10 nM ó del inhibidor impermeable de PKA 1  $\mu$ M en cortes frescos de cerebelo disminuyen la fosforilación de una proteína de 40 KDa en membrana de cerebelo de ratas control e hiperamónémicas. Los valores son la media  $\pm$  SEM de 2 ratas por grupo y se expresan en porcentaje de los niveles de fosforilación basal de cada grupo.

# **DISCUSIÓN**



**DISCUSIÓN**

**1. Tratamiento crónico intracerebral con GMPc extracelular en ratas control e hiperamonémicas**

**1.1. El tratamiento crónico con GMPc extracelular restaura la actividad vertical y algunos marcadores inflamatorios en ratas hiperamonémicas**

Estudiamos los efectos de la administración crónica de GMPc extracelular sobre la actividad motora tras una y tres/cuatro semanas de tratamiento midiendo los parámetros actividad ambulatoria, vertical y velocidad media durante 3 días.

La actividad ambulatoria y la velocidad media están disminuidas en ratas hiperamonémicas durante la noche pero la diferencia con las controles no llega a ser significativa. El GMPc extracelular no afecta a los movimientos ambulatorios ni a la velocidad media.

La hiperamonemia crónica reduce la actividad vertical durante la noche. El tratamiento durante tres-cuatro semanas con GMPc extracelular restaura la actividad vertical en hiperamonémicas. Este efecto no se observa tras una semana de tratamiento, sugiriendo que es necesario administrar el tratamiento de forma crónica para que pueda corregir las alteraciones responsables de la disminución de la actividad vertical.

El control de la actividad motora es un fenómeno complejo en el que intervienen diversos circuitos neuronales. Las ratas con encefalopatía hepática crónica por anastomosis porta-cava (PCS), presentan alteraciones motoras como hipoquinesia, que es debida a un aumento del glutamato

## DISCUSIÓN

---

extracelular y de la activación del receptor metabotrópico de glutamato mGluR1 en la sustancia negra pars reticulata (SNr) (Cauli *et al.*, 2006). El tratamiento crónico con ibuprofeno, un antiinflamatorio, disminuye el glutamato extracelular en la SNr y elimina la hipoquinesia. Por tanto, la inflamación contribuye a la inducción de alteraciones motoras como la hipoquinesia en modelos de encefalopatía hepática (Cauli *et al.*, 2009c).

La inflamación y la hiperamonemia actúan de forma sinérgica en la inducción de las alteraciones cognitivas y motoras en la encefalopatía hepática (Felipo, 2013).

Nuestro grupo ha demostrado, utilizando el mismo modelo de hiperamonemia crónica moderada utilizado en esta tesis, que la hiperamonemia crónica per se, a niveles similares a los presentes en pacientes con cirrosis hepática y en ratas PCS, induce neuroinflamación (Rodrigo *et al.*, 2010), activando la microglía, que libera factores inflamatorios. Esta neuroinflamación media los efectos deletéreos de la hiperamonemia crónica sobre la función motora. El tratamiento con un antiinflamatorio (ibuprofeno) reduce la activación de la microglía y restaura la función motora en ratas hiperamonémicas (Rodrigo *et al.*, 2010).

En esta tesis hemos comprobado que la hiperamonemia aumenta y el tratamiento crónico con GMPc extracelular normaliza los niveles de algunos factores inflamatorios como el TNF- $\alpha$  en hipocampo y la IL-1B e IBA-1 en cerebelo. La disminución de la neuroinflamación por el tratamiento crónico intracerebral con GMPc podría mediar la normalización de la actividad motora vertical en ratas hiperamonémicas.

No conocemos los mecanismos por los que el GMPc extracelular reduce la neuroinflamación. Se ha descrito que, en modelos de esclerosis múltiple ó de Alzhéimer en ratones, el aumento de los niveles de GMPc intracelular por inhibición de su degradación, disminuye la neuroinflamación. El sildenafil, inhibidor de la fosfodiesterasa 5, aumenta el GMPc, reduce factores inflamatorios (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 and COX-2), previene la desmielinización en cerebelo y mejora los signos clínicos (disminuye el *clinical score*) en ratones con esclerosis múltiple (Pifarre *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2012). Ratones transgénicos modelo de enfermedad de Alzhéimer muestran disminución de GMPc en hipocampo, neuroinflamación y deterioro cognitivo. El sildenafil aumenta el GMPc, reduce la neuroinflamación (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) y corrige los déficits cognitivos (Zhang *et al.*, 2013). Estos estudios apoyan que el aumento de GMPc intracelular modula la neuroinflamación. Nuestros datos muestran que el GMPc extracelular también la modula, disminuyéndola en ratas hiperamonémicas. La disminución de la neuroinflamación sería responsable de la recuperación de la actividad motora vertical.

### **1.2. El tratamiento crónico con GMPc extracelular normaliza los niveles basales de GABA extracelular y la coordinación motora en ratas hiperamonémicas**

La coordinación motora se modula esencialmente por la neurotransmisión GABAérgica en cerebelo. Los niveles basales de GABA y la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> en cerebelo modulan la coordinación motora (Hanchar *et al.*, 2005). El aumento del tono GABAérgico y la

## DISCUSIÓN

---

activación tónica de los receptores GABA en células granulares del cerebelo inducen incoordinación motora (Hanchar *et al.*, 2005) en ratas.

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitor en el cerebro de los mamíferos, donde activa diferentes receptores GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>C</sub>. El GABA liberado de terminales presinápticos es eliminado de la hendidura sináptica por los transportadores de GABA. Este mecanismo es clave en la finalización de las corrientes sinápticas. La captación de GABA por los transportadores mantiene bajos los niveles de GABA extracelular en el cerebelo, lo que impide la activación tónica excesiva de los receptores sinápticos y extrasinápticos (Chiu *et al.*, 2005). En el cerebelo se han identificado transportadores de GABA de los subtipos 1 (GAT1) y 3 (GAT3). La inhibición de GAT1 aumenta los niveles de GABA extracelular en ratones (Chiu *et al.*, 2005).

Los ratones knock-out que carecen de GAT1 muestran un aumento de GABA extracelular y una disminución en la coordinación motora en test de rotarod que evalúan dicha habilidad (Chiu *et al.*, 2005).

La exposición a contaminantes ambientales como los bifenilos policlorados aumentan el GABA extracelular en cerebelo y la activación tónica de los receptores GABA<sub>A</sub>. Existe una excelente correlación entre la concentración de GABA extracelular en cerebelo y la incoordinación motora medida en el rotarod, lo que indica que el aumento de GABA extracelular sería responsable del deterioro de la coordinación motora en ratas expuestas perinatalmente a estos contaminantes (Boix *et al.*, 2010).

La hiperamonemia crónica aumenta la concentración de GABA extracelular (Cauli *et al.*, 2009a). El tratamiento con GMPc extracelular la normaliza, reduciéndola a niveles similares a los de las ratas control.

Dado que, como se describe arriba, los niveles de GABA extracelular modulan la incoordinación motora (Grimm *et al.*, 1975; Chiu *et al.*, 2005; Boix *et al.*, 2010; Gonzalez-Usano *et al.*, 2014), el hecho de que el tratamiento crónico con GMPc extracelular normalice los niveles de GABA extracelular en cerebelo parece ser la causa más probable de la mejora de la coordinación motora en ratas hiperamonémicas. De hecho, en nuestro estudio también existe una clara correlación entre los niveles extracelulares de GABA y el número de resbalones en el test de coordinación motora del *beam walking*.

Además, en ratas hiperamonémicas, la administración crónica de pregnenolona sulfato también reduce los niveles de GABA extracelular y normaliza la coordinación motora (Gonzalez-Usano *et al.*, 2014), lo que refuerza la idea de que la normalización de la coordinación motora por el GMPc extracelular es consecuencia de la normalización de los niveles de GABA extracelular. No conocemos los mecanismos por los que el GMPc extracelular normaliza el GABA extracelular.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con GMPc extracelular restaura la actividad y la coordinación motoras en ratas con hiperamonemia. Dado que los pacientes con encefalopatía hepática manifiestan alteraciones motoras (Felipo *et al.*, 2012), estos resultados indican que el aumento del GMPc extracelular, sería un posible

## **DISCUSIÓN**

---

procedimiento terapéutico para mejorar la actividad e incoordinación motoras en pacientes con encefalopatía hepática mínima o clínica.

### **1.3. El tratamiento crónico con GMPc extracelular restaura la capacidad de aprendizaje y memoria espacial**

Para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial hemos utilizado el test del laberinto acuático de Morris (MWM) y el laberinto radial.

#### **1.3.1. El tratamiento crónico con GMPc extracelular restaura el aprendizaje en el test del MWM en ratas hiperamonémicas**

En el MWM las ratas hiperamonémicas tienen disminuida la capacidad de aprendizaje espacial, que se recupera por la administración de GMPc extracelular.

El aprendizaje y memoria espacial se modula esencialmente en el hipocampo (Biegler y Morris, 1993). En ratas PCS, con EH debida a fallo hepático crónico, también está disminuida la memoria espacial en el MWM (Monfort *et al.*, 2007; Mendez *et al.*, 2008).

La potenciación a largo plazo (long-term potentiation, LTP) dependiente del receptor NMDA en hipocampo se considera un mecanismo esencial en algunas formas de aprendizaje y memoria espacial incluido el test de MWM (Bliss y Collingridge, 1993). Ratones knockout para la subunidad epsilon 1 del receptor NMDA tienen disminuida la LTP y reducida la capacidad de aprendizaje del MWM (Sakimura *et al.*, 1995).

La inducción y el mantenimiento de la LTP dependiente del receptor NMDA requieren la activación de la vía glutamato-NO-GMPc. El consiguiente aumento de GMPc activa la proteín-quinasa dependiente de GMPc (PKG), que fosforila y activa la fosfodiesterasa 5, aumentando la degradación del GMPc (Monfort *et al.*, 2002). La inducción de la LTP en hipocampo mediante la aplicación de un tétano conduce a la activación de esta vía, lo que conlleva un rápido aumento, seguido de una disminución de GMPc en cortes de hipocampo. El correcto funcionamiento de todos los pasos de este proceso es necesario para la adecuada inducción y mantenimiento de la LTP (Monfort *et al.*, 2002).

La LTP en hipocampo está alterada en ratas con hiperamonemia crónica (Monfort *et al.*, 2004a) o con encefalopatía hepática debida a anástomosis porta-cava (PCS) (Monfort *et al.*, 2007) conduciendo a una marcada disminución de la potenciación de las respuestas post-sinápticas inducidas por el tétano. Este deterioro en la LTP es debido a una alteración en los cambios inducidos por el tétano en los niveles de GMPc. En hiperamonemia, el tétano no induce la activación de la PKG ni de la fosfodiesterasa que degrada el GMPc ni la consecuente disminución de GMPc, como ocurre en cortes de hipocampo de ratas control (Monfort *et al.*, 2004b).

Además, el deterioro en la LTP inducido por la hiperamonemia se puede revertir si se aumentan los niveles de GMPc mediante la administración de 8 Br-cGMP, un análogo permeable de GMPc (Monfort *et al.*, 2004b). El aumento de los niveles de GMPc con 8 Br-cGMP en hiperamonemia restaura la activación de la PKG y de la fosfodiesterasa y el mantenimiento

## DISCUSIÓN

---

de la LTP. Esto indica que en hiperamonemia la adición de GMPc exógeno permite restaurar la LTP (Monfort *et al.*, 2004b).

La recuperación de la capacidad de aprendizaje espacial en el MWM inducida por el GMPc extracelular en ratas hiperamonémicas en esta tesis podría ser consecuencia de la normalización de la función de la vía glutamato-NO-GMPc-PKG-PDE5 en hipocampo y, por consiguiente, de la LTP.

El aumento de factores inflamatorios también puede contribuir al deterioro en el aprendizaje y la memoria espacial en el test del MWM. Derecki *et al.* (2010), comprobaron que la realización del test MWM, conduce a una acumulación de IL-4 (anti-inflamatoria), producida por linfocitos T, en los espacios meníngeos. La depleción de linfocitos T en estos espacios aumenta la liberación de TNF- $\alpha$  (pro-inflamatorio) por las células mieloides de las meninges y deteriora el aprendizaje y la memoria en el MWM. En ratones knock-out que carecen de IL-4 (IL-4<sup>-/-</sup>) las células mieloides de las meninges también producen una mayor cantidad de TNF- $\alpha$  y los ratones presentan un deterioro cognitivo en el test de MWM muy similar al observado en ratones con depleción de células T. Además, la inyección intraperitoneal de células T provenientes de ratones control en ratones knock-out (IL-4<sup>-/-</sup>) consiguió disminuir la producción de TNF- $\alpha$  por las células mieloides y restaurar el aprendizaje en el MWM (Derecki *et al.*, 2010). Los niveles de TNF- $\alpha$  en cerebro están aumentados en diferentes enfermedades cognitivas asociadas a déficits en el aprendizaje y la memoria (Butler *et al.*, 2004). Estos datos indican que el aumento de TNF- $\alpha$  conduce

a una disminución de la capacidad de aprendizaje espacial en el MWM. Esta disminución podría estar mediada por un deterioro de la LTP en hipocampo.

