

**Universidad Autónoma de Baja California**

**Facultad de Ciencias**



**T E S I S**

**CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE ALTERACIONES  
CEREBELARES EN UN MODELO CRÓNICO DE ENCEFALOPATÍA  
HEPÁTICA**

Que para obtener el título de

**BIÓLOGO**

Presenta

***López Cervantes Mayra Lizeth***

Director

***Dr. Mauricio Díaz Muñoz***

***Instituto de Neurobiología, UNAM***

Enero 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE ALTERACIONES CEREBELARES  
EN UN MODELO CRÓNICO DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

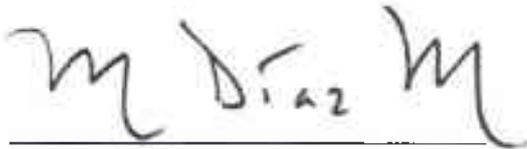
TESIS PROFESIONAL

Que para optar por el título de  
BIOLOGO

PRESENTA

LÓPEZ CERVANTES MAYRA LIZETH

APROBADO POR:



Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Director de Tesis



---

Dr. Ulises Gregorio III Pacheco Bardullas

Secretario



---

Dr. Julio Enrique Valencia Suarez

Sinodal

## **Resumen**

La anastomosis porta-cava (PCA, por sus siglas en Inglés) es un modelo experimental de encefalopatía hepática (EH) asociada con niveles altos de amonio circulante. La EH es un síndrome neuropsiquiátrico complejo que ocurre durante una enfermedad crónica del hígado. Los sujetos con EH tienen una amplia gama de alteraciones neurológicas y psiquiátricas que van desde deficiencias cognitivas leves, pérdida de memoria, problemas de sueño y desorientación, hasta anomalías graves como el coma o incluso la muerte. En animales de experimentación, se ha informado que la PCA promueve daños diversos, incluyendo lesiones cerebelosas que muestran similitudes con la vacuolización esponjiforme, muy probablemente como consecuencia de la hiperamonemia y de eventos proinflamatorios. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a este tipo de daño cerebeloso no están caracterizados. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue caracterizar a detalle la lesión cerebelosa en ratas con PCA experimental. Como protocolo experimental, se utilizaron ratas *Wistar* con PCA después de 13 semanas de cirugía. Las pruebas de comportamiento demostraron una actividad motora reducida y una coordinación deficiente. Las observaciones histopatológicas indicaron un profundo desorden en los marcadores neuronales y gliales. También, fue evidente la activación de la microglia, así como una mayor presencia de aquoporina IV e inflammasoma NLRP3. A corto plazo, se planea analizar la presencia de otros marcadores inflamatorios y priónicos en el cerebelo de las ratas PCA para complementar el presente proyecto.

**Palabras clave:** Encefalopatía hepática, Anastomosis porto-cava, hiperamonemia, amonio, neurodegeneración, cerebelo.

## **Abstract**

Porta-caval anastomosis (PCA) is an experimental model of hepatic encephalopathy (HE) associated with high levels of circulating ammonium. HE is a complex neuropsychiatric syndrome that occurs during chronic liver disease. Subjects with HE show a wide range of neurological and psychiatric alterations ranging from mild cognitive deficiencies such as poor memory, sleep problems and disorientation, until severe anomalies as coma, or even death. In experimental animals, it has been reported that PCA promotes cerebellar lesions that show similarities to spongiform vacuolization- most likely because of hyperammonaemia and pro-inflammatory events. However, the underlying cellular and molecular mechanisms that are associated to this type of cerebellar damage has not been analyzed. Hence, the aim of this project is to further characterize the cerebellar lesion in rats with experimental PCA. As experimental protocol, we have used Wistar rats with PCA after 13 weeks of surgery. Behavioral tests showed reduced motor activity, very deficient coordination and increased anxiety. Histopathological observations have indicated high incidence of cerebellar lesions and very evident disarray in neuronal, astrocytic and microglia markers. It was also noted a significant increment in the presence of glutamine synthetase ( $\text{NH}_4^+$ -metabolizing glial enzyme) and aquaporin IV (responsive factor of edema). The inflammasome marker, NRLP3, was also enhanced in the cerebellum of PCA rats. In conclusion, our results indicate a severe alteration in all cellular type in the cerebellum of PCA rats. The histological damage, most probably associated to the hyperammonemic state, involves the presence of notorious vacuolization, inflammation as well as brain edema. In short term, we will test the presence of prionic markers in this pathological model.

## **Agradecimientos**

Principalmente, quiero agradecer infinitamente al Dr. Mauricio Díaz Muñoz por aceptar ser mi tutor y permitirme realizar mi proyecto de tesis en su laboratorio. Le agradezco y admiro profundamente el gran apoyo y confianza brindada durante el desarrollo de la misma.

A la Dra. Deisy Gazca por la asesoría, amistad y apoyo en la unidad de conducta.

Al Dr. Francisco Vazquez por sus sugerencias y soporte técnico en el laboratorio.

Al Dr. Andres Stephano Quintanar, de la UAA, por el gran apoyo e interés en el proyecto.

Al Dr. Hernandez Pando, del INCMNSZ, por su análisis tan asertivo y sus sugerencias al proyecto.

Agradezco a la Dra. Olivia Vázquez y a sus estudiantes, especialmente a Cecilia Ximénez por compartir sus resultados preliminares y dar pauta a este proyecto. Gracias por las valiosas aportaciones así como la ayuda obtenida por especialistas del HITO, Querétaro.

A los integrantes de mi laboratorio por su crítica constructiva. En especial a Patricia Juárez y Elizabeth Morales por las sugerencias y apoyo durante mi estancia en el Lab B-11.

Quiero agradecer a las integrantes del D-15, especialmente a Marymar Becerra por su amistad y asistencia en los análisis de mis datos. También agradezco a Alejandra por el apoyo moral y técnico. Agradezco a la unidad de microscopia del INB-UNAM, especialmente a Ericka y Nydia por su apoyo técnico en las técnicas de imagen así como en la obtención de mis resultados. Por último, pero no menos importante, quiero agradecer al soporte técnico de Dalia de Ita, Soledad Mendoza (técnico del Lab-D12), Gemma (Técnico del Lab-A01), Carlos (Técnico del Lab-A03).

## **Dedicatorias**

Quiero dedicar este trabajo a mis padres quienes en todo momento me han apoyado e impulsándome a seguir mis metas y a formarme como una mejor persona. Gracias por todo lo que me han dado padres los amo.

A mis hermanos por ser parte de mi motivación y alegría de mí día a día (a pesar de la distancia).

A Leonel Hernández, mi persona favorita y cómplice de aventuras durante este viaje que llamamos vida.

A mis tutores académicos, la Dra. Patricia Juárez por responder todas mis dudas, darme excelente consejos, puntos de vista e invitarme a comer, mil gracias. Dr. Roberto Vázquez, por ser la primera persona me enseñó sobre la pasión por la ciencia (trabajo), por enseñarme desde cómo buscar literatura hasta desarrollar un juicio crítico e inquieto de conocimiento. Gracias por el contacto tan valioso me han brindado durante toda mi licenciatura.

A Estelita, Daniela, Sofía, Rubí, Aleydis y Mara, maravillosas mujeres quienes tienen toda mi admiración. Gracias porque a pesar de la distancia se hacían presentes con sus hermosos mensajes de motivación y ánimos siempre que lo necesite.

Finalmente a mis profesores de aulas en FC- UABC y FAC-CU-UNAM. Gracias por compartir su conocimiento, resolver mis dudas académicas y hasta brindarme consejos de vida

## TABLA DE CONTENIDOS

Resumen .....	2
Abstract .....	3
Agradecimientos .....	4
Dedicatorias .....	5
Índice de figuras .....	9
Índice de tablas .....	10
1. INDICE	
1.1 Amonio .....	11
1.2 Metabolismo Nitrogenado .....	11
1.2.1 Metabolismo nitrogenado en hígado .....	11
1.2.2 Metabolismo nitrogenado en el encéfalo .....	14
1.3 Encefalopatía hepática.....	16
1.3.1 Clasificación de la encefalopatía hepática.....	17
1.3.2 Modelos de estudio de encefalopatía hepática .....	18
1.3.3 Anastomosis porto-cava .....	19
1.4 Encefalopatía hepática por hiperamonemia .....	19
1.4.1 Hiperamonemia .....	20
1.4.2 Hiperamonemia en sistema nervioso central .....	20
1.4.3 Toxicidad por amonio en cerebelo.....	22
1.5 Patogénesis de la encefalopatía hepática por hiperamonemia .....	22
1.5.1 Edema citotóxico .....	22
1.5.2 NeuroInflamación .....	24
Planteamiento del problema .....	26
Pregunta de investigación .....	26
1.5 Hipótesis .....	27

1.6. Objetivos .....	27
1.6.1 Objetivo general .....	27
1.6.2 Objetivos particulares .....	27
2. Metodología .....	29
2.1 Modelo de encefalopatía hepática “anastomosis porto-cava experimental” .....	28
2.1.1 Animales experimentales.....	29
2.2 Evaluación de coordinación motora (Semana 3, 6 y 13 post-cirugía) .....	30
2.2.1 Rotarod .....	30
2.2.2 Campo abierto .....	31
2.3 Histología.....	31
2.3.1 Tinción Hematoxilina & Eosina (H&E).....	31
2.3.1.1 Cuantificación de densidad lineal de células de Purkinje.....	31
2.3.2 Tinción de PAS.....	31
2.4 Inmunofluorescencia .....	31
2.5 Análisis estadísticos .....	32
3. Resultados .....	33
3.1 validación del modelo de encefalopatía hepática .....	33
3.2 caracterización histológica de la degeneración cerebelar en ratas hiperamonémicas .....	34
3.3 Caracterización de la celularidad por Inmunofluorescencia .....	37
3.3.1 Inmuno marcaje en glía (GFAP) y núcleos en capa molecular y granular del cerebelo .....	37
3.3.2 Células de la capa granular marcadas con NeuN.....	39
3.3.3 Estado reactivo de la microglía (IBA-1) en ratas PCA .....	42
3.3.4 Glutamino sintetasa en ratas PCA.....	43
3.3.5 Aquaporina IV en ratas PCA.....	44

3.3.6 <i>Inflamasoma (NLRP3) en cerebelo de ratas con PCA NLRP3</i> .....	46
3.4 <i>Evaluación de la conducta motora</i> .....	47
3.4.1 <i>Conducta de exploración “campo abierto”</i> .....	47
3.4.2 <i>La pérdida de la coordinación motora ocurre de manera progresiva en un modelo de PCA</i> .....	49
4. <i>Discusión</i> .....	51
5. <i>Conclusiones</i> .....	57
6. <i>Perspectivas</i> .....	58
7. <i>Bibliografía</i> .....	59

## Índice de figuras

- Figura 1. Transporte del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en forma de glutamina y su entrada al hígado
- Figura 2. Transaminación de catalizada enzimáticamente (PLP)
- Figura 3. Intercomunicación del ciclo de la Urea y el ciclo de Krebs
- Figura 4. Ciclo del glutamato/ glutamina en astrocitos y neuronas
- Figura 6. Metodología de caracterización temporal de la conducta motora y de la histopatología en ratas experimentales, a las 13 semanas post-cirugía.
- Figura 7. Niveles de amonio en suero, ratas PCA 13 semanas post cirugía.
- Figura 8. Degeneración en cerebelo, ratas PCA 13 semanas post cirugía
- Figura 9. Pérdida de neuronas Purkinje y edema citotóxico en cerebelo, ratas PCA 13 semanas post cirugía.
- Figura 10. Histología de la placa kuru (amiloide). Corte sagital del cerebelo de ratas PCA 13 semanas post cirugía
- Figura 11. Densidad de fluorescencia en GFAP y núcleos de la capa molecular y granular en cerebelo de ratas PCA a las 13 semanas post cirugía
- Figura 12. Inmunofluorescencia en GFAP y núcleos de la capa molecular y granular en cerebelo de ratas PCA a las 13 semanas post cirugía.
- Figura 13. Densidad de fluorescencia en NeuN en capa granular en cerebelo ratas PCA a las 13 semanas post cirugía
- Figura 14. Normalización en la expresión de NeuN y GFAP contra los núcleos cada capa molecular y granular en laminillas de cerebelo de ratas a las 13 semanas post cirugía
- Figura 15.* Cortes sagitales de la corteza del cerebelo de ratas PCA 13 semanas post cirugía con un marcador de microglia IBA-1.
- Figure 16.* Inmunoreactividad contra GS en secciones sagitales un lóbulo del cerebelo a las 13 semanas post cirugía
- Figura 17. Inmunoreactividad de AQP-IV en cerebelo ratas PCA a las 13 semanas post cirugía
- Figura 18. Inmunoreactividad de NLRP3 en cerebelo ratas PCA a las 13 semanas post cirugía.
- Figura 19. Conducta motora “campo abierto” PCA a las 13 semanas post cirugía
- Figura 20. Coordinación motora “Rotarod”. Esquema representativo del desempeño temporal en la coordinación motora

## **Índice de tablas**

Tabla 1. Clasificación de la Encefalopatía Hepática (EH) por la ISHEN

Tabla 2. Parámetros morfométricos en ratas PCA

## **1. INTRODUCCIÓN**

### ***1.1 Amonio***

El amonio es una molécula muy pequeña que bajo ciertas condiciones, por ejemplo diferentes pH, puede comportarse como un ion ( $\text{NH}_4^+$ ) o un gas ( $\text{NH}_3$ ) capaz de cruzar las membranas celulares <sup>1</sup>. En condiciones fisiológicas normales (pH 7.4) <sup>2</sup>, 98 % la molécula se encuentra como  $\text{NH}_4^+$  con un radio iónico y un coeficiente de difusión similar al del potasio ( $\text{K}^+$ ); tales propiedades le permiten atravesar las membranas plasmáticas por los canales de  $\text{K}^+$  <sup>1,3</sup>. Sólo alrededor del 1.7% del amonio se presenta como amoniaco a pH 7.4 <sup>4</sup>. Además, niveles altos de amonio sistémico afectan el metabolismo celular, particularmente el  $\text{NH}_4^+$  el cual produce un impacto negativo en el potencial de membrana provocando patologías complejas tales como: encefalopatía hepática y déficits en el ciclo de la urea <sup>3,4,5</sup>.

### ***1.2 Metabolismo del Nitrógeno***

#### ***1.2. Metabolismo del nitrógeno en hígado***

Los organismos ureotélicos (mamíferos, tortugas, anfibios y tiburones) excretan el nitrógeno amínico como urea a través del denominado *Ciclo de la Urea* <sup>5</sup>.de manera exclusiva la producción de urea tiene lugar en las mitocondrias y citoplasma de los hepatocitos <sup>6</sup>.

El amonio se genera en el catabolismo de los aminoácidos (aa), también parte del amonio, drena al hígado vía vena porta <sup>6,7</sup>. En el hígado el hepatocito pericentral es responsable de la síntesis de glutamina, siendo esta ruta de mayor capacidad, mientras que el hepatocito periportal es responsable de la síntesis de urea, siendo ésta de mayor afinidad. Ambos sistemas se coordinan para optimizar el manejo del nitrógeno hepático.

Además del hígado, en tejidos extrahepáticos, el amonio liberado se combina con el glutamato para formar glutamina mediante la glutamina sintetasa (GS). Esta reacción requiere ATP para que en conjunto al glutamato formen ADP y un intermediario  $\gamma$ - glutamil

fosfato que reacciona con el  $\text{NH}_4^+$  generando glutamina y fosfato inorgánico. La glutamina es transportada a través de la sangre a órganos diversos donde la enzima glutaminasa libera  $\text{NH}_4^+$  en las mitocondrias (Figura 1<sup>6</sup>).