El TNF- $\alpha$  modula la plasticidad sináptica (Albensi y Mattson, 2000). En cortes de hipocampo de rata, el TNF- $\alpha$  inhibe la LTP (Tancredi *et al.*, 1992; Butler *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Cumiskey *et al.*, 2007).

En las ratas hiperamonémicas encontramos un marcado aumento de TNF- $\alpha$  en hipocampo que podría contribuir al deterioro de la LTP y del aprendizaje en el MWM. La reducción de los niveles de TNF- $\alpha$  en hipocampo por el tratamiento con GMPc extracelular podría contribuir a la recuperación de la capacidad de aprendizaje espacial en el MWM en ratas hiperamonémicas.

### **1.3.2. Efecto del tratamiento crónico con GMPc extracelular sobre el aprendizaje y la memoria en el test del laberinto radial**

Hemos evaluado también el aprendizaje y la memoria espacial utilizando el laberinto radial. Las ratas hiperamonémicas tienen disminuido el aprendizaje, la memoria de referencia espacial y la memoria de trabajo. El GMPc restaura la capacidad de aprendizaje y la memoria de referencia espacial pero no la memoria de trabajo.

La vía glutamato-NO-GMPc asociada al receptor NMDA modula el aprendizaje y memoria en el laberinto radial. Ratones modificados genéticamente que no expresan la subunidad GluN1 del receptor NMDA en

## DISCUSIÓN

---

células granulares del giro dentado en hipocampo tienen disminuida la memoria de trabajo espacial en el laberinto radial (Bannerman *et al.*, 2014).

Por otra parte, la inhibición de la óxido nítrico sintasa (NOS) inhibe la LTP en cortes de hipocampo y reduce el aprendizaje espacial en el laberinto radial (Bohme *et al.*, 1993). La inhibición de la NOS produce efectos amnésicos en el laberinto radial. Los errores de memoria de trabajo y de referencia son más elevados en ratas a las que se les administra un inhibidor de la NOS (Holscher *et al.*, 1996). Estos datos muestran que la actividad de la NOS tiene un papel importante en el aprendizaje y la memoria en el laberinto radial en ratas.

Las ratas con hiperamonemia crónica tienen disminuída la actividad de la NOS. La perfusión de GMPc restaura la actividad enzimática de la NOS en cortes de cerebelo. La recuperación del aprendizaje y la memoria de referencia espacial por GMPc extracelular en ratas hiperamonémicas podría ser consecuencia de la recuperación de la actividad NOS.

La no recuperación por GMPc de la memoria de trabajo podría ser debido a que los mecanismos implicados son diferentes. Algunos estudios apoyan esta idea, demostrando efectos distintos de un mismo tratamiento sobre las memorias de trabajo y de referencia. La administración a ratas de un antagonista del receptor de dopamina D1, disminuyó el número de errores de memoria de trabajo sin afectar a la memoria de referencia (Rusu *et al.*, 2013). En otro estudio con ratones, un agonista del receptor cannabinoide aumentó los errores de referencia espacial y de memoria de trabajo. La administración de un antagonista del receptor cannabinoide

revertía el deterioro de la memoria de referencia pero no la de trabajo (Avdesh *et al.*, 2013).

Los datos de esta tesis indican que el GMPc extracelular restaura en ratas hiperamonémicas los mecanismos que modulan el aprendizaje espacial y la memoria de referencia pero no los mecanismos que modulan la memoria de trabajo.

### **1.4. El tratamiento crónico con GMPc extracelular restaura la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo y la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y en ratas hiperamonémicas**

Las ratas hiperamonémicas tienen disminuída la capacidad de aprender una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y (Aguilar *et al.*, 2000).

Nuestro grupo ha descrito que la capacidad de aprendizaje de esta tarea depende fundamentalmente de la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo (Erceg *et al.*, 2005a). Hemos demostrado en distintos modelos animales que existe una excelente correlación entre la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo in vivo y la capacidad de aprendizaje de la tarea en el laberinto en Y. Cuando disminuye la formación de GMPc en respuesta a la activación del receptor NMDA, por ejemplo en ratas con hiperamonemia, encefalopatía hepática (PCS) o expuestas perinatalmente a bifenilos policlorados (PCBs) o metilmercurio, disminuye la capacidad de aprender

## DISCUSIÓN

---

este test (Erceg *et al.*, 2005b; Piedrafita *et al.*, 2008; Boix *et al.*, 2010). Cuando aumenta la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo, por ejemplo en ratas perinatalmente expuestas a PBDE99 también aumenta la capacidad para aprender esta tarea (Llansola *et al.*, 2009).

Por otra parte, los tratamientos que restauran la función de la vía Glu-NO-GMPc y los niveles de GMPc en cerebelo de ratas con hiperamonemia o encefalopatía hepática (PCS) como la administración de inhibidores de la fosfodiesterasa que degrada el GMPc (zaprinast o sildenafil) también restauran la capacidad de aprender la tarea en el laberinto en Y (Erceg *et al.*, 2005b).

La función de la vía y la capacidad de aprendizaje también se recuperan por tratamientos que reducen la neuroinflamación, como la administración de ibuprofeno (Cauli *et al.*, 2007c) o inhibidores de la MAP quinasa p38 (Agusti *et al.*, 2011) en ratas con encefalopatía hepática debida a anástomosis portacava (PCS), así como por la administración de sulfato de pregnenolona en ratas hiperamonémicas (Gonzalez-Usano *et al.*, 2014).

La administración crónica de GMPc extracelular a ratas hiperamonémicas restaura la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y (Erceg *et al.*, 2005a). Por ello, uno de los objetivos principales de esta tesis ha sido analizar si la recuperación por la administración crónica de GMPc extracelular de la capacidad de aprendizaje de la tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y es debida a que el GMPc extracelular está restaurando la función de la vía Glu-NO-GMPc y estudiar los mecanismos por los que la restaura.

Comprobamos por experimentos de microdiálisis que la administración crónica intracerebral de GMPc mediante minibombas osmóticas, restaura los niveles basales de GMPc y la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo de ratas hiperamonémicas. En base a los estudios descritos anteriormente, consideramos que esta normalización de los niveles de GMPc es la que permite recuperar la capacidad de aprendizaje de la tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y en las ratas hiperamonémicas. Por esta razón estudiamos los mecanismos por los que el GMPc extracelular modula la función de la vía glutamato-NO-GMPc y restaura su función en cerebelo de ratas hiperamonémicas.

### **2. Modulación de la vía glutamato-NO-GMPc por GMPc extracelular**

#### **2.1. Efecto de la administración de diferentes concentraciones de GMPc extracelular a través de la sonda de microdiálisis sobre la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo analizada por microdiálisis in vivo**

Los resultados obtenidos muestran que existe un rango de concentración óptima de GMPc extracelular (0.3-0.45 nM) para el que la función de la vía glutamato-NO-GMPc es máxima. Si no se alcanza o se excede ese rango de concentración, la función de la vía glutamato-NO-GMPc es menor.

En hiperamonemia los niveles basales de GMPc extracelular ( $0.26 \pm 0.02$  nM) son menores al rango de concentración óptima, por eso la función de la vía está disminuida. La administración de GMPc 0.1 nM a través de la

## DISCUSIÓN

---

sonda de microdiálisis restaura la función de la vía glutamato-NO-GMPc en ratas hiperamonémicas porque aumenta el GMPc hasta normalizar sus niveles y compensa el déficit en la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico en las ratas. En cambio, en las control la adición de GMPc 0.1nM disminuye la función de la vía porque se sobrepasa el umbral óptimo de GMPc.

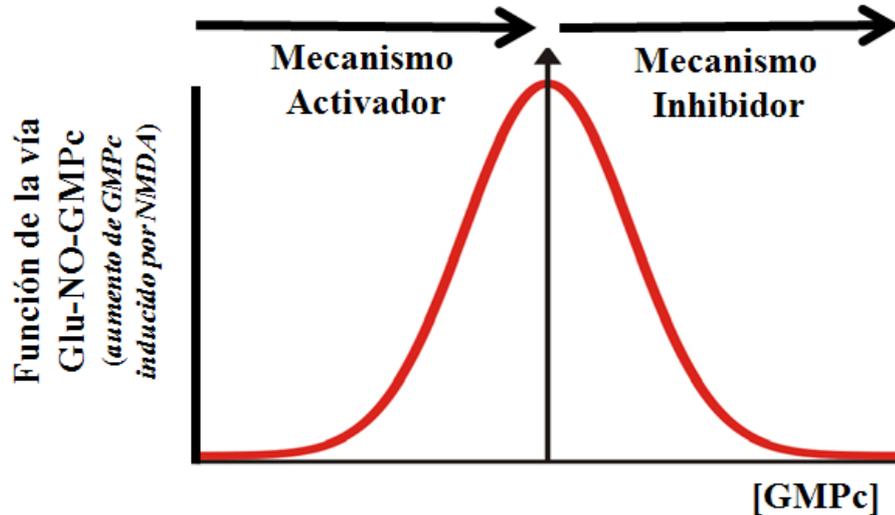
La administración de GMPc 0.5 ó 2 nM resulta excesiva para ambos grupos, control e hiperamonémicas, sobrepasando el umbral óptimo de GMPc y disminuyendo la función de la vía.

Por tanto, en ratas hiperamonémicas, la adición de GMPc extracelular en cerebelo modula la función de la vía glutamato-NO-GMPc de forma bifásica. La adición de concentraciones bajas, que aumentan el GMPc extracelular hasta niveles óptimos ( $\approx 0.45$  nM), aumentan la función de la vía. La adición de concentraciones de GMPc más altas conducen a un exceso de GMPc, que inhibe la función de la vía.

En ratas control, los niveles basales de GMPc están muy próximos al óptimo, por lo que la adición de concentraciones bajas de GMPc ya puede reducir la función de la vía.

Los datos obtenidos en esta tesis sugieren que el grado de activación de la vía glutamato-NO-GMPc por NMDA está modulado por la concentración de GMPc extracelular presente cuando se administra el NMDA. Deben existir dos mecanismos que regulan la concentración de GMPc extracelular: (1) Cuando los niveles de GMPc extracelular están por debajo del rango de concentración óptima el GMPc induciría un mecanismo que aumentaría la

activación y (2) cuando los niveles de GMPc extracelular exceden la concentración óptima se induciría un mecanismo inhibitor de la función de la vía (Figura 47).



**Figura 47.** Modulación bifásica de la función de la vía glutamato-NO-GMPc por el GMPc extracelular en función de su concentración.

Estos datos también demuestran que el GMPc extracelular, a concentraciones fisiológicas modula la función de la vía glutamato-NO-GMPc y por tanto, las funciones cerebrales moduladas por esta vía, como algunos tipos de memoria y aprendizaje, incluyendo la tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y.

El conocimiento de los mecanismos por los que el GMPc extracelular modula la función de la vía glutamato-NO-GMPc podría proporcionar nuevas dianas terapéuticas para mejorar la función cognitiva en pacientes

## DISCUSIÓN

---

con encefalopatía hepática. Dado que el modelo in vivo no permite estudiar estos mecanismos en detalle, recurrimos al modelo experimental ex vivo de cortes frescos de cerebelo para analizarlos.

### **2.2. Efecto del GMPC extracelular en cortes frescos de cerebelo sobre la óxido nítrico sintasa y la función de la vía glutamato-NO-GMPC**

Uno de los pasos de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPC alterados en cerebelo de ratas con hiperamonemia crónica es la activación de la óxido nítrico sintasa neuronal, que está disminuida tanto in vivo como en cortes de cerebelo ex vivo.

In vivo, la administración de NMDA a través de la sonda de microdiálisis aumenta significativamente los nitritos extracelulares en ratas control pero no en las ratas con hiperamonemia crónica indicando que ésta inhibe la activación de la nNOS en cerebelo in vivo en respuesta a la activación del receptor NMDA (El-Mlili *et al.*, 2008).

En el modelo ex vivo de cortes de cerebelo, la hiperamonemia reduce la actividad de la nNOS en condiciones basales y su activación tras la activación del receptor NMDA. Estos dos efectos de la hiperamonemia se producen por mecanismos moleculares diferentes. Los principales mecanismos que modulan la actividad de la nNOS son los cambios en su fosforilación y en su localización subcelular. La hiperamonemia crónica altera ambos mecanismos. La menor activación de la nNOS en respuesta a la activación del receptor NMDA en hiperamonemia es debida a la

alteración en la localización subcelular de la nNOS, está reducida en membranas post-sinápticas y aumentada en el citosol como se ha visto en cortes de cerebelo (El-Mlili *et al.*, 2008).