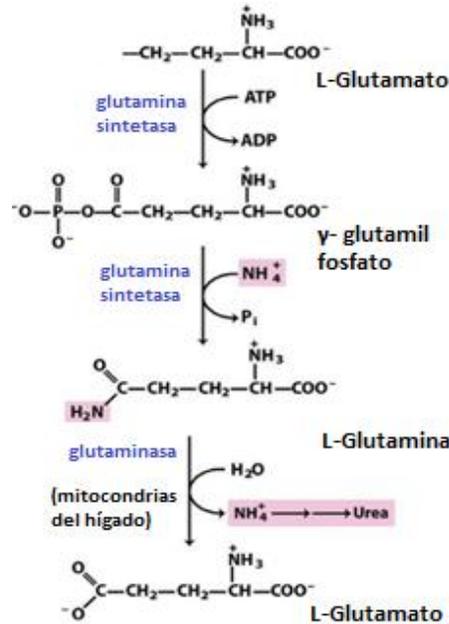


Figura 1. Transporte del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en forma de glutamina y su entrada al hígado, (Figura tomada y modificada de Albert & Lehninger, 2005)

Por otra parte, los aminoácidos participan en ciertas reacciones como la transaminación, seguida de la desaminación, donde el grupo  $\alpha$ -amino se transfiere del átomo de carbono  $\alpha$  del  $\alpha$ -cetoglutarato para originar L-glutamato y liberar el  $\alpha$ -cetoácido de los aa<sup>4</sup> [Figura 2<sup>8</sup>].

El L- glutamato funciona como dador de grupos amino, es el único aminoácido que sufre desaminación oxidativa para liberar amonio y  $\alpha$ -cetoglutarato, un intermediario del ciclo de Krebs<sup>7</sup>

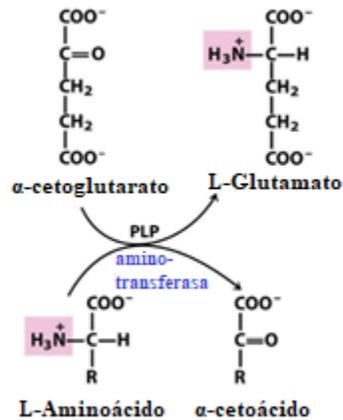


Figura 2. Transaminación de catalizada enzimáticamente (PLP). (Figura tomada y modificada de Nelson & Cox., 2005)

Si los productos nitrogenados no son reutilizados para síntesis de nuevos aminoácidos entonces el único producto final es la excreción en el ciclo de la urea. En el ciclo de la urea, la ornitina se une al amonio, carbamil fosfato, cediendo su grupo carbamilo a la ornitina para formar citrulina mediante la ornitina transcarbamilasa (OTC). La citrulina pasa de la mitocondria al citosol donde el segundo grupo amino (intermediario citrullil-AMP) se transfiere a la citrulina desde el aspartato para formar arginina, esta reacción es catalizada argininosuccinato sintetasa (ASS). El argininosuccinasa forma arginina libre y fumarato, catálisis por argininosuccinato liasa (ALS); este último metabolito se convierte en malato (a través de la fumarasa) entra a la mitocondria y funciona como intermediario del ciclo de Krebs, este paso interconecta a ambos ciclos<sup>89</sup>. La arginina es catabolizada por la arginasa (ARG-1) dando urea y ornitina. Finalmente, la ornitina se transporta a la mitocondria para iniciar otra vez el ciclo <sup>7,10</sup> [Figura 3 <sup>8</sup>].

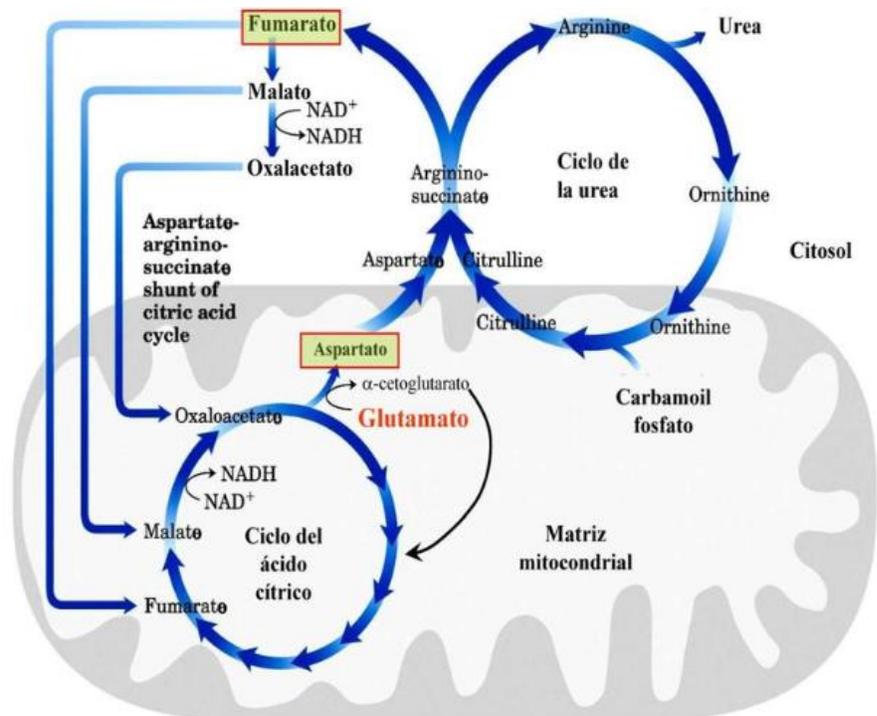


Figura 3. Intercomunicación del ciclo de la Urea y el ciclo de Krebs (figura tomada y modificada de Albert & Lehninger, 2005)

### 1.1.3 Metabolismo del amonio en el encéfalo

El incremento en la producción catabólica de amonio es un problema bioquímico serio debido a su alta toxicidad en los tejidos y órganos <sup>8</sup>. En el encéfalo, a diferencia del hígado, no se produce el ciclo de la urea debido a la carencia de enzimas como: carbamil fosfato sintasa I y la OTC <sup>7,11</sup>. Por lo que durante eventos de elevación en los niveles de amonio circulante, el sistema nervioso central (SNc) se ve comprometido <sup>11,12</sup>.

La principal estrategia (y de mayor relevancia) en la eliminación del amonio en el cerebro, es mediante el ciclo del glutamato/glutamina (glu/gln) por reacción de la GS <sup>13,14</sup>,

Durante el ciclo glu/gln el glutamato se sintetiza a partir del glutamato deshidrogenasa durante el ciclo de la urea <sup>15</sup>. Típicamente el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cruza la bicapa lipídica de la barrera hematoencefálica (BHE) incorporándose al glutamato para formar glutamina por medio de

la GS, enzima específica de glia (astrocitos) en mamíferos <sup>16</sup>. Después es transportada a la neurona <sup>17</sup>. En las neuronas la glutaminasa activada con fosfato (PAG) cataliza la conversión del glutamina en glutamato para liberarlo como neurotransmisor desde la terminal presináptica <sup>17,18</sup>. El glutamato debe ser recapturado rápidamente por transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT) <sup>19</sup> para reincorporar al glutamato en los astrocitos y repetir el ciclo <sup>15,19,20</sup> (Véase la figura 4 <sup>21</sup>).

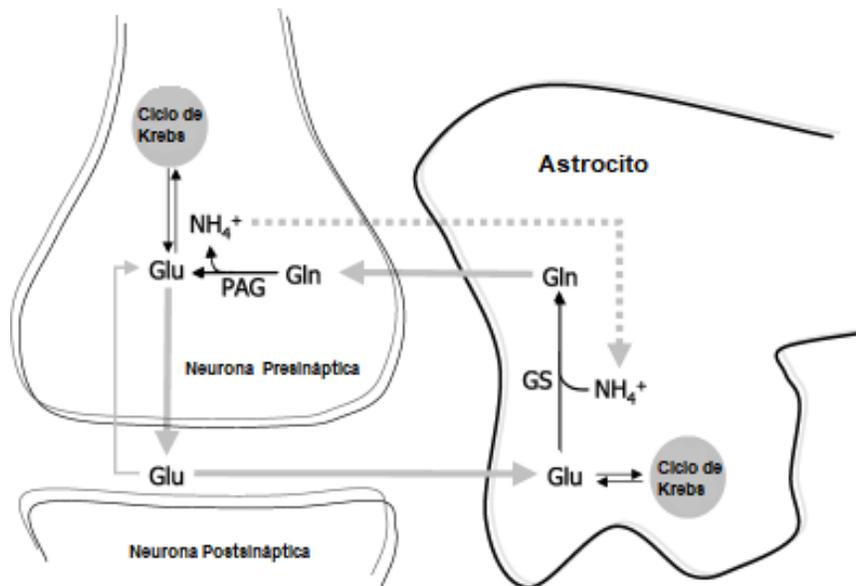
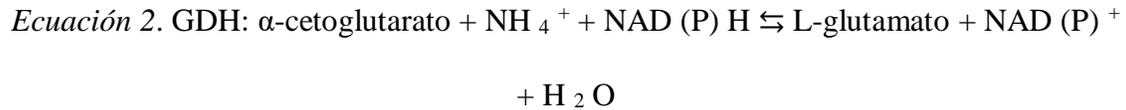


Figura 4. Ciclo del glutamato/ glutamina en astrocitos y neuronas. (Figura tomada y modificada de Bak et al., 2006)

El mecanismo anteriormente explicado sigue una ruta similar a la del músculo esquelético o de hepatocitos perivenosos <sup>111</sup>, tal y como se muestra en la ecuación 1 <sup>20,22</sup>.