A la menor actividad basal de la nNOS en hiperamonemia contribuye la alteración de sus niveles de fosforilación en diferentes residuos. La actividad de la nNOS se regula por fosforilación por diferentes proteínas quinasas, como PKA (Brune y Lapetina, 1991), PKC (Okada, 1995), PKG (Dinerman *et al.*, 1994) y por diferentes quinasas dependientes de calcio y calmodulina (CaMKI, CaMKII) (Hayashi *et al.*, 1999). La fosforilación de la nNOS induce un aumento o una disminución en la actividad de nNOS dependiendo del residuo fosforilado. La fosforilación de la nNOS en la Ser 847 (Hayashi *et al.*, 1999; Komeima *et al.*, 2000) ó en la Ser 741 disminuye su actividad mientras que la fosforilación en la Ser 1416 la aumenta (Rameau *et al.*, 2007).

La hiperamonemia aumenta la fosforilación de la nNOS en la Ser 847 y este aumento es responsable de la disminución de la actividad basal de la nNOS en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas.

La CaMKII se activa tras su autofosforilación en la Thr 286 y fosforila la nNOS en la Ser 847 disminuyendo su actividad (Hayashi *et al.*, 1999; Komeima *et al.*, 2000). Esta fosforilación se puede inhibir por la administración de inhibidores específicos de la CaMKII (Osuka *et al.*, 2002). La hiperamonemia disminuye ligeramente el contenido de la CaMKII pero aumenta su grado de fosforilación en la Thr 286 de forma relevante (El-Mlili *et al.*, 2008). Por tanto, la hiperamonemia aumenta la actividad

## DISCUSIÓN

---

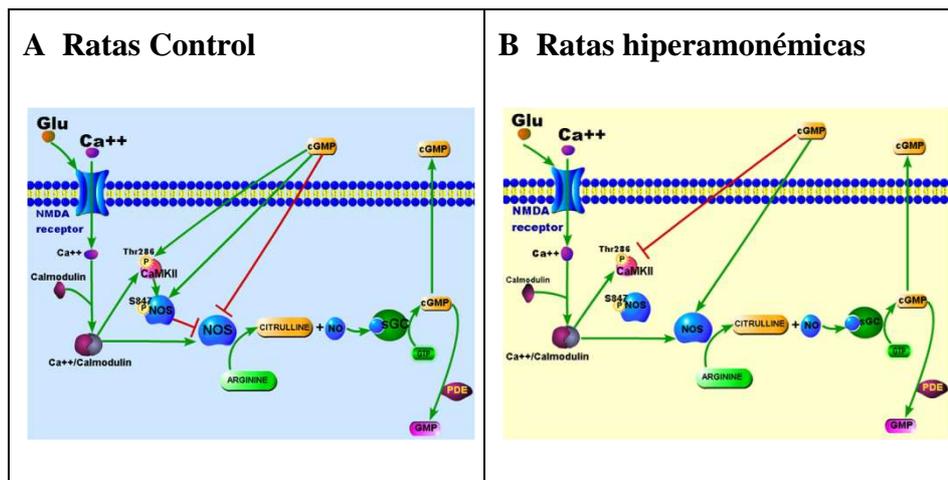
basal de la CaMKII. El aumento de la fosforilación de la nNOS en la Ser 847 es debido a este aumento en la actividad de la CaMKII como demuestra el hecho de que la inhibición de la CaMKII con KN-62 normaliza la fosforilación de la nNOS en la Ser 847 y su actividad basal, que vuelven a valores similares a los de las ratas control (El-Mlili *et al.*, 2008).

La Thr 286 se encuentra en el dominio autoinhibitorio de la CaMKII y su fosforilación libera esta inhibición (Colbran, 1992). La fosforilación de CaMKII en la Thr 286 aumenta su afinidad por la calmodulina, y su actividad (Tzortzopoulos *et al.*, 2004). La autofosforilación de la CaMKII en la Thr 286 está modulada por las concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Colbran, 1992) y por defosforilación por diferentes proteín-fosfatasas. El aumento de fosforilación de CaMKII en la Thr 286 en las ratas hiperamonémicas podría ser debido a una alteración en la homeostasis del  $Ca^{2+}$  o a una alteración en la actividad de las proteín fosfatasas PP1 y /o PP2A.

El aumento tónico en la actividad de CaMKII tras su autofosforilación en la Thr 286 es debido a un aumento en la activación tónica del receptor NMDA. El bloqueo del receptor NMDA con MK801 reduce la fosforilación de CaMKII en la Thr 286 en cortes de ratas hiperamonémicas al mismo grado de fosforilación que en las ratas control, y por tanto disminuye su actividad (El-Mlili *et al.*, 2008). Como consecuencia de esta disminución, la fosforilación de nNOS en la Ser 847 también disminuye al mismo grado de fosforilación que en cortes de ratas control. Esto indica que en ratas hiperamonémicas hay una activación tónica del receptor NMDA que no existe en ratas control. Por esta razón la adición de MK801 no induce

ningún efecto en cortes de ratas control. El aumento de la activación tónica del receptor NMDA en hiperamonemia conduce a una activación tónica de la CaMKII, que a su vez aumenta la fosforilación de la nNOS en la Ser 847 y reduce su actividad (El-Mlili *et al.*, 2008). En consecuencia se forma menos NO y se activa menos la guanilato ciclasa, conduciendo a una disminución de GMPc.

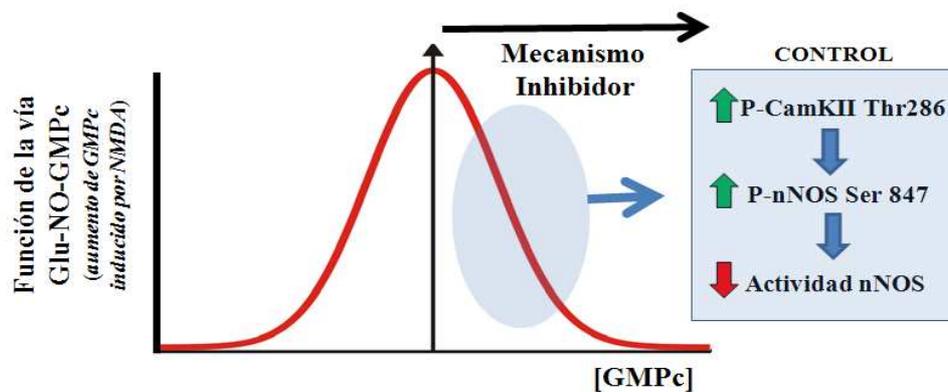
En esta tesis, para estudiar el mecanismo por el que el GMPc extracelular modula la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cortes frescos de cerebelo analizamos los efectos de la adición de GMPc a los cortes sobre la actividad de la NOS, los niveles de fosforilación de la nNOS en la Ser847 y los niveles de fosforilación en la CaMKII en la Thr 286. Los resultados se resumen en la Figura 48A para ratas control y en la Figura 48B para las hiperamonémicas.



**Figura 48.** Efecto del GMPc extracelular sobre la vía glutamato-NO-GMPc en cortes de cerebelo de ratas control (A) e hiperamonémicas (B).

## DISCUSIÓN

En ratas control, la adición de GMPc extracelular (10 nM) disminuye la actividad de la NOS. Esta disminución de la actividad se puede explicar porque el GMPc extracelular aumenta la fosforilación de la CaMKII en la Thr 286 y su actividad, la cual a su vez aumenta la fosforilación de la nNOS en la Ser 847 que sería responsable de la disminución de la actividad de la NOS. Como se ha dicho anteriormente, este efecto inhibitorio del GMPc extracelular en las ratas control puede ser debido a que al añadir GMPc (10 nM) los niveles de GMPc extracelular alcanzan un nivel que sobrepasa el rango de concentración óptimo, activando el segundo mecanismo, que reduciría la activación de la NOS y la función de la vía (Figura 49).



**Figura 49.** La adición de GMPc extracelular 10 nM induce el mecanismo inhibitorio de la NOS en cortes de cerebelo de ratas control. Los niveles de GMPc extracelular sobrepasan el rango de concentración óptima de GMPc. Esto induce un aumento de la fosforilación de la CaMKII en la Thr286 y un aumento de la fosforilación de la nNOS en la Ser 847, reduciendo la actividad de la nNOS y la función de la vía.

En ratas con hiperamonemia crónica, la adición de GMPc extracelular (10 nM) aumenta la actividad de la NOS. La fosforilación (actividad) de la CaMKII disminuye cuando añadimos GMPc extracelular. Sin embargo, no observamos una disminución en la fosforilación de la nNOS en la Ser847. El GMPc extracelular podría estar modulando la fosforilación de la CaMKII por activación de fosfatasa que la defosforilan, inhibiéndola, o modulando la homeóstasis del  $Ca^{2+}$ .

Los datos obtenidos indican que la recuperación de la actividad de la NOS en cortes de ratas hiperamonémicas no es debido a una disminución de su fosforilación en la Ser 847. Por tanto, debe estar mediada por otro mecanismo. Una posibilidad es que el GMPc extracelular aumente la unión de calcio-calmodulina a la NOS, aumentando su actividad.

El principal mecanismo de modulación de la actividad de la nNOS es por fosforilación en diferentes residuos, no sólo en la Ser847, por diferentes proteínas quinasas. La nNOS puede ser fosforilada por la proteína quinasa A (Brune y Lapetina, 1991), proteína quinasa G (Dinerman *et al.*, 1994), Akt (Rameau *et al.*, 2007) y como se ha mencionado anteriormente por proteínas quinasas dependientes del complejo calcio/calmodulina (Nakane *et al.*, 1991; Bredt *et al.*, 1992; Dinerman *et al.*, 1994).

Es posible que el GMPc extracelular altere la fosforilación de la NOS en otro residuo distinto de la Ser 847 por alguna de las proteínas quinasas mencionadas y esto restaure su actividad.

La actividad de la NOS también depende de su localización subcelular. La nNOS contiene un dominio de unión PDZ que une la proteína PSD95 y

## DISCUSIÓN

---

enlaza la nNOS a la densidad post-sináptica (PSD). La PSD95 también se une al receptor NMDA permitiendo la formación de un complejo ternario formado por receptor NMDA-PSD95-nNOS el cual permite la activación de la nNOS cuando entra  $\text{Ca}^{2+}$  a través del receptor NMDA (Brenman *et al.*, 1996; Christopherson *et al.*, 1999). La nNOS localizada en la PSD está expuesta a mayores concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y es más activa que la nNOS en otras localizaciones subcelulares. La hiperamonemia reduce la cantidad de NOS en las membranas sinápticas y por tanto su actividad (El-Mlili *et al.*, 2008). Es posible que la adición de GMPc aumente el contenido de nNOS en la membrana sináptica y esto contribuya a restaurar su actividad.

El efecto activador de la vía por adición de GMPc extracelular (10 nM) en las ratas hiperamonémicas indica que al añadir GMPc extracelular se alcanza el rango de concentración óptima, y se activa el primer mecanismo, que aumentaría la activación de la NOS y la función de la vía.

El hecho de que el GMPc 10 nM module la fosforilación de la NOS en la Ser847 y su activación de forma diferente en ratas control (en las que se activaría el mecanismo inhibitor) e hiperamonémicas (en las que se activaría el mecanismo activador) indica que los mecanismos activador e inhibitor utilizan vías de transducción diferentes para modular la actividad de la NOS y la función de la vía glutamato-NO-GMPc.

### 3. Aislamiento de proteínas de membrana de cerebelo que unen GMPc extracelular

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que el GMPc extracelular modula la fosforilación y la actividad de la CaMKII y de la nNOS intracelulares y modula de este modo la función de la vía glutamato-NO-GMPc. Para llevar a cabo esos efectos debería unirse a alguna molécula de la membrana celular que transmitiría la señal al interior de la célula. Por ello, el siguiente paso fue identificar proteínas de membrana a las que se une el GMPc en cerebelo. Se comprobó que se une a la subunidad reguladora I de la proteín-quinasa dependiente de AMPc.

Generalmente, la proteín-quinasa A (PKA) es activada por el AMPc (Francis y Corbin, 1994). El GMPc también se une y activa a la PKA, aunque normalmente la afinidad del GMPc es mucho menor (50 veces) que la del AMPc, y se necesitan concentraciones mucho más altas ( $\mu\text{M}$ ) de GMPc para activarla (Reed *et al.*, 1996).