Una fuente secundaria del metabolismo del amonio en el SNc, se realiza por el efecto de las aminotransferasas ligadas a glutamato/ $\alpha$ -cetoglutarato acoplado a una reacción de glutamato deshidrogenasa (GDH)(Véase ecuación 2 <sup>20</sup>).



Cabe resaltar, con el incremento de amonio, las reacciones se revierte debido a que las aminotransferasas acopladas a GDH (encargadas de mantener los niveles de glutamato-nitrógeno) mientras al mismo tiempo el esqueleto carbonado del glutamato es derivado del  $\alpha$ -cetoglutarato <sup>20</sup> conllevando al sistema a un desequilibrio en la bioenergética neuronal y glial.

Por otra parte, el  $\text{NH}_4^+$  incorporado a la glutamina juega un papel vital <sup>23</sup> en el sistema de neurotransmisión glutamatérgica (principal neurotransmisión excitatoria) y también actúa como un precursor en la producción del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA/neurotransmisión inhibitoria) <sup>19,23</sup>, en mamíferos, a través de la enzima descarboxilasa del ácido glutámico <sup>24,25</sup>.

Los astrocitos integran al glutamato del espacio sináptico a través de transportadores específicos por medio de un gradiente electroquímico de sodio ( $\text{Na}^+$ ); el gradiente se mantiene mediante la activación de la adenosina trifosfato dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPasa) <sup>26</sup>. Los astrocitos liberan la glutamina al espacio extracelular para ser capturado por las terminales neuronales y reconvertir mediante el  $\alpha$ -cetoglutarato a glutamato <sup>27,18</sup>.

Es importante destacar que no existe un mecanismo de intercambio de ATP entre astrocitos y neuronas, por lo que la coordinación energética entre estos tipos celulares es a través de intermediarios metabólicos como el lactato <sup>28</sup>.

### ***1.3 Encefalopatía hepática***

La EH es un trastorno neuropsiquiátrico complejo y multifacético presente en la enfermedad hepática crónica <sup>29</sup>. La enfermedad hepática que puede ser aguda o crónica (por ejemplo, cirrosis) induce diferentes alteraciones neurológicas afectando a 5.5 millones de personas en

Estados Unidos, siendo un número similar en la Unión Europea <sup>30</sup>. En México se estima que hacia el año 2020 existirán aproximadamente 1.5 millones de casos de pacientes cirróticos con síntomas de encefalopatía, implicando un serio problema de salud pública, económico y social <sup>31</sup>. Típicamente la EH se clasifica en mínima o grave; en clínica la degeneración hepatocerebral crónica adquirida se caracteriza por síntomas como ataxia, disartria, apraxia y parkinsonismo, el coma y la muerte <sup>30</sup>; en pacientes sin síntomas evidentes, se puede presentar la denominada encefalopatía hepática mínima (EHM) oculta o abierta. La etiología de la enfermedad muestra una amplia gama de alteraciones neurológicas motoras y psiquiátricas que van desde el deterioro cognitivo leve, el coma y la muerte <sup>32</sup>. La incidencia y prevalencia de la EH es difícil de determinar debido a la falta de procedimientos de diagnóstico simple en laboratorio (ejemplo: niveles de amonio en sangre) <sup>33</sup>, debido a la confusión con otros déficits, ya que existen 6 enfermedades posibles relacionadas con el ciclo de la urea <sup>34</sup> como: déficit de arginasa, déficit de ornitina trinascarbamilasa, déficit de N-acetil glutamato sintetasa, déficit de argininosuccinato liasa, déficit de carbamifosfato sintetasa <sup>35</sup>. Por otro lado, los diagnósticos psicométricos mediante semiología se puede confundir con demencia o delirium <sup>36</sup>. Hacen falta modelos experimentales que emulen las manifestaciones clínicas en detección temprana, estudio de la fisiopatología de la EH y tratamientos terapéuticos <sup>37,38</sup>.

Los mecanismos exactos responsables de la encefalopatía hepática no están completamente caracterizados. Sin embargo, evidencia reciente apunta hacia un efecto sinérgico entre los factores precipitantes que contribuyen al deterioro motor y neuropsiquiátrico <sup>30,32</sup>

### *1.3.1 Clasificación de la encefalopatía hepática*

Recientemente la ISHEN (Sociedad Internacional para la Encefalopatía Hepática y el Metabolismo del Nitrógeno), denominó como inicio de la etiología a la desorientación y a la

asterixis <sup>39</sup>. Sin embargo, los signos cognitivos y motores pueden no expresarse o no progresar en paralelo en cada individuo por lo que dificulta un diagnóstico y/o determinación de la gravedad <sup>39,40</sup>

De tal forma que la ISHEN proporcionó una clasificación en humanos <sup>39</sup> y una guía experimental en animales <sup>41</sup>

<b>Tabla 1. Clasificación de la Encefalopatía hepática</b>	
<b>Tipo A</b>	La EH asociada a insuficiencia hepática aguda. Inflamación.
<b>Tipo B</b>	EH resultante de una derivación porto sistémica en ausencia de alguna enfermedad del parénquima hepático
<b>Tipo C</b>	Debido a cirrosis alcohólica, infección viral, obstrucción biliar o toxinas.

Tabla 1. Clasificación de la Encefalopatía Hepática (EH) por la ISHEN, publicado en el 2008. Enfermedades que subyacen a la EH. (Tabla modificada de Butterworth et al., 2009)

Según la gravedad de las manifestaciones en la EH se han sub-clasificado en <sup>39</sup>:

i. Según el curso temporal: episódica; recurrente (< 6 meses); persistente denota un patrón de alteraciones intercaladas.

ii. Según la existencia de factores precipitantes: no precipitado; precipitado (se debe identificar el factor precipitante)

iii. Según la gravedad: sin deterioro; mínima, Grado I-V

iiii. Según la insuficiencia hepática: aguda o crónica.

Aunque el impacto del pronóstico así como sus mecanismos difiere, esta clasificación seguirá siendo un área de investigación <sup>39,41,42</sup>

### *1.3. 2 Modelos de estudio de encefalopatía hepática*

Actualmente comprender los mecanismos moleculares que conducen a la aparición de la EH, es objeto de estudio en numerosos grupos de investigación básica para generar herramientas

para un diagnóstico temprano así como tratamientos terapéuticos efectivos<sup>29,30</sup>: Una amplia variedad de animales se han implementado para estudiar EH incluyendo especies grandes<sup>43</sup> (perros, cerdos, etc.) y pequeñas (ratas y otros roedores)

*In vivo*, el modelo clásico es el de anastomosis porto-cava en ratas<sup>44</sup> ya que emula varios de los síntomas asociados a fallas crónicas en hígado y encefalopatía hepática mínima<sup>41</sup>, haciéndolo ideal para el estudio de terapias y tratamientos terapéuticos.

Se ha propuesto el uso del modelo de ligadura biliar<sup>45</sup> y/o el modelo de PCA aunado a la administración de algún tóxico como amonio o urea, para estudio de los mecanismos que subyacen a la EH<sup>41,43</sup> asociada a la lesión/desvascularización del hígado (amonio precipitante) Asimismo, se han administrado diversas sustancias hepatotóxicas como: galactosamina, tiocetamida, azoximetano, CCl<sub>4</sub>, y etanol<sup>46</sup>, las cuales reproducen algunas de las sintomatologías episódicas como inflamación, trastornos metabólicos y hasta el coma<sup>41,47</sup>. *In vitro*, se han implementado modelos en cultivos de células endoteliales, astrocitos, microglia, neuronas y co-cultivos donde de manera puntal se tiene por objetivo estudiar la neurovasculatura y toxicidad aguda por amonio en relación a la EH<sup>41</sup>

### *1.3.3 Anastomosis porto-cava*

La cirugía experimental Anastomosis Porto-Cava (PCA) en ratas, consiste en desviar la circulación venosa de las vísceras abdominales (vena porta), hacia la vena cava inferior, evitando así la circulación del duodeno hacia el hígado (Lee et al., 1984). La derivación portal previene la hipertensión portal y el sangrado recurrente de las varices esofágicas. Por otro lado, la PCA se considera el mejor modelo de hiperamonemia para promover la EH y estudiar las diversas alteraciones metabólicas, moleculares y en tratamientos farmacéuticos<sup>47,48</sup>.

## **1.4 Encefalopatía hepática por hiperamonemia**

### *1.4.1 Hiperamonemia*

En situaciones de hiperamonemia la función neurológica del encéfalo se muestra alterada a causa de una disfunción hepática <sup>26</sup>. Las insuficiencias hepáticas, de grado agudo o crónico, comprometen el metabolismo del amonio, de tal forma que, incrementos significativos de amonio (hiperamonemia) conllevan a desórdenes neurológicos asociados a la encefalopatía hepática <sup>47,49</sup>. La toxicidad por amonio incide en alteraciones cognitivas, cambios en la personalidad, alteración en los ritmos circadianos (ciclo de sueño)<sup>50</sup> y coordinación motora <sup>5,26,51,52</sup>.

El amonio sistémico, normalmente se encuentra en un rango de concentración de 50 a 100  $\mu\text{M}$  <sup>19</sup>, resultado de la alta capacidad hepática de eliminar el amonio del sistema gastrointestinal (GI) <sup>53</sup>. En pacientes, así como, en animales con EH crónica el rango de concentración de amoniaco aumenta hasta 3 veces, de 0.3-0.5 mM pacientes, 1-5 mM en modelos animales <sup>1</sup>. El 25 % del amonio que ingresa al cerebro, durante la insuficiencia hepática, se debe a una mayor presencia y permeabilidad en la BHE al amonio <sup>1,29</sup>.

#### *1.4.2 Hiperamonemia en sistema nervioso central*

Asimismo, se ha demostrado el amonio es tan eficiente como el potasio, es decir, el amonio puede desplazar al potasio mediante canales y transportadores de iones de potasio, y a través la bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPasa en células neuronales <sup>5,26</sup>; esta propiedad del amonio se ha asociado con manifestaciones toxicas que conducen al desequilibrio en la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica (principalmente)<sup>23,54</sup>. Los altos niveles de amonio interfieren en la actividad de la bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPasa, es decir, la falla energética como por ejemplo: “los mecanismos exitotóxicos” desactivan la bomba sodio potasio, permitiendo que el sodio y el agua extracelulares ingresen a la célula provocando la inflamación celular, proteólisis, degradación mitocondrial y producción de radicales libres<sup>55</sup>. La hiperamonemia crónica induce cambios adaptativos en los receptores NMDA mostrando un deterioro de la

vía glutamato- óxido nítrico (NO)- cGMP,<sup>56</sup> y, aunque los mecanismos moleculares involucrados en el aprendizaje y memoria no están bien caracterizados; los receptores NMDA se han relacionado en tipos particulares de aprendizaje y memoria y potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés)<sup>55</sup>, situada en zonas específicas del cerebro como el hipocampo<sup>57</sup>. La activación de los receptores NMDA aumentan las cantidades de calcio en las neuronas postsinápticas lo cual induce la unión a la calmodulina, activando la NO sintasa y el NO, que activa la guanilato ciclasa conduciendo al aumento de la cGMP, esta vía puede ser importante en el aprendizaje y memoria y la inducción de LTP<sup>55</sup>. Asimismo, se ha reportado que durante mecanismos de excitotoxicidad por incremento de glutamato extracelular ligado a la activación de receptores metabotrópicos de glutamato en sustancia nigra<sup>50,56</sup> Este mecanismo induce subsecuentemente estrés oxidativo alterando la homeostasis de calcio y la síntesis de ATP en neuronas, llevándolas a la muerte celular por toxicidad de amonio<sup>58</sup>. Diversos grupos de investigación mencionan que la hiperamonemia en estadios crónicos altera la neurotransmisión serotoninérgica<sup>59</sup>, glutamatérgica y GABAérgica<sup>30,60</sup>.

Por otro lado, estudios crónicos en cerebelo *in vivo* muestran un incremento en los niveles de glutamato, glutamina, GABA y citrulina<sup>12</sup>. Existe un incremento en la expresión, en astrocitos, de los transportadores de glutamina (SNAT3) así como un incremento en la expresión de los transportadores tipo GAT3<sup>19</sup>. Sin embargo, los transportadores de glutamato tipo GLAST y GLT-1 en astrocitos, se muestran disminuidos<sup>61</sup>. Por el contrario, en neuronas se disminuye la expresión de transportadores (SNAT1)<sup>19</sup> para glutamina, así como la expresión de transportadores a GABA en neuronas (GAT1). Asimismo, la expresión del transportador de glutamato EAAC1 acoplado a receptores NMDA en neuronas reduce su expresión por aumento del amonio<sup>19,62</sup>. Adicionalmente, se ha descrito la diferencia entre la

hiperamonemia crónica y/o agua puede explicarse por la neuromodulación de los receptores de glutamato mediante el la actividad del glutati6n<sup>55</sup>.

Por otro lado, en tejido cerebral post-mortem de pacientes con EH se mostr6 un cambio morfol6gico en astrocitos (inflamaci6n celular) a un fenotipo celular conocido como astrocitos tipo Alzheimer II <sup>42</sup>. En ratas PCA se reprodujo el cambio del fenotipo celular astroc6tico (Tipo Alzheimer II) aproximadamente en la quinta semana postcirug6a <sup>63</sup>.

#### *1.4.3 Toxicidad por amonio en cerebelo*

Se ha reportado que el cerebelo es especialmente susceptible al estr6s oxidativo <sup>48</sup> y en conjunto con los ganglios basales, estas regiones captan mayor suministro de amoniaco durante la EH <sup>62</sup>.

En modelos *in vivo* se observ6 que la hiperamonemia cr6nica induce la neuroinflamaci6n e incrementa el tono GABA6rgico<sup>64</sup>, asociado al aumento de transportador GAT3 <sup>65</sup> en astrocitos del cerebelo, que adem6s contribuye a la disfunci6n motora. <sup>1966</sup>

Cavanagh et al. <sup>67</sup> en un modelo de ratas PCA (16 – 35 semanas post cirug6a) report6 la aparici6n de vacuolas en la capa molecular del cerebelo, as6 como la perdida de las c6lulas Purkinje acompa6ado de una notable p6rdida de astrocitos y una respuesta diferencial de la gl6a de Bergman <sup>62</sup>

Este hallazgo es similar al fen6meno de encefalopat6a espongiforme reportado en pacientes y animales afectados por enfermedades pri6nicas, d6nde se observ6 una alta incidencia de lesiones cerebelosas<sup>32,68</sup>

### ***1.5 Patog6nesis de la encefalopat6a hep6tica por hiperamonemia***

#### *1.5.1 Edema cerebral*

Un edema se define como “un exceso de acumulaci6n de fluidos en el espacio intracelular o extracelular en el cerebro” <sup>69</sup>. En la 6ltima d6cada se ha asociado al edema cerebral con la

encefalopatía hepática <sup>69,70</sup>. En el cerebro la entrada neta de fluidos ocurre mediante los compartimientos vasculares, donde para cualquier daño en incremento de volumen cerebral, existirá un aumento en la presión intracraneal potenciando una compresión fatal del tronco encefálico y produciendo edema vasogénico; aunque éste último, se produce principalmente por la ruptura de uniones endoteliales que forman la BHE <sup>71,69</sup>.