Por otra parte, existen formas "atípicas" de la PKA que se activan preferentemente por GMPc a concentraciones bajas. Por ejemplo, se comprobó que la estimulación de los canales de cloro por la enterotoxina liberada por *Escherichia coli* está mediada por el GMPc, pero no ocurre por activación de la PKG sino a través de una PKA activada por GMPc (Forte *et al.*, 1992). En invertebrados, también existe una PKA atípica que, en presencia de baja concentración de AMPc aumenta su activación de forma sinérgica por GMPc a concentraciones fisiológicas (0.1-0.33  $\mu\text{M}$ ) (Leboulle y Muller, 2004). La alta sensibilidad de la PKA al GMPc en invertebrados

## DISCUSIÓN

---

indica que el GMPc activa directamente la PKAII en condiciones fisiológicas (Leboulle y Muller, 2004). En el parásito *Trypanosoma brucei*, causante de la enfermedad del sueño, se ha identificado y caracterizado una subunidad reguladora de la PKA, que une preferentemente GMPc antes que AMPc (GMPc tiene una  $K_d = 7.51 \pm 1.97 \mu\text{M}$  para el dominio A y  $K_d = 11.43 \pm 2.24 \mu\text{M}$  para el dominio B de la subunidad reguladora de la PKA. El AMPc compite con la unión del GMPc a esa PKA sólo si se añade a una concentración 100 veces mayor (Shalaby *et al.*, 2001).

Aunque no se han descrito estas PKAs atípicas en cerebro, podría existir una ecto ó exo PKA atípica que se activaría por bajas concentraciones de GMPc y que podría mediar los efectos del GMPc extracelular sobre la actividad NOS y la función de la vía glutamato-NO-GMPc.

### **3.1. Posible papel de una ecto ó exo PKA en la modulación de la vía glutamato-NO-GMPc por GMPc extracelular**

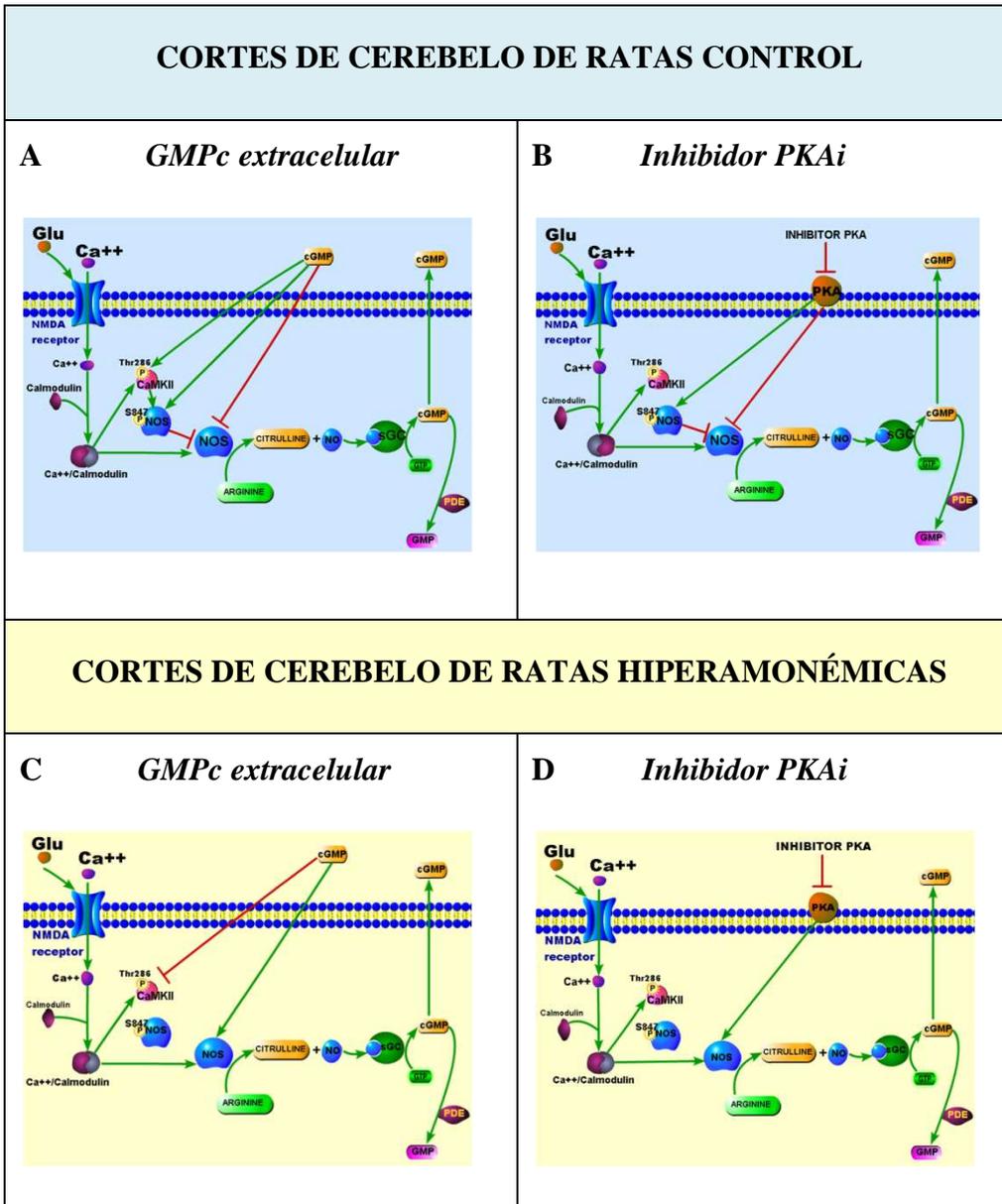
Las ecto-proteín quinasas se caracterizan por estar localizadas en la cara externa de la membrana plasmática y las exo proteín quinasas por estar solubles en el medio extracelular. Ambas fosforilan proteínas de la superficie externa de la membrana celular.

Estudiamos si los efectos del GMPc extracelular sobre la NOS en cortes de cerebelo podrían estar mediados por una ecto ó exo PKA. Para ello analizamos si se previenen con un inhibidor impermeable de la PKA. Al realizar los experimentos control, en cortes tratados sólo con el inhibidor

impermeable de PKA encontramos que modula la actividad NOS del mismo modo que el GMPc extracelular en cortes. En ratas control, tanto el inhibidor de PKA impermeable como el GMPc extracelular aumentan la fosforilación de la nNOS en la Ser847, inhibiendo su actividad.

En las ratas hiperamonémicas, el inhibidor de PKA impermeable también ejerce el mismo efecto que el GMPc extracelular, aumentan la actividad de la NOS, sin afectar su fosforilación en la Ser847 (Figura 50 C y D). Esto sugiere que los efectos del GMPc extracelular sobre la actividad de la NOS, tanto en ratas control como en hiperamonémicas, podrían estar mediados por la inhibición de una ecto ó exo PKA (Figura 50 A-D).

Sin embargo, tanto en ratas control como en hiperamonémicas el inhibidor de PKA no afecta los niveles de fosforilación de la CaMKII en la Thr286. En cambio, el GMPc extracelular aumenta su fosforilación en ratas control y la disminuye en hiperamonémicas. Esto sugiere que los efectos del GMPc extracelular sobre la modulación de la CaMKII no estarían mediados por la PKA (Figura 50 A-D). Parecen existir por tanto, diferentes mecanismos de modulación de la CaMKII y de la NOS por GMPc ó PKA extracelulares.



**Figura 50.** Efectos del GMPc extracelular (A, C) y del inhibidor impermeable de PKA (B, D) sobre la vía glutamato-NO-GMPc en cortes de cerebelo de ratas control e hiperamónémicas.

Se ha descrito la existencia de actividades ecto-proteín quinasas, incluidas ecto-PKAs, en cultivos de neuronas (Muramoto *et al.*, 1994; Volonte *et al.*, 1994; Hogan *et al.*, 1995), y se ha demostrado la fosforilación de una proteína de 45 kDa en la membrana neuronal por una ecto-proteín quinasa (Merlo *et al.*, 1997). Las ecto-PKs pueden modular la neurotransmisión y la plasticidad sináptica. La fosforilación de una proteína de membrana por ecto-proteín quinasa es necesaria para mantener la LTP en hipocampo (Chen *et al.*, 1996; Dubrovsky *et al.*, 2002). Además la LTP inducida por ATP en cortes de hipocampo podría estar modulada por fosforilación del receptor NMDA/canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en dominios extracelulares de la membrana sináptica por una ecto-proteín quinasa (Fujii, 2004). La fosforilación por proteín-quinasas extracelulares unidas a membrana o libres podría ser un mecanismo fisiológico de regulación de la actividad de diferentes neuropéptidos en el sistema nervioso central (Jahn *et al.*, 2001).

El hecho de que los efectos inducidos por el inhibidor de PKA sobre la NOS sean similares a los que produce el GMPc sugiere que éste está uniéndose a la PKA y modulando su actividad, pero no activándola, sino inhibiéndola. Por tanto, el GMPc extracelular debería disminuir la fosforilación de los sustratos de esta PKA.

El siguiente objetivo fue averiguar si el GMPc extracelular estaba modulando la fosforilación de alguna proteína de membrana extracelular. Cuando incubamos membranas de cerebelo con ATP radioactivo se fosforila una proteína con una masa molecular relativa de  $\approx 40$  KDa. Tanto el GMPc extracelular como el inhibidor impermeable de la PKA disminuyen la

## DISCUSIÓN

---

fosforilación de esta proteína. Esto sugiere de nuevo que el GMPc extracelular podría estar inhibiendo una ecto ó exo PKA y modulando la fosforilación de una proteína de membrana de  $M_r \approx 40$  KDa. Los cambios en la fosforilación de esta proteína podrían mediar los efectos del GMPc extracelular sobre la NOS.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que el GMPc extracelular modula la actividad de la NOS y la función de la vía glutamato-NO-GMPc, la cual a su vez modula algunos procesos de aprendizaje y memoria, como el laberinto en Y.

El GMPc extracelular parece modular la función de la vía glutamato-NO-GMPc por mecanismos diferentes en ratas control e hiperamonémicas. Existe un rango de concentración (0.3-0.45 nM) de GMPc extracelular para el que la función de la vía glutamato-NO-GMPc es óptima. Si no se alcanza o se sobrepasa este rango la función de la vía es menor.

En las ratas control, la administración de GMPc extracelular exógeno activaría un mecanismo de inhibición de la NOS y de la vía cuando los niveles de GMPc extracelular sobrepasan el rango de concentración óptima. Este mecanismo inhibitor disminuiría la función de la vía y la formación de GMPc y se reduciría la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y.

En las ratas hiperamonémicas, los niveles de GMPc extracelular y la función de la vía están disminuidos respecto a las ratas control. La administración de concentraciones adecuadas de GMPc extracelular

exógeno aumentaría sus niveles a concentraciones óptimas, restaurando la función de la vía glutamato-NO-GMPc y la capacidad de aprendizaje.



# **CONCLUSIONES**



### CONCLUSIONES

1. Las ratas con hiperamonemia crónica tienen disminuida la actividad motora vertical. El tratamiento crónico intracerebral con GMPc extracelular restaura la actividad en ratas hiperamonémicas. Esto podría ser consecuencia de la disminución de la neuroinflamación.
2. Las ratas con hiperamonemia crónica tienen aumentada la concentración extracelular de GABA en cerebelo y presentan incoordinación motora. El tratamiento crónico con GMPc extracelular normaliza los niveles de GABA extracelular y restaura la coordinación motora en ratas hiperamonémicas. Esto sería consecuencia de la normalización de los niveles de GABA.
3. Las ratas con hiperamonemia crónica presentan déficits en el aprendizaje espacial en los laberintos radial y acuático de Morris. El tratamiento crónico con GMPc extracelular recupera (i) la memoria de referencia y el índice de aprendizaje pero no la memoria de trabajo en el laberinto radial y (ii) la capacidad de aprendizaje espacial en el test del laberinto acuático de Morris. A esta recuperación podrían contribuir la normalización de los niveles de GMPc y la reducción de la neuroinflamación en hipocampo por el GMPc extracelular.
4. Existe un rango de concentración de GMPc extracelular (0.3-0.45 nM) para el que la función de la vía glutamato-NO-GMPc es óptima. Para concentraciones menores o mayores la función de la vía es menor.