Por otro lado, el edema citotóxico se deriva por disrupciones metabólicas que deterioran el funcionamiento de la bomba sodio/potasio en membranas, de células de la glía, causando una acumulación de osmolitos activos y reteniendo sodio y agua celular, que en consecuencia forman al edema <sup>72</sup>. El edema citotóxico, se caracteriza por el “hinchamiento de los astrocitos”, es decir, por el cambio del fenotipo Alzheimer tipo II <sup>73,67</sup>. Evidencias recientes direccionan este “hinchamiento” al estrés oxidativo y la transición de permeabilidad mitocondrial (mPT) <sup>74</sup>. Una de las proteínas principalmente involucrada en mecanismo de edema cerebral es el canal de agua-IV(AQP-IV), que es además un canal abundante en astrocitos y que se expresa mayormente en los pies perivascuales que están en contacto con la BHE <sup>29,74,75</sup>. La AQP-IV, contribuye a la neuroinflamación crónica e incremento de la presión intracraneal asociado a mecanismos de excitotoxicidad, apoptosis, estrés oxidativo, hipoxia <sup>29,75-77</sup> y en enfermedades como: lesiones traumáticas en cerebro, Parkinson, Alzheimer isquemia, entre otras <sup>69,74</sup>.

Además, la AQP-IV modula la comunicación astrocito-microglia por insultos al sistema nervioso desarrollando la cascada de inflamación <sup>77</sup>. Mediante técnicas inmunofluorescentes se observó existe una mayor expresión de la AQP-IV en cerebelo, específicamente en la capa granular. Aunque el cerebelo procese de una región sensitiva (el labio rómbico), se le ha relacionado principalmente con la función motora, de tal forma que los daños/insultos que

ocurren en el cerebelo, se han asociado con la pérdida en el control motor; sin embargo, hacen falta más estudios sobre el AQP-IV cerebelar y su relación con el control motor<sup>78</sup>

### *1.5.2 Neuroinflamación inducida por hiperamonemia en cerebelo*

Diversos grupos de investigación han propuesto al efecto citotóxico del amonio elevado (hiperamoniemia) en sinergia con la neuroinflamación como principales causantes de la inflamación en astrocitos (astrocitos tipo Alzheimer II) y en la formación del edema de bajo grado en cerebro<sup>2979</sup>. En biopsias de pacientes con EH mínima se ha reportado una incidencia de alteraciones en sistema inmune, además de mostrar neuroinflamación en cerebelo, activación de la microglia y astrocitos<sup>80</sup>, y la pérdida de células de Purkinje<sup>30</sup>; se ha tratado de elucidar al respecto proponiendo mecanismos de inflamación en la periferia (hígado), e infiltración a través de la BHE, por incremento de citosinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-16, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ ) en suero<sup>30</sup>. Asimismo, se propone que la activación de la microglía y pérdida de células de Purkinje podría ser una respuesta a una infiltración de linfocitos T (Th17, Tfh y autoreactivos CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>) a través de las meninges cerebelosas<sup>32,81</sup>.

Por otro lado, en estudios *in vitro* en células endoteliales donde se administró amonio se mostró un incremento en la expresión del receptor TRL4, que induce al edema citotóxico<sup>82</sup> estos datos correlacionan con los propuestos por otros grupos de investigación quienes mencionan la activación de receptores de TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$  promueven la síntesis de segundos mensajeros como NO y prostanoïdes que modulan la respuesta inflamatoria de la microglía<sup>83</sup> Además, la neuroinflamación y neurodegeneración a menudo conllevan a deposiciones aberrantes de agregados proteicos incluyendo  $\beta$ -amiloïdes,  $\alpha$ -sinucleína y proteínas priónicas capaces de activar el cuerpo de inflamación (inflamasa)<sup>84</sup>.

Finalmente, quedan muchas preguntas que responder con respecto a la bioenergética y su correlación con la neuroinflamación. Además, los mecanismos responsables de la neuroinflamación por hiperamonemia han sido poco explorados <sup>62,85</sup>.

### **Planteamiento del problema**

En modelos crónicos de PCA con EH, la histología del daño cerebelar aún no se ha caracterizado, por lo que se desconocen los mecanismos que subyacen la formación del edema y la pérdida en la coordinación motora durante el desarrollo de la EH, siendo esta información un factor clave para mejorar el pronóstico de pacientes que presentan este padecimiento.

### **Pregunta de investigación**

1. ¿Qué poblaciones celulares del cerebelo sufren mayor daño durante el daño cerebelar asociado a la hiperamonemia?
2. ¿La hiperamonemia es capaz de activar la respuesta de un cuerpo de inflamación en cerebelos con daño cerebelar?

## **1.5 HIPÓTESIS**

La progresión de la encefalopatía hepática en un modelo experimental de anastomosis porto-cava hasta un estado crónico, inducirá un deterioro en la coordinación motora, así como cambios histopatológicos cerebelares.

## **1.6 OBJETIVOS**

### *1.6.1 Objetivo general*

Caracterizar el daño histopatológico cerebelar y las secuelas motoras asociadas a un modelo experimental de encefalopatía hepática en ratas con anastomosis porto-cava.

### *1.6.2 Objetivos específicos*

- Implementar la anastomosis porto-cava en ratas Wistar
- Evaluación de la función motora durante la progresión de la encefalopatía hepática (3, 6, 9 y 13 semanas) en ratas con una anastomosis porto-cava experimental.
- Caracterización histopatológica en cerebelos de ratas con encefalopatía hepática experimental a las 13 semanas postcirugía.
- Evaluación de marcadores moleculares asociados a la inflamación y secciones de cerebelo de ratas con encefalopatía hepática a las 13 semanas postcirugía.

## 2. METODOLOGÍA

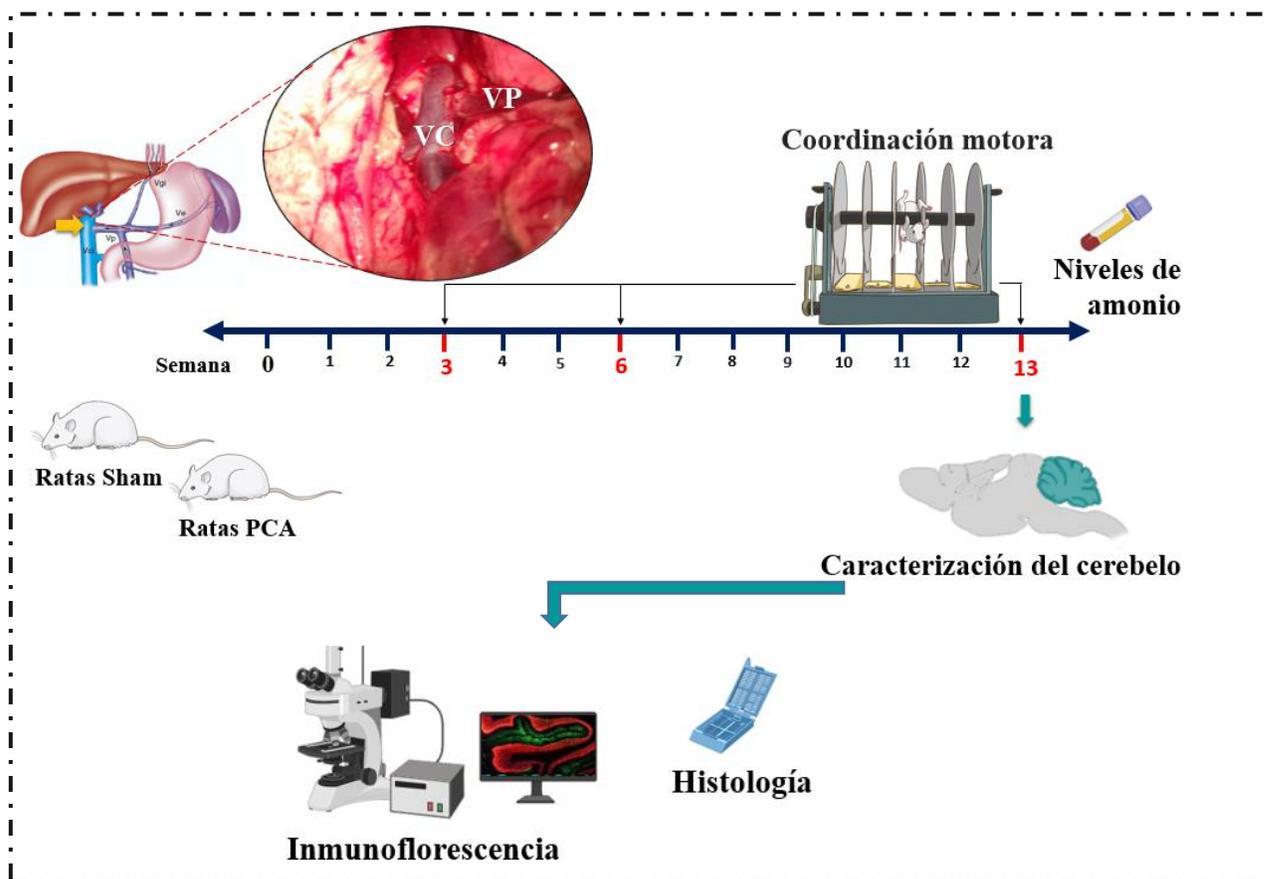


Figura 6. Metodología de caracterización temporal de la función motora y de la histopatología en ratas experimentales, a las 13 semanas postcirugía.

### 2.1 Modelo de encefalopatía hepática “Anastomosis porto-cava experimental”

La anastomosis portacava se realizó en ratas Wistar siguiendo el procedimiento descrito por Lee y Fischer (1974). Brevemente, las ratas se sometieron a anestesia ketamina/xilacina ( $70 \frac{mg}{kg} / 8 \frac{mg}{kg}$ ) a una dosis final 10 ml/kg (intraperitoneal), y se realizó una laparotomía para tener acceso a los órganos abdominales. La vena porta se diseccionó y ocluyó, el extremo de la vena porta se conectó a una ventana en la vena cava que previamente se obstruyó con clips quirúrgicos. La PCA se realizó en menos de 20 min. Las ratas con operación simulada (Sham) fueron sometidas al mismo procedimiento (hasta el uso de los clips quirúrgicos) pero sin

cortar ningún vaso sanguíneo. Los animales mantuvieron en recuperación en jaulas con comida y agua *ad-libitum* (2-3 ratas en cada una).

La validación del modelo de hiperamonemia por una anastomosis porto-cava fue publicado por Vázquez et al. (2019) <sup>86</sup>

### *2.1.1 Animales experimentales*

Los experimentos se realizaron en ratas Wistar, macho, de aproximadamente 280 g (8 semanas de edad) al comienzo del experimento. Los animales se separaron y colocaron en jaulas individuales (17 x 41 x 20 cm) a temperatura ambiente (~ 22 ° C), y se mantuvieron en un ciclo de 12 h de luz: 12 h de oscuridad (luz encendida a las 08:00 h), comida y el acceso a agua *ad libitum*.

### *2.2 Evaluación de coordinación motora (Semana 3, 6 y 13 post-cirugía)*

#### *2.2.1 Rotarod*

Para evaluar la actividad del cerebelo se valoró la coordinación motora mediante la prueba de rodillo rotatorio “rotarod”. Las ratas experimentales (PCA:  $n = 8$ , Sham:  $n = 8$ ) cumplieron con un protocolo de habituación colocándolas en el cilindro a una velocidad constante de 10 rpm durante 60 s (4 ensayos por día/ 4 días). El protocolo de prueba consistió en colocar a las ratas en el cilindro, en aceleración (4 a 40 rpm), durante 60 s (4 ensayos por día/4 días). Rotarod serie 8, IITC Life Science Inc. 23924 Victory Blvd Woodland Hills, CA 91367.

El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de comparación múltiple utilizando la prueba Tukey (16 familias, 10 comparaciones por familia), con intervalos de confianza del 95%. Los resultados fueron analizados por Sigma Plot 10.0 y presentados como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio (SEM). Con un umbral de significancia establecida como  $P < 0.05$ .

### 2.2.2 Campo abierto

Las ratas experimentales fueron colocadas en el centro de una cámara de acrílico de ancho 42 cm x 42 cm de largo. Dividida por 16 x 16 haces de luz infrarroja que registro la actividad horizontal, actividad vertical y distancia total en 15 min. El sistema utiliza el software Fusion v5.3 SuperFlex Edition. Compañía: Omnitech Electronics, Inc. Columbus, Ohio, USA.

El análisis estadístico se realizó mediante una *prueba t Student*. Los resultados fueron analizados por Sigma Plot 10.0 y presentados como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio (SEM). Con un umbral de significancia establecida como  $P < 0.05$ .

### 2.3 Histología en cerebelos (13 semanas)

Se fijaron los cerebelos en PFA 4% durante 24 h y crio-protegieron en un tren de sacarosa 10 al 30 %. Posteriormente fueron embebidos en Tissue Teck ® Leica. El tejido se cortó en un criostato modelo 3050S Leica a 30  $\mu$ m de grosor. Fueron montados en portaobjetos electrocargados. Las laminillas fueron destinadas a las diferentes tinciones e inmunotinciones.

#### 2.3.1 Tinción Hematoxilina & Eosina (H&E)

Tejidos previamente perfundidos (PFA 4 %) y crio-protegidos (sacarosa 30%). El tejido fue deshidratado e incrustado en parafina. Se hicieron rebanadas a 6  $\mu$ m y se tiñeron de acuerdo con el protocolo H&E. Brevemente, se disolvió 1 g de hematoxilina en alcohol etílico al 95%, 20 g de sulfato de aluminio y potasio, y luego se hirvió. La hematoxilina es selectiva para material nuclear. La eosina se disolvió en alcohol etílico al 80% y 0.5 ml de ácido acético. La eosina es selectiva para el material citoplasmático. Los portaobjetos se sellaron con solución Entellan ® y se analizaron en un microscopio Olympus CX30. Las imágenes fueron evaluadas por un experto en patología.

##### 2.3.1.1 Cuantificación de densidad lineal de células de Purkinje

Las imágenes se adquirieron con Imagenscope Leica, Zoom óptico 8x. 10 imágenes representativas de cada folia de cada laminilla de cerebelos (Sham = 5; PCA= 5). Se cuantificaron los cuerpos celulares en 3 secciones estándares de 300  $\mu\text{m}$ , trazando una línea a mano alzada, evitando los surcos y giros, siguiendo lo reportado por Louis et al., 2013<sup>87</sup>. Los datos se representaron en densidad lineal (Células de Purkinje en 1 mm).

### *2.3.2 Tinción de PAS*

Los tejidos previamente fijados, se crio-protegieron en sacarosa al 30%. Posteriormente fueron embebidos en Tissue Teck ® Leica. El tejido se cortó en un criostato modelo 3050S Leica a 7  $\mu\text{m}$  de grosor. Los tejidos se hidrataron en un tren de alcoholes en concentración decreciente, y se incubaron en ácido periódico al 0.5%, y posteriormente con el reactivo de Shiff por 30 min a 60° C en oscuridad. Además, se realizó una contra-tinción del tejido con hematoxilina de Harris, después se deshidrataron para su montaje con Entellan ®, para su posterior observación y análisis.

### *2. 4 Inmunofluorescencia*

En secciones sagitales de 30  $\mu\text{m}$ , se hicieron 3 lavados de 10 min con PBS 1x, pH 7.4. Se bloquearon con solución de bloqueo (PBS1x, 0.3 % de Tritón 100x, 5 % de Suero Normal de Cabra). Se inmuno-tiño contra el marcador de glía anti GFAP (Rabbit 1:1,000; Adcam, ab7260). Núcleos neuronales, anti NeuN (Rabbit 1:1000, Adcam; ab177487). Microglía, anti IBA-1 (Rabbit 1:1000, Adcam; ab 5076). Incubaciones overnight. Se lavaron las laminillas con PBS 3 veces 5 minutos y se revelaron por fluorescencia con anti Alexa 488 (Rabbit). Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio en una dilución 1:1000 + RNasa A 1:1000 durante 15 min. El montaje se realizó con la solución vectashield (10  $\mu\text{l}$ /laminilla). La evaluación de la neuroinflamación y edema cerebral se realizó mediante técnicas de inmunofluorescencia. En secciones sagitales de 30  $\mu\text{m}$ , se hizo una incubación previa de 30

min (metanol, peróxido de hidrogeno 0.3%). Después se hicieron 3 lavados de 10 min con PBS 1x, pH 7.4. Se bloquearon con solución de permeabilización/bloqueo (PBS1x, 0.2 % de Tritón 100x, 5 % de Suero Normal de Cabra). Incubación overnight contra inflammasoma anti NLRP3 (Rabbit 1:50; NOVUS, NBP1-77080). Canal de agua anti-AQP4 (Rabbit 1:200; Alomone Labs, 249-323). Metabolismo del amonio anti-GS (Mouse1:300; Milipore, MAB302). Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio en una dilución 1:1000 + RNasa A 1:1000 durante 15 min. El montaje se realizó con la solución vectashield 10 µl por tejido.