## CONCLUSIONES

---

5. La adición de GMPc extracelular modula la función de la vía glutamato-NO-GMPc en cerebelo de forma bifásica. En ratas hiperamonémicas, la adición de concentraciones bajas de GMPc extracelular induce un mecanismo que activa la vía mientras que concentraciones altas la inhiben. La adición de GMPc extracelular induce los mecanismos de activación o de inhibición de la vía dependiendo de los niveles de GMPc extracelular alcanzados, la activan si están por debajo de la concentración óptima y la inhiben si están por encima.
6. La función de la vía glutamato-NO-GMPc está disminuída en ratas hiperamonémicas. Los tratamientos que recuperan los niveles óptimos de GMPc extracelular restauran la función de la vía en ratas hiperamonémicas.
7. En cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas la adición de GMPc extracelular (10 nM) recupera la función de la vía (i) disminuyendo la actividad de la CaMKII y (ii) aumentando la actividad de la NOS. En cortes de ratas control la adición de GMPc extracelular (10 nM) disminuye la función de la vía aumentando (i) la actividad de la CaMKII y (ii) la fosforilación de la NOS en la Ser847, disminuyendo así su actividad.
8. Los efectos del GMPc extracelular sobre la NOS podrían ser mediados por inhibición de una ecto ó exo proteín-quinasa A (PKA) en cerebelo.
9. El GMPc extracelular disminuye la fosforilación de una proteína de membrana de Mr  $\approx$ 40 KDa. Ésta podría ser la molécula que media los

## **CONCLUSIONES**

---

efectos del GMPc extracelular sobre la señalización intracelular en la vía glutamato-NO-GMPc.



**BIBLIOGRAFÍA**

- Aguilar MA, Minarro J, Felipo V.** 2000. Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats. *Exp Neurol* 161: 704-713
- Agusti A, Cauli O, Rodrigo R, Llansola M, Hernandez-Rabaza V, Felipo V.** 2011. p38 MAP kinase is a therapeutic target for hepatic encephalopathy in rats with portacaval shunts. *Gut* 60: 1572-1579
- Ahabrach H, Piedrafita B, Ayad A, El Mlili N, Errami M, Felipo V, Llansola M.** 2010. Chronic hyperammonemia alters the circadian rhythms of corticosteroid hormone levels and of motor activity in rats. *J Neurosci Res* 88: 1605-1614
- Ahmed F, Kemp BA, Howell NL, Siragy HM, Carey RM.** 2007. Extracellular renal guanosine cyclic 3'5'-monophosphate modulates nitric oxide and pressure-induced natriuresis. *Hypertension* 50: 958-963
- Albensi BC, Mattson MP.** 2000. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse* 35: 151-159
- Amlal H, Soleimani M.** 1997. K<sup>+</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> antiporter: a unique ammonium carrying transporter in the kidney inner medulla. *Biochim Biophys Acta* 1323: 319-333
- Amodio P, Montagnese S, Gatta A, Morgan MY.** 2004. Characteristics of minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 19: 253-267
- Aronson DC, Chamuleau RA, Frederiks WM, Gooszen HG, Heijmans HS, James J.** 1993. Reversibility of cholestatic changes following experimental common bile duct obstruction: fact or fantasy? *J Hepatol* 18: 85-95
- Arriada-Mendicoa N, Otero-Siliceo E, Corona-Vazquez T.** 1999. Current concepts regarding the cerebellum and cognition. *Rev Neurol* 29: 1075-1082
- Avdesh A, Hoe Y, Martins RN, Martin-Iverson MT.** 2013. Pharmacological effects of cannabinoids on the reference and working memory functions in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 225: 483-494
- Azorin I, Minana MD, Felipo V, Grisolia S.** 1989. A simple animal model of hyperammonemia. *Hepatology* 10: 311-314
- Bajaj JS, Saeian K, Schubert CM, Hafeezullah M, Franco J, Varma RR, Gibson DP, Hoffmann RG, Stravitz RT, Heuman DM, Sterling RK, Shiffman M, Topaz A, Boyett S, Bell D, Sanyal AJ.** 2009. Minimal hepatic encephalopathy is

## BIBLIOGRAFÍA

---

- associated with motor vehicle crashes: the reality beyond the driving test. *Hepatology* 50: 1175-1183
- Bannerman DM, Sprengel R, Sanderson DJ, McHugh SB, Rawlins JN, Monyer H, Seeburg PH.** 2014. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nat Rev Neurosci* 15: 181-192
- Barnes CA, Rao G, McNaughton BL.** 1996. Functional integrity of NMDA-dependent LTP induction mechanisms across the lifespan of F-344 rats. *Learn Mem* 3: 124-137
- Bengtsson F, Nobin A, Falck B, Gage FH, Jeppsson B.** 1986. Portacaval shunt in the rat: selective alterations in behavior and brain serotonin. *Pharmacol Biochem Behav* 24: 1611-1616
- Bernabeu R, Schmitz 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, Cammarota 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
- Bliss TV, Collingridge GL.** 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39
- Bohme GA, Bon C, Lemaire M, Reibaud M, Piot O, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC.** 1993. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9191-9194
- Boix J, Cauli O, Felipo V.** 2010. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 affects differentially learning or motor coordination in adult rats. Mechanisms involved. *Neuroscience* 167: 994-1003
- Boix J, Llansola M, Cabrera-Pastor A, Felipo V.** 2011. Metabotropic glutamate receptor 5 modulates the nitric oxide-cGMP pathway in cerebellum in vivo through activation of AMPA receptors. *Neurochem Int* 58: 599-604
- Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH.** 1992. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem* 267: 10976-10981
- Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS.** 1996. Interaction of nitric

oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84: 757-767

**Brune B, Lapetina EG.** 1991. Phosphorylation of nitric oxide synthase by protein kinase A. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 921-926

**Bures J, Fenton AA, Kaminsky Y, Zinyuk L.** 1997. Place cells and place navigation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 343-350

**Burkhard PR, Delavelle J, Du Pasquier R, Spahr L.** 2003. Chronic parkinsonism associated with cirrhosis: a distinct subset of acquired hepatocerebral degeneration. *Arch Neurol* 60: 521-528

**Butler MP, O'Connor JJ, Moynagh PN.** 2004. Dissection of tumor-necrosis factor-alpha inhibition of long-term potentiation (LTP) reveals a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism which maps to early-but not late-phase LTP. *Neuroscience* 124: 319-326

**Cabrera-Pastor A, Llansola M, Reznikov V, Boix J, Felipo V.** 2012. Differential effects of chronic hyperammonemia on modulation of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway by metabotropic glutamate receptor 5 and low and high affinity AMPA receptors in cerebellum in vivo. *Neurochem Int* 61: 63-71

**Canales JJ, Elayadi A, Errami M, Llansola M, Cauli O, Felipo V.** 2003. Chronic hyperammonemia alters motor and neurochemical responses to activation of group I metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens in rats in vivo. *Neurobiol Dis* 14: 380-390

**Cauli O, Llansola M, Erceg S, Felipo V.** 2006. Hypolocomotion in rats with chronic liver failure is due to increased glutamate and activation of metabotropic glutamate receptors in substantia nigra. *J Hepatol* 45: 654-661

**Cauli O, Mansouri MT, Agusti A, Felipo V.** 2009a. Hyperammonemia increases GABAergic tone in the cerebellum but decreases it in the rat cortex. *Gastroenterology* 136: 1359-1367, e1351-1352

**Cauli O, Mlili N, Llansola M, Felipo V.** 2007a. Motor activity is modulated via different neuronal circuits in rats with chronic liver failure than in normal rats. *Eur J Neurosci* 25: 2112-2122

**Cauli O, Mlili N, Rodrigo R, Felipo V.** 2007b. Hyperammonemia alters the mechanisms by which metabotropic glutamate receptors in nucleus accumbens modulate motor function. *J Neurochem* 103: 38-46

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Cauli O, Rodrigo R, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Piedrafita B, El Mili N, Boix J, Agusti A, Felipo V.** 2009b. Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 24: 69-80
- Cauli O, Rodrigo R, Piedrafita B, Boix J, Felipo V.** 2007c. Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology* 46: 514-519
- Cauli O, Rodrigo R, Piedrafita B, Llansola M, Mansouri MT, Felipo V.** 2009c. Neuroinflammation contributes to hypokinesia in rats with hepatic encephalopathy: ibuprofen restores its motor activity. *J Neurosci Res* 87: 1369-1374
- Cestari V, Castellano C.** 1997. MK-801 potentiates morphine-induced impairment of memory consolidation in mice: involvement of dopaminergic mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)* 133: 1-6
- Chan CY, Huang SW, Wang TF, Lu RH, Lee FY, Chang FY, Chu CJ, Chen YC, Chan CC, Huang HC, Lee SD.** 2004. Lack of detrimental effects of nitric oxide inhibition in bile duct-ligated rats with hepatic encephalopathy. *Eur J Clin Invest* 34: 122-128
- Chapman PF, Atkins CM, Allen MT, Haley JE, Steinmetz JE.** 1992. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. *Neuroreport* 3: 567-570
- Chen G, Dunbar RL, Gao W, Ebner TJ.** 2001. Role of calcium, glutamate neurotransmission, and nitric oxide in spreading acidification and depression in the cerebellar cortex. *J Neurosci* 21: 9877-9887
- Chen W, Wieraszko A, Hogan MV, Yang HA, Kornecki E, Ehrlich YH.** 1996. Surface protein phosphorylation by ecto-protein kinase is required for the maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8688-8693
- Chiu CS, Brickley S, Jensen K, Southwell A, McKinney S, Cull-Candy S, Mody I, Lester HA.** 2005. GABA transporter deficiency causes tremor, ataxia, nervousness, and increased GABA-induced tonic conductance in cerebellum. *J Neurosci* 25: 3234-3245
- Christensen AL.** 1984. Neuropsychological investigation with Luria's methods. *Scand J Work Environ Health* 10 Suppl 1: 33-34
- Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Brecht DS.** 1999. PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 274: 27467-27473

- Clemmesen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P.** 1999. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 29: 648-653
- Colbran RJ.** 1992. Regulation and role of brain calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Neurochem Int* 21: 469-497
- Company L, Zapater P, Perez-Mateo M, Jover R.** 2010. Extrapyramidal signs predict the development of overt hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 22: 519-525
- Cooke SF, Bliss TV.** 2006. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 129: 1659-1673
- Cordoba J, Cabrera J, Lataif L, Penev P, Zee P, Blei AT.** 1998. High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis. *Hepatology* 27: 339-345
- Crittenden JR, Graybiel AM.** 2011. Basal Ganglia disorders associated with imbalances in the striatal striosome and matrix compartments. *Front Neuroanat* 5: 59
- Cumiskey D, Butler MP, Moynagh PN, O'Connor J J.** 2007. Evidence for a role for the group I metabotropic glutamate receptor in the inhibitory effect of tumor necrosis factor-alpha on long-term potentiation. *Brain Res* 1136: 13-19
- D'Hooge R, De Deyn PP.** 2001. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 36: 60-90
- Davis S, Butcher SP, Morris RG.** 1992. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J Neurosci* 12: 21-34
- De Flora A, Guida L, Franco L, Zocchi E, Pestarino M, Usai C, Marchetti C, Fedele E, Fontana G, Raiteri M.** 1996. Ectocellular in vitro and in vivo metabolism of cADP-ribose in cerebellum. *Biochem J* 320 ( Pt 2): 665-671
- de Juana DM, Oti JE, Canales VF, Cagigal MP.** 2003. Design of superresolving continuous phase filters. *Opt Lett* 28: 607-609
- Denniston DJ, Thomas MG, Kane KK, Roybal CN, Canales L, Hallford DM, Remmenga MD, Hawkins DE.** 2003. Effect of neuropeptide Y on GnRH-induced LH release from bovine anterior pituitary cell cultures derived from heifers in a follicular, luteal or ovariectomized state. *Anim Reprod Sci* 78: 25-31

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Derecki NC, Cardani AN, Yang CH, Quinnies KM, Carihfield A, Lynch KR, Kipnis J.** 2010. Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *J Exp Med* 207: 1067-1080
- Desmond JE, Gabrieli JD, Wagner AD, Ginier BL, Glover GH.** 1997. Lobular patterns of cerebellar activation in verbal working-memory and finger-tapping tasks as revealed by functional MRI. *J Neurosci* 17: 9675-9685
- Dhiman RK, Chawla YK.** 2009. Minimal hepatic encephalopathy. *Indian J Gastroenterol* 28: 5-16
- Dinerman JL, Steiner JP, Dawson TM, Dawson V, Snyder SH.** 1994. Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity. *Neuropharmacology* 33: 1245-1251
- Dubrovsky B, Harris J, Gijbsers K, Tatarinov A.** 2002. Oxytocin induces long-term depression on the rat dentate gyrus: possible ATPase and ectoprotein kinase mediation. *Brain Res Bull* 58: 141-147
- El-Mlili N, Rodrigo R, Naghizadeh B, Cauli O, Felipo V.** 2008. Chronic hyperammonemia reduces the activity of neuronal nitric oxide synthase in cerebellum by altering its localization and increasing its phosphorylation by calcium-calmodulin kinase II. *J Neurochem* 106: 1440-1449
- Elizondo A, Araya J, Rodrigo R, Poniachik J, Csendes A, Maluenda F, Diaz JC, Signorini C, Sgherri C, Comporti M, Videla LA.** 2007. Polyunsaturated fatty acid pattern in liver and erythrocyte phospholipids from obese patients. *Obesity (Silver Spring)* 15: 24-31
- ElMlili N, Boix J, Ahabrach H, Rodrigo R, Errami M, Felipo V.** 2010. Chronic hyperammonemia induces tonic activation of NMDA receptors in cerebellum. *J Neurochem* 112: 1005-1014
- Erceg S, Monfort P, Cauli O, Montoliu C, Llansola M, Piedrafita B, Felipo V.** 2006. Role of extracellular cGMP and of hyperammonemia in the impairment of learning in rats with chronic hepatic failure. Therapeutic implications. *Neurochem Int* 48: 441-446
- Erceg S, Monfort P, Hernandez-Viadel M, Llansola M, Montoliu C, Felipo V.** 2005a. Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain Res* 1036: 115-121
- Erceg S, Monfort P, Hernandez-Viadel M, Rodrigo R, Montoliu C, Felipo V.** 2005b. Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology* 41: 299-306

- Fassio A, Bonanno G, Fontana G, Usai C, Marchi M, Raiteri M.** 1996. Role of external and internal calcium on heterocarriger-mediated transmitter release. *J Neurochem* 66: 1468-1474
- Fedele E, Ansaldo MA, Varnier G, Raiteri M.** 2000. Benzodiazepine-sensitive GABA(A) receptors limit the activity of the NMDA/NO/cyclic GMP pathway: a microdialysis study in the cerebellum of freely moving rats. *J Neurochem* 75: 782-787
- Fedele E, Raiteri M.** 1996. Desensitization of AMPA receptors and AMPA-NMDA receptor interaction: an in vivo cyclic GMP microdialysis study in rat cerebellum. *Br J Pharmacol* 117: 1133-1138
- y. 1999. In vivo studies of the cerebral glutamate receptor/NO/cGMP pathway. *Prog Neurobiol* 58: 89-120
- Fedele E, Varnier G, Ansaldo MA, Raiteri M.** 1998. Nicotine administration stimulates the in vivo N-methyl-D-aspartate receptor/nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat hippocampus through glutamate release. *Br J Pharmacol* 125: 1042-1048
- Fedele E, Varnier G, Raiteri M.** 1997. In vivo microdialysis study of GABA(A) and GABA(B) receptors modulating the glutamate receptor/NO/cyclic GMP pathway in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 36: 1405-1415
- Felipo V.** 2013. Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nat Rev Neurosci* 14: 851-858
- Felipo V, Butterworth RF.** 2002. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* 67: 259-279
- Felipo V, Minana MD, Grisolia S.** 1988a. Long-term ingestion of ammonium increases acetylglutamate and urea levels without affecting the amount of carbamoyl-phosphate synthase. *Eur J Biochem* 176: 567-571
- y. 1988b. Paradoxical protection of both protein-free and high protein diets against acute ammonium intoxication. *Biochem Biophys Res Commun* 156: 506-510
- Felipo V, Urios A, Montesinos E, Molina I, Garcia-Torres ML, Civera M, Olmo JA, Ortega J, Martinez-Valls J, Serra MA, Cassinello N, Wassel A, Jorda E, Montoliu C.** 2012. Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 27: 51-58
- Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT.** 2002. Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final

## BIBLIOGRAFÍA

---

- report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 35: 716-721
- Forte LR, Thorne PK, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, Francis SH, Corbin JD.** 1992. Stimulation of intestinal Cl<sup>-</sup> transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol* 263: C607-615
- Francis SH, Corbin JD.** 1994. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol* 56: 237-272
- Fujii S.** 2004. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: the role of extracellular ATP in hippocampal long-term potentiation. *J Pharmacol Sci* 94: 103-106
- Gallagher M, Nicolle MM.** 1993. Animal models of normal aging: relationship between cognitive decline and markers in hippocampal circuitry. *Behav Brain Res* 57: 155-162
- Garcia-Ayllon MS, Cauli O, Silveyra MX, Rodrigo R, Candela A, Compan A, Jover R, Perez-Mateo M, Martinez S, Felipo V, Saez-Valero J.** 2008. Brain cholinergic impairment in liver failure. *Brain* 131: 2946-2956
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R.** 1988. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336: 385-388
- Geinisman Y, Detoleado-Morrell L, Morrell F, Heller RE.** 1995. Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. *Prog Neurobiol* 45: 223-252
- Gerok W, Haussinger D.** 1984. Ammonium detoxication and pH regulation by the liver. *Med Welt* 35: 28-34
- Gibson GE, Zimmer A, Krook L, Richardson EP, Visek WJ.** 1974. Brain histology and behavior of mice injected with urease. *J Neuropathol Exp Neurol* 33: 201-211
- Gonzalez-Usano A, Cauli O, Agusti A, Felipo V.** 2014. Pregnenolone Sulfate Restores the Glutamate-Nitric-Oxide-cGMP Pathway and Extracellular GABA in Cerebellum and Learning and Motor Coordination in Hyperammonemic Rats. *ACS Chem Neurosci* 5: 100-105
- Gordon N.** 2007. The cerebellum and cognition. *Eur J Paediatr Neurol* 11: 232-234
- Grant SG, Silva AJ.** 1994. Targeting learning. *Trends Neurosci* 17: 71-75

- Grau E, Felipo V, Minana MD, Grisolia S.** 1992. Treatment of hyperammonemia with carbamylglutamate in rats. *Hepatology* 15: 446-448
- Grazioli L, Alberti D, Olivetti L, Rigamonti W, Codazzi F, Matricardi L, Fugazzola C, Chiesa A.** 2000. Congenital absence of portal vein with nodular regenerative hyperplasia of the liver. *Eur Radiol* 10: 820-825
- Greve JW, Gouma DJ, Soeters PB, Buurman WA.** 1990. Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: a study with germ-free rats. *Gastroenterology* 98: 478-485
- Grimm V, Gottesfeld Z, Wassermann I, Samuel D.** 1975. The level of GABA in the brain and locomotor behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 3: 573-578
- Groeneweg M, Quero JC, De Bruijn I, Hartmann IJ, Essink-bot ML, Hop WC, Schalm SW.** 1998. Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology* 28: 45-49
- Hanchar HJ, Dodson PD, Olsen RW, Otis TS, Wallner M.** 2005. Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABA(A) receptor activity. *Nat Neurosci* 8: 339-345
- Hayashi Y, Nishio M, Naito Y, Yokokura H, Nimura Y, Hidaka H, Watanabe Y.** 1999. Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases. *J Biol Chem* 274: 20597-20602
- Hermenegildo C, Montoliu C, Llansola M, Munoz MD, Gaztelu JM, Minana MD, Felipo V.** 1998. Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo. *Eur J Neurosci* 10: 3201-3209
- Hernandez-Viadel M, Montoliu C, Monfort P, Canales JJ, Erceg S, Rowan M, Ceccatelli S, Felipo V.** 2003. Chronic exposure to 2,5-hexanedione impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in rat brain in vivo. *Neurochem Int* 42: 525-533
- Hilsabeck RC, Perry W, Hassanein TI.** 2002. Neuropsychological impairment in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 35: 440-446
- Hogan MV, Pawlowska Z, Yang HA, Kornecki E, Ehrlich YH.** 1995. Surface phosphorylation by ecto-protein kinase C in brain neurons: a target for Alzheimer's beta-amyloid peptides. *J Neurochem* 65: 2022-2030

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Holscher C, McGlinchey L, Anwyl R, Rowan MJ.** 1996. 7-Nitro indazole, a selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor in vivo, impairs spatial learning in the rat. *Learn Mem* 2: 267-278
- Huang LT, Hsieh CS, Chou MH, Chuang JH, Liou CW, Tiao MM, Lai MC.** 2004. Obstructive jaundice in rats: cause of spatial memory deficits with recovery after biliary decompression. *World J Surg* 28: 283-287
- Huerta PT, Sun LD, Wilson MA, Tonegawa S.** 2000. Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 25: 473-480
- Ingram DK, Spangler EL, Kametani H, Meyer RC, London ED.** 1998a. Intracerebroventricular injection of N omega-nitro-L-arginine in rats impairs learning in a 14-unit T-maze. *Eur J Pharmacol* 341: 11-16
- Ingram DK, Spangler EL, Meyer RC, London ED.** 1998b. Learning in a 14-unit T-maze is impaired in rats following systemic treatment with N omega-nitro-L-arginine. *Eur J Pharmacol* 341: 1-9
- Jahn H, Kiefer F, Behl C, Wiedemann K.** 2001. Activation of guanylate cyclase by natriuretic peptides in mouse pituitary AtT20 cells is influenced by phosphorylation of ANP. *Neurochem Res* 26: 473-478
- Jin XH, McGrath HE, Gildea JJ, Siragy HM, Felder RA, Carey RM.** 2004. Renal interstitial guanosine cyclic 3', 5'-monophosphate mediates pressure-natriuresis via protein kinase G. *Hypertension* 43: 1133-1139
- Jin XH, Siragy HM, Carey RM.** 2001. Renal interstitial cGMP mediates natriuresis by direct tubule mechanism. *Hypertension* 38: 309-316
- Joebges EM, Heidemann M, Schimke N, Hecker H, Ennen JC, Weissenborn K.** 2003. Bradykinesia in minimal hepatic encephalopathy is due to disturbances in movement initiation. *J Hepatol* 38: 273-280
- Jones EA, Weissenborn K.** 1997. Neurology and the liver. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63: 279-293
- Jover R, Company L, Gutierrez A, Lorente M, Zapater P, Poveda MJ, Such J, Pascual S, Palazon JM, Carnicer F, Ferrandis F, Perez-Mateo M.** 2005. Clinical significance of extrapyramidal signs in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 42: 659-665
- Jover R, Company L, Gutierrez A, Zapater P, Perez-Serra J, Girona E, Aparicio JR, Perez-Mateo M.** 2003. Minimal hepatic encephalopathy and extrapyramidal signs in patients with cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 98: 1599-1604

- Jover R, Rodrigo R, Felipo V, Insausti R, Saez-Valero J, Garcia-Ayllon MS, Suarez I, Candela A, Compan A, Esteban A, Cauli O, Auso E, Rodriguez E, Gutierrez A, Girona E, Erceg S, Berbel P, Perez-Mateo M.** 2006. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 43: 1257-1266
- Kandel ER.** 2000. Principles of neural science, Ed 4. McGraw-Hill, New York, NY. u.a.
- Kaur S, Starr MS.** 1997. Differential effects of intrastriatal and intranigral injections of glutamate antagonists on motor behaviour in the reserpine-treated rat. *Neuroscience* 76: 345-354
- Kiedrowski L, Costa E, Wroblewski JT.** 1992. Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurochem* 58: 335-341
- Koehl M, Abrous DN.** 2011. A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33: 1101-1114
- Komeima K, Hayashi Y, Naito Y, Watanabe Y.** 2000. Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells. *J Biol Chem* 275: 28139-28143
- Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E, Minana MD, Marcaida G, Grisolia S, Felipo V.** 1994. Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase. *J Neurochem* 63: 2172-2178
- Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ.** 1984. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 65: 305-311
- Krieger S, Jauss M, Jansen O, Theilmann L, Geissler M, Krieger D.** 1996. Neuropsychiatric profile and hyperintense globus pallidus on T1-weighted magnetic resonance images in liver cirrhosis. *Gastroenterology* 111: 147-155
- Kroening KD, Zimmerman NP, Bass P, Oaks JA.** 2003. Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate: a tapeworm-secreted signal molecule communicating with the rat host's small intestine. *J Parasitol* 89: 1136-1141
- Krupa DJ, Thompson JK, Thompson RF.** 1993. Localization of a memory trace in the mammalian brain. *Science* 260: 989-991

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Krupa DJ, Thompson RF.** 1995. Inactivation of the superior cerebellar peduncle blocks expression but not acquisition of the rabbit's classically conditioned eye-blink response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5097-5101
- Leboulle G, Muller U.** 2004. Synergistic activation of insect cAMP-dependent protein kinase A (type II) by cyclicAMP and cyclicGMP. *FEBS Lett* 576: 216-220
- Lieb DC, Kemp BA, Howell NL, Gildea JJ, Carey RM.** 2009. Reinforcing feedback loop of renal cyclic guanosine 3' 5' -monophosphate and interstitial hydrostatic pressure in pressure-natriuresis. *Hypertension* 54: 1278-1283
- Llansola M, Erceg S, Felipo V.** 2005. Chronic exposure to ammonia alters the modulation of phosphorylation of microtubule-associated protein 2 by metabotropic glutamate receptors 1 and 5 in cerebellar neurons in culture. *Neuroscience* 133: 185-191
- Llansola M, Felipo V.** 2010. Metabotropic glutamate receptor 5, but not 1, modulates NMDA receptor-mediated activation of neuronal nitric oxide synthase. *Neurochem Int* 56: 535-545
- Llansola M, Hernandez-Viadel M, Erceg S, Montoliu C, Felipo V.** 2009. Increasing the function of the glutamate-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway increases the ability to learn a Y-maze task. *J Neurosci Res* 87: 2351-2355
- Lockwood AH.** 2000. "What's in a name?" Improving the care of cirrhotics. *J Hepatol* 32: 859-861
- Lockwood AH, Murphy BW, Donnelly KZ, Mahl TC, Perini S.** 1993. Positron-emission tomographic localization of abnormalities of brain metabolism in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 18: 1061-1068
- Marcaggi P, Coles JA.** 2001. Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Prog Neurobiol* 64: 157-183
- Marchi M, Raiteri M.** 1996. Nicotinic autoreceptors mediating enhancement of acetylcholine release become operative in conditions of "impaired" cholinergic presynaptic function. *J Neurochem* 67: 1974-1981
- Martin JR.** 1986. Discordant motor activity levels of portacaval-shunted rats in runway and swim tests. *Behav Neurosci* 100: 427-437
- Martin LA, Goldowitz D, Mittleman G.** 2003. The cerebellum and spatial ability: dissection of motor and cognitive components with a mouse model system. *Eur J Neurosci* 18: 2002-2010

- Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD.** 1977. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195: 1356-1358
- Matsui Y, Kamioka T.** 1978. The effects of elevating gamma-amino butyrate content in the substantia nigra on the behaviour of rats. *Eur J Pharmacol* 50: 243-251
- Maurice T, Hiramatsu M, Itoh J, Kameyama T, Hasegawa T, Nabeshima T.** 1994. Behavioral evidence for a modulating role of sigma ligands in memory processes. I. Attenuation of dizocilpine (MK-801)-induced amnesia. *Brain Res* 647: 44-56
- McHugh TJ, Blum KI, Tsien JZ, Tonegawa S, Wilson MA.** 1996. Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. *Cell* 87: 1339-1349
- McNaughton BL, Barnes CA, Gerrard JL, Gothard K, Jung MW, Knierim JJ, Kudrimoti H, Qin Y, Skaggs WE, Suster M, Weaver KL.** 1996. Deciphering the hippocampal polyglot: the hippocampus as a path integration system. *J Exp Biol* 199: 173-185
- Mechtcheriakov S, Graziadei IW, Rettenbacher M, Schuster I, Hinterhuber H, Vogel W, Marksteiner J.** 2005. Diagnostic value of fine motor deficits in patients with low-grade hepatic encephalopathy. *World J Gastroenterol* 11: 2777-2780
- Mendez M, Mendez-Lopez M, Lopez L, Aller MA, Arias J, Cimadevilla JM, Arias JL.** 2008. Spatial memory alterations in three models of hepatic encephalopathy. *Behav Brain Res* 188: 32-40
- Merlo D, Anelli R, Calissano P, Ciotti MT, Volonte C.** 1997. Characterization of an ecto-phosphorylated protein of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res* 47: 500-508
- Michalak A, Butterworth RF.** 1997. Ornithine transcarbamylase deficiency: pathogenesis of the cerebral disorder and new prospects for therapy. *Metab Brain Dis* 12: 171-182
- Millan MH, Wardley-Smith B, Halsey MJ, Meldrum BS.** 1989. Studies on the role of the NMDA receptor in the substantia nigra pars reticulata and entopeduncular nucleus in the development of the high pressure neurological syndrome in rats. *Exp Brain Res* 78: 174-178
- Minana MD, Felipo V, Grisolia S.** 1988a. Protective effect of long term ammonium ingestion against acute ammonium intoxication. *Biochem Biophys Res Commun* 153: 979-983

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Minana MD, Felipo V, Wallace R, Grisolia S.** 1988b. High ammonia levels in brain induce tubulin in cerebrum but not in cerebellum. *J Neurochem* 51: 1839-1842
- Minguez B, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Turnes J, Alonso J, Rovira A, Cordoba J.** 2006. Noncirrhotic portal vein thrombosis exhibits neuropsychological and MR changes consistent with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 43: 707-714
- Monfort P, Corbalan R, Martinez L, Lopez-Talavera J, Cordoba J, Felipo V.** 2001. Altered content and modulation of soluble guanylate cyclase in the cerebellum of rats with portacaval anastomosis. *Neuroscience* 104: 1119-1125
- Monfort P, Erceg S, Piedrafita B, Llansola M, Felipo V.** 2007. Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability. *Eur J Neurosci* 25: 2103-2111
- Monfort P, Munoz MD, Felipo V.** 2004a. Hyperammonemia impairs long-term potentiation in hippocampus by altering the modulation of cGMP-degrading phosphodiesterase by protein kinase G. *Neurobiol Dis* 15: 1-10
- y. 2005. Chronic hyperammonemia in vivo impairs long-term potentiation in hippocampus by altering activation of cyclic GMP-dependent-protein kinase and of phosphodiesterase 5. *J Neurochem* 94: 934-942
- Monfort P, Munoz MD, Kosenko E, Felipo V.** 2002. Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase, and cGMP-degrading phosphodiesterase. *J Neurosci* 22: 10116-10122
- Monfort P, Munoz MD, Kosenko E, Llansola M, Sanchez-Perez A, Cauli O, Felipo V.** 2004b. Sequential activation of soluble guanylate cyclase, protein kinase G and cGMP-degrading phosphodiesterase is necessary for proper induction of long-term potentiation in CA1 of hippocampus. Alterations in hyperammonemia. *Neurochem Int* 45: 895-901
- Montoliu C, Llansola M, Kosenko E, Corbalan R, Felipo V.** 1999. Role of cyclic GMP in glutamate neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *Neuropharmacology* 38: 1883-1891
- Montoliu C, Piedrafita B, Serra MA, del Olmo JA, Urios A, Rodrigo JM, Felipo V.** 2009. IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *J Clin Gastroenterol* 43: 272-279
- Morris RG.** 1989. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci* 9: 3040-3057

- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M.** 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319: 774-776
- Moser EI, Moser MB, Andersen P.** 1994. Potentiation of dentate synapses initiated by exploratory learning in rats: dissociation from brain temperature, motor activity, and arousal. *Learn Mem* 1: 55-73
- Moser H.** 1987. Electrophysiological evidence for ammonium as a substitute for potassium in activating the sodium pump in a crayfish sensory neuron. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 141-145
- Msall M, Batshaw ML, Suss R, Brusilow SW, Mellits ED.** 1984. Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. Outcome of urea-cycle enzymopathies. *N Engl J Med* 310: 1500-1505
- Munoz MD, Monfort P, Gaztelu JM, Felipo V.** 2000. Hyperammonemia impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the CA1 of rat hippocampus in vitro. *Neurochem Res* 25: 437-441
- Muramoto K, Taniguchi H, Kawahara M, Kobayashi K, Nonomura Y, Kuroda Y.** 1994. A substrate of ecto-protein kinase is microtubule-associated protein 1B in cortical cell cultures undergoing synaptogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 1467-1473
- Murray TK, Ridley RM.** 1997. The effect of dizocilpine (MK-801) on conditional discrimination learning in the rat. *Behav Pharmacol* 8: 383-388
- Myslivecek J.** 1997. Inhibitory learning and memory in newborn rats. *Prog Neurobiol* 53: 399-430
- Nakane M, Mitchell J, Forstermann U, Murad F.** 1991. Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 180: 1396-1402
- Nascimento NR, Kemp BA, Howell NL, Gildea JJ, Santos CF, Harris TE, Carey RM.** 2011. Role of SRC family kinase in extracellular renal cyclic guanosine 3',5'-monophosphate- and pressure-induced natriuresis. *Hypertension* 58: 107-113
- Norenberg MD.** 1987. The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol* 6: 13-33
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A.** 1979. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161: 303-310

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Nunes AK, Raposo C, Luna RL, Cruz-Hofling MA, Peixoto CA.** 2012. Sildenafil (Viagra(R)) down regulates cytokines and prevents demyelination in a cuprizone-induced MS mouse model. *Cytokine* 60: 540-551
- Odeh M, Sabo E, Srugo I, Oliven A.** 2004. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver Int* 24: 110-116
- y. 2005. Relationship between tumor necrosis factor-alpha and ammonia in patients with hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Ann Med* 37: 603-612
- Okada D.** 1995. Protein kinase C modulates calcium sensitivity of nitric oxide synthase in cerebellar slices. *J Neurochem* 64: 1298-1304
- Oliveri M, Torriero S, Koch G, Salerno S, Petrosini L, Caltagirone C.** 2007. The role of transcranial magnetic stimulation in the study of cerebellar cognitive function. *Cerebellum* 6: 95-101
- Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Nakazawa A, Fukunaga K, Miyamoto E, Takayasu M, Tokuda M, Yoshida J.** 2002. Phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at Ser847 by CaM-KII in the hippocampus of rat brain after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 1098-1106
- Packard MG, Teather LA.** 1997. Posttraining injections of MK-801 produce a time-dependent impairment of memory in two water maze tasks. *Neurobiol Learn Mem* 68: 42-50
- Parada-Turska J, Turski WA.** 1990. Excitatory amino acid antagonists and memory: effect of drugs acting at N-methyl-D-aspartate receptors in learning and memory tasks. *Neuropharmacology* 29: 1111-1116
- Paul F, Muller J, Christe W, Steinmuller T, Poewe W, Wissel J.** 2004. Postural hand tremor before and following liver transplantation and immunosuppression with cyclosporine or tacrolimus in patients without clinical signs of hepatic encephalopathy. *Clin Transplant* 18: 429-433
- Pepicelli O, Brescia A, Gherzi E, Raiteri M, Fedele E.** 2004. GABA(A), but not NMDA, receptors modulate in vivo NO-mediated cGMP synthesis in the rat cerebral cortex. *Neuropharmacology* 46: 480-489
- Piedrafita B, Cauli O, Montoliu C, Felipo V.** 2007. The function of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in brain in vivo and learning ability decrease in parallel in mature compared with young rats. *Learn Mem* 14: 254-258

- Piedrafita B, Erceg S, Cauli O, Felipo V.** 2008. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls or methylmercury, but not to its combination, impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway and learning in 3-month-old rats. *Neuroscience* 154: 1408-1416
- Pifarre P, Prado J, Baltrons MA, Giralt M, Gabarro P, Feinstein DL, Hidalgo J, Garcia A.** 2011. Sildenafil (Viagra) ameliorates clinical symptoms and neuropathology in a mouse model of multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 121: 499-508
- Pothuizen HH, Zhang WN, Jongen-Relo AL, Feldon J, Yee BK.** 2004. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur J Neurosci* 19: 705-712
- Poucet B, Benhamou S.** 1997. The neuropsychology of spatial cognition in the rat. *Crit Rev Neurobiol* 11: 101-120
- Poucet B, Save E, Lenck-Santini PP.** 2000. Sensory and memory properties of hippocampal place cells. *Rev Neurosci* 11: 95-111
- Prasad S, Dhiman RK, Duseja A, Chawla YK, Sharma A, Agarwal R.** 2007. Lactulose improves cognitive functions and health-related quality of life in patients with cirrhosis who have minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 45: 549-559
- Prickaerts J, de Vente J, Honig W, Steinbusch HW, Blokland A.** 2002. cGMP, but not cAMP, in rat hippocampus is involved in early stages of object memory consolidation. *Eur J Pharmacol* 436: 83-87
- Prickaerts J, Steinbusch HW, Smits JF, de Vente J.** 1997. Possible role of nitric oxide-cyclic GMP pathway in object recognition memory: effects of 7-nitroindazole and zaprinast. *Eur J Pharmacol* 337: 125-136
- Puca FM, Antonaci F, Panella C, Guglielmi FW, Barone M, Francavilla A, Cerutti R.** 1989. Psychomotor dysfunctions in alcoholic and post-necrotic cirrhotic patients without overt encephalopathy. *Acta Neurol Scand* 79: 280-287
- Rameau GA, Tukey DS, Garcin-Hosfield ED, Titcombe RF, Misra C, Khatri L, Getzoff ED, Ziff EB.** 2007. Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death. *J Neurosci* 27: 3445-3455
- Ramirez M, Fernandez R, Malnic G.** 1999. Permeation of NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and cell pH in colonic crypts of the rat. *Pflugers Arch* 438: 508-515

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien JZ.** 2000. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 3: 238-244
- Ravizza T, Friedman LK, Moshe SL, Veliskova J.** 2003. Sex differences in GABA(A)ergic system in rat substantia nigra pars reticulata. *Int J Dev Neurosci* 21: 245-254
- Redish AD, Touretzky DS.** 1998. The role of the hippocampus in solving the Morris water maze. *Neural Comput* 10: 73-111
- Reed RB, Sandberg M, Jahnsen T, Lohmann SM, Francis SH, Corbin JD.** 1996. Fast and slow cyclic nucleotide-dissociation sites in cAMP-dependent protein kinase are transposed in type Ibeta cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 271: 17570-17575
- Rehnstrom S, Simert G, Hansson JA, Johnson G, Vang J.** 1977. Chronic hepatic encephalopathy. A psychometrical study. *Scand J Gastroenterol* 12: 305-311
- Ridley RM, Baker HF.** 1997. Evidence for a specific information processing deficit in monkeys with lesions of the septo-hippocampal system. *Cortex* 33: 167-176
- Riekkinen M, Stefanski R, Kuitunen J, Riekkinen P, Jr.** 1996. Effects of combined block of alpha 1-adrenoceptors and NMDA receptors on spatial and passive avoidance behavior in rats. *Eur J Pharmacol* 300: 9-16
- Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo JM, Felipo V.** 2010. Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 139: 675-684
- Rodrigo R, Erceg S, Rodriguez-Diaz J, Saez-Valero J, Piedrafita B, Suarez I, Felipo V.** 2007. Glutamate-induced activation of nitric oxide synthase is impaired in cerebral cortex in vivo in rats with chronic liver failure. *J Neurochem* 102: 51-64
- Rodrigo R, Felipo V.** 2007. Control of brain glutamine synthesis by NMDA receptors. *Front Biosci* 12: 883-890
- Rodrigo R, Jover R, Candela A, Compan A, Saez-Valero J, Erceg S, Felipo V.** 2005. Bile duct ligation plus hyperammonemia in rats reproduces the alterations in the modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in brain of cirrhotic patients. *Neuroscience* 130: 435-443

- Rodriguez-Alvarez J, Lafon-Cazal M, Bockaert J.** 1996. The CaM-kinase II inhibitor KN-62 blocks NMDA but not kainate stimulation of NO synthesis. *Neuroreport* 7: 2525-2528
- Romero-Gomez M, Cordoba J, Jover R, del Olmo JA, Ramirez M, Rey R, de Madaria E, Montoliu C, Nunez D, Flavia M, Company L, Rodrigo JM, Felipo V.** 2007. Value of the critical flicker frequency in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 45: 879-885
- Roughneen PT, Gouma DJ, Kulkarni AD, Fanslow WF, Rowlands BJ.** 1986. Impaired specific cell-mediated immunity in experimental biliary obstruction and its reversibility by internal biliary drainage. *J Surg Res* 41: 113-125
- Rougier H, Milota S, Rodrigo R, Gherase M, Sarcina L, Moldovan O, Zilhao J, Constantin S, Franciscus RG, Zollikofer CP, Ponce de Leon M, Trinkaus E.** 2007. Pesteră cu Oase 2 and the cranial morphology of early modern Europeans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1165-1170
- Rusu G, Nechifor M, Lupusoru CE, Tartau L.** 2013. Effects of some dopamine agents on modulation of memory processes performance in rats. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 117: 959-964
- Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H, et al.** 1995. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* 373: 151-155
- Salmon DP, Butters N.** 1995. Neurobiology of skill and habit learning. *Curr Opin Neurobiol* 5: 184-190
- Sasaki S, Siragy HM, Gildea JJ, Felder RA, Carey RM.** 2004. Production and role of extracellular guanosine cyclic 3', 5' monophosphate in sodium uptake in human proximal tubule cells. *Hypertension* 43: 286-291
- Schafer DF, Jones EA.** 1982. Hepatic encephalopathy and the gamma-aminobutyric-acid neurotransmitter system. *Lancet* 1: 18-20
- Schmahmann JD.** 1991. An emerging concept. The cerebellar contribution to higher function. *Arch Neurol* 48: 1178-1187
- Schomerus H, Hamster W.** 2001. Quality of life in cirrhotics with minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 16: 37-41

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Schomerus H, Hamster W, Blunck H, 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
- Schultz V, Lowenstein JM.** 1978. The purine nucleotide cycle. Studies of ammonia production and interconversions of adenine and hypoxanthine nucleotides and nucleosides by rat brain in situ. *J Biol Chem* 253: 1938-1943
- Shalaby T, Liniger M, Seebeck T.** 2001. The regulatory subunit of a cGMP-regulated protein kinase A of *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem* 268: 6197-6206
- Sharma P, Sharma BC, Puri V, Sarin SK.** 2008. Minimal hepatic encephalopathy in patients with extrahepatic portal vein obstruction. *Am J Gastroenterol* 103: 1406-1412
- Shawcross DL, Davies NA, Williams R, Jalan R.** 2004. Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J Hepatol* 40: 247-254
- Sherlock S, Summerskill WH, White LP, Phear EA.** 1954. Portal-systemic encephalopathy; neurological complications of liver disease. *Lancet* 267: 454-457
- Silva AJ, Giese KP, Fedorov NB, Frankland PW, Kogan JH.** 1998. Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning. *Neurobiol Learn Mem* 70: 44-61
- Slowik A, Ciecko-Michalska I, Bogdal J, Szczudlik A.** 2001. The diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy. *Przegl Lek* 58: 1059-1062
- Smith RD, Grzelak ME, Coffin VL.** 1997. Reduction of dizocilpine and scopolamine-induced deficits in avoidance responding by SCH 54388, a metabolite of felbamate. *Pharmacol Biochem Behav* 58: 657-664
- Snider RS, Maiti A, Snider SR.** 1976. Cerebellar pathways to ventral midbrain and nigra. *Exp Neurol* 53: 714-728
- Spahr L, Vingerhoets F, Lazeyras F, Delavelle J, DuPasquier R, Giostra E, Mentha G, Terrier F, Hadengue A.** 2000. Magnetic resonance imaging and proton spectroscopic alterations correlate with parkinsonian signs in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 119: 774-781
- Squire LR, Zola-Morgan S.** 1991. The medial temporal lobe memory system. *Science* 253: 1380-1386
- Squire LR, Zola SM.** 1996. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13515-13522

- Steindl PE, Coy DL, Finn B, Zee PC, Blei AT.** 1996. A low-protein diet ameliorates disrupted diurnal locomotor activity in rats after portacaval anastomosis. *Am J Physiol* 271: G555-560
- Strack S, Barban MA, Wadzinski BE, Colbran RJ.** 1997. Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatases 1 and 2A. *J Neurochem* 68: 2119-2128
- Tancredi V, D'Arcangelo G, Grassi F, Tarroni P, Palmieri G, Santoni A, Eusebi F.** 1992. Tumor necrosis factor alters synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 146: 176-178
- Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ.** 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401: 63-69
- Theander B, Apelqvist G, Bugge M, Andersson G, Hindfelt B, Bengtsson F.** 1997. Gender and diurnal effects on specific open-field behavioral patterns in the portacaval shunted rat. *Metab Brain Dis* 12: 47-59
- Timmermann L, Butz M, Gross J, Kircheis G, Haussinger D, Schnitzler A.** 2005. Neural synchronization in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 20: 337-346
- Timmermann L, Gross J, Butz M, Kircheis G, Haussinger D, Schnitzler A.** 2004. Pathological oscillatory coupling within the human motor system in different tremor syndromes as revealed by magnetoencephalography. *Neurol Clin Neurophysiol* 2004: 26
- Trevitt T, Carlson B, Correa M, Keene A, Morales M, Salamone JD.** 2002. Interactions between dopamine D1 receptors and gamma-aminobutyric acid mechanisms in substantia nigra pars reticulata of the rat: neurochemical and behavioral studies. *Psychopharmacology (Berl)* 159: 229-237
- Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S.** 1996. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87: 1327-1338
- Tulving E.** 1972. Organization of memory. Academic Press, New York
- Turski L, Klockgether T, Turski W, Schwarz M, Sontag KH.** 1987. Substantia nigra and motor control in the rat: effect of intranigral alpha-kainate and gamma-D-glutamylaminomethylsulphonate on motility. *Brain Res* 424: 37-48
- Tzortzopoulos A, Best SL, Kalamida D, Torok K.** 2004. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent activation and inactivation mechanisms of alphaCaMKII and phospho-Thr286-alphaCaMKII. *Biochemistry* 43: 6270-6280

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Uribe M, Marquez MA, Garcia-Ramos G, Escobedo V, Murillo H, Guevara L, Lisker R.** 1980. Treatment of chronic portal-systemic encephalopathy with lactose in lactase-deficient patients. *Dig Dis Sci* 25: 924-928
- Vezina P, Kim JH.** 1999. Metabotropic glutamate receptors and the generation of locomotor activity: interactions with midbrain dopamine. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 577-589
- Volonte C, Merlo D, Ciotti MT, Calissano P.** 1994. Identification of an ectokinase activity in cerebellar granule primary neuronal cultures. *J Neurochem* 63: 2028-2037
- Wang JQ, Mao L.** 2000. Sustained behavioral stimulation following selective activation of group I metabotropic glutamate receptors in rat striatum. *Pharmacol Biochem Behav* 65: 439-447
- Wang Q, Wu J, Rowan MJ, Anwyl R.** 2005. Beta-amyloid inhibition of long-term potentiation is mediated via tumor necrosis factor. *Eur J Neurosci* 22: 2827-2832
- Watanabe A.** 2000. Portal-systemic encephalopathy in non-cirrhotic patients: classification of clinical types, diagnosis and treatment. *J Gastroenterol Hepatol* 15: 969-979
- Weiner ID.** 2004. The Rh gene family and renal ammonium transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13: 533-540
- Weissenborn K, Bokemeyer M, Krause J, Ennen J, Ahl B.** 2005a. Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease. *AIDS* 19 Suppl 3: S93-98
- Weissenborn K, Ennen JC, Schomerus H, Ruckert N, Hecker H.** 2001. Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 34: 768-773
- Weissenborn K, Giewekemeyer K, Heidenreich S, Bokemeyer M, Berding G, Ahl B.** 2005b. Attention, memory, and cognitive function in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 20: 359-367
- Weissenborn K, Heidenreich S, Giewekemeyer K, Ruckert N, Hecker H.** 2003. Memory function in early hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 39: 320-325
- Whishaw IQ, McKenna JE, Maaswinkel H.** 1997. Hippocampal lesions and path integration. *Curr Opin Neurobiol* 7: 228-234
- Wiggs CL, Weisberg J, Martin A.** 1999. Neural correlates of semantic and episodic memory retrieval. *Neuropsychologia* 37: 103-118

- Wojcicki M, Haagsma EB, Gouw AS, Slooff MJ, Porte RJ.** 2004. Orthotopic liver transplantation for portosystemic encephalopathy in an adult with congenital absence of the portal vein. *Liver Transpl* 10: 1203-1207
- Xu X.** 1997. NMDA receptor antagonist MK-801 selectively impairs learning of the contiguity of the conditioned stimulus and unconditioned stimulus in goldfish. *Pharmacol Biochem Behav* 58: 491-496
- Yachha SK, Khanduri A, Sharma BC, Kumar M.** 1996. Gastrointestinal bleeding in children. *J Gastroenterol Hepatol* 11: 903-907
- Yadav SK, Srivastava A, Thomas MA, Agarwal J, Pandey CM, Lal R, Yachha SK, Saraswat VA, Gupta RK.** 2010. Encephalopathy assessment in children with extra-hepatic portal vein obstruction with MR, psychometry and critical flicker frequency. *J Hepatol* 52: 348-354
- Yamada K, Hiramatsu M, Noda Y, Mamiya T, Murai M, Kameyama T, Komori Y, Nikai T, Sugihara H, Nabeshima T.** 1996. Role of nitric oxide and cyclic GMP in the dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *Neuroscience* 74: 365-374
- Yamada K, Nabeshima T.** 1997. Two pathways of nitric oxide production through glutamate receptors in the rat cerebellum in vivo. *Neurosci Res* 28: 93-102
- Yamada K, Noda Y, Nakayama S, Komori Y, Sugihara H, Hasegawa T, Nabeshima T.** 1995. Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *Br J Pharmacol* 115: 852-858
- Yen CL, Liaw YF.** 1990. Somatosensory evoked potentials and number connection test in the detection of subclinical hepatic encephalopathy. *Hepatogastroenterology* 37: 332-334
- Zhang J, Guo J, Zhao X, Chen Z, Wang G, Liu A, Wang Q, Zhou W, Xu Y, Wang C.** 2013. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil prevents neuroinflammation, lowers beta-amyloid levels and improves cognitive performance in APP/PS1 transgenic mice. *Behav Brain Res* 250: 230-237
- Zimmerman NP, Brownfield MS, DeVente J, Bass P, Oaks JA.** 2008. cGMP secreted from the tapeworm *Hymenolepis diminuta* is a signal molecule to the host intestine. *J Parasitol* 94: 771-779
- Zou LB, Yamada K, Tanaka T, Kameyama T, Nabeshima T.** 1998. Nitric oxide synthase inhibitors impair reference memory formation in a radial arm maze task in rats. *Neuropharmacology* 37: 323-330