Los análisis de densidad de fluorescencia se hicieron por imagen y en ROI (100 µm\* 100 µm) 6 por sección de interés por cada marcador. Los datos se representan en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

Se tomaron 10 imágenes representativas por laminillas. TileScan 2\*2 en objetivos 10x, 25 x, 40x, 63. Los Z-stack se hicieron de 5 µm aproximadamente 50 cortes ópticos. Composiciones 3D y proyecciones en Z-stack mediante el software ZEN 2.6 (Black edition). Todas las imágenes fueron tomadas microscopia confocal Zeiss LSM 780 DUO; en GFP ( $\lambda= 488$ ) y RGP ( $\lambda= 561$ ).

### 2.5 Análisis estadísticos

La cuantificación de fluorescencia se realizó mediante el software Image J versión fiji. Los datos se analizaron mediante una *prueba t de Student*.y presentados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Se consideró el resultado estadísticamente significativo con un umbral de significancia establecido en  $P<0.05$ .

Software: los análisis estadísticos se realizarán con GraphPad Prism 5; los gráficos se realizaróncon SigmaPlot 5.0 y 10.0 para Windows.

### 3. RESULTADOS

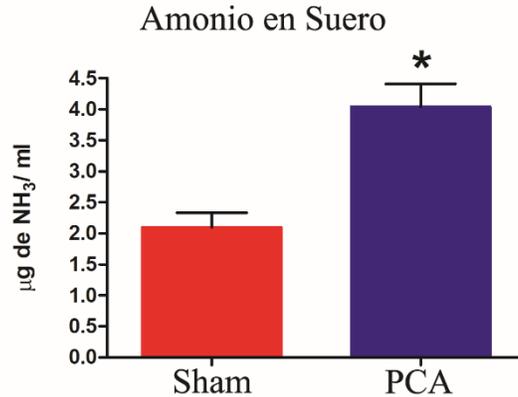
#### 3.1 validación del modelo de encefalopatía hepática

Ratas con una anastomosis porto-cava experimental a las 13 semanas post cirugía, muestran una disminución de un 24%, del peso total en los animales, así como, una disminución del 53% en el peso del hígado; la correlación del peso del hígado/peso corporal muestra una reducción de hasta 37% respecto a las ratas sham (*Tabla 2*). La medición en los niveles de amonio en suero mostró un incremento del 90% en ratas PCA con respecto al control (*figura 7*). Estos datos permiten validar el modelo de anastomosis porto-cava que conlleva a una lesión en hígado asociado al incremento de amonio sistémico

**Tabla 2.** Parámetros morfométricos en ratas PCA

Peso corporal- hígado en ratas PCA 13 semanas post cirugía. La significancia estadística fue calculada mediante la *prueba t*, se representa con (\*);  $P < 0.005$ . (Tabla tomada y modificada de Vázquez et al., 2019)

	<i>SHAM</i>		<i>PCA</i>	
	Promedio	SEM	Promedio	SEM
<i>Peso corporal (g)</i>	444.0	15.0	335.6 *	16.0
<i>Peso hígado (g)</i>	15.5	0.7	7.3 *	0.4
<i>PH/PC x 100</i>	3.4	0.17	2.2 *	0.11



**Figura 7.** Niveles de amonio en suero, ratas PCA 13 semanas post cirugía. *Prueba t* [P <0.005]

### 3.2 Caracterización histológica de la degeneración cerebelar en ratas hiperamonémicas

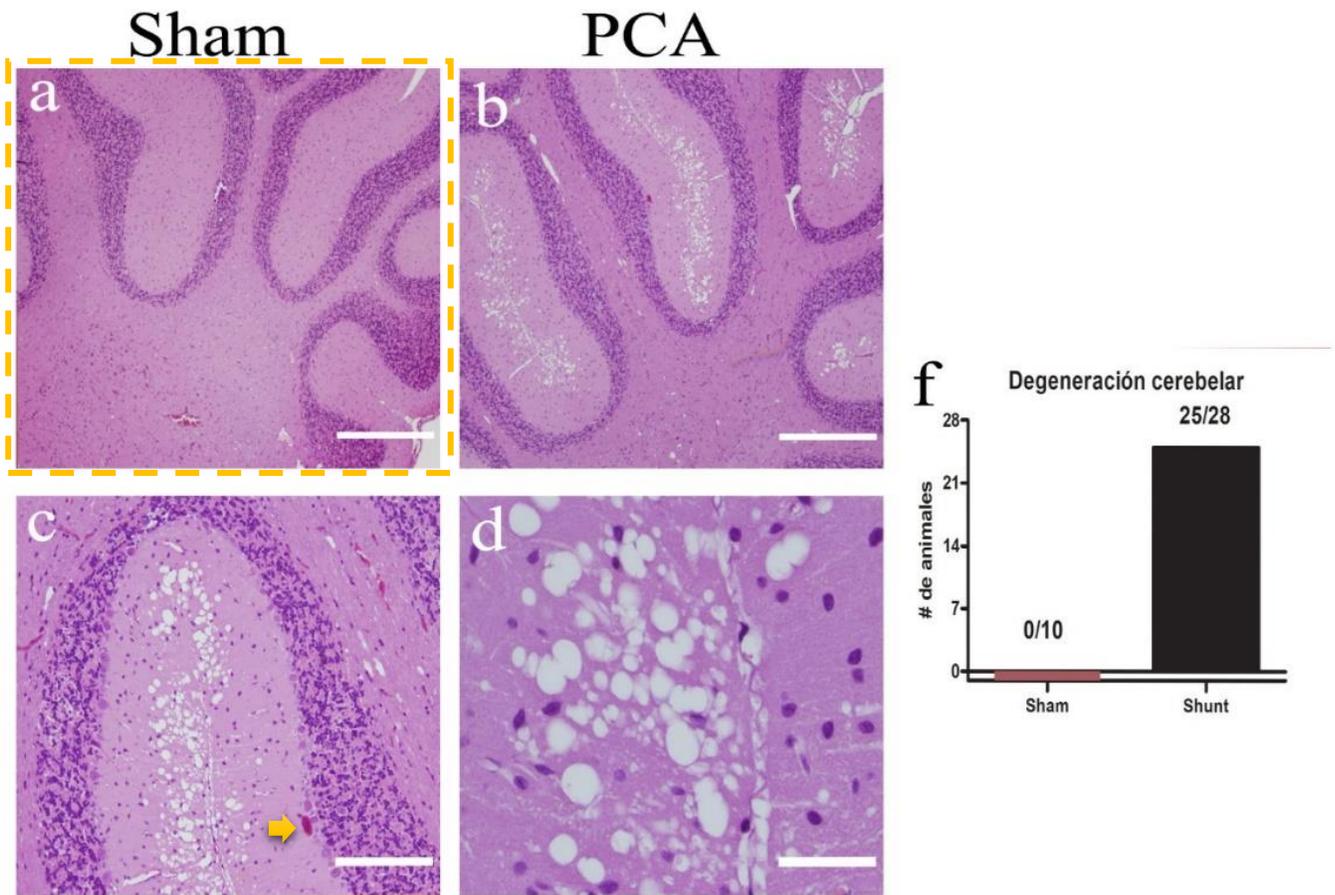
En estadios crónicos las ratas experimentales mostraron una degeneración “vacuolar” en la corteza del cerebelo, específicamente en la capa molecular (figura 8, panel a y b), se observó una degeneración vacuolar denominada por patólogos expertos, similar a una “encefalopatía espongiiforme” (enfermedades asociadas a priones) (figura 8, panel c y d). La alteración se observó en al menos 25 de 28 cerebelos observados (figura 8, panel f).

Las alteraciones vacuolares sólo se observaron en cerebelo, aunque en el resto del cerebro también se detectó edema citotóxico en astrocitos con nucleomegalia (figura 9, panel c y d). En un 50 % de las lamillas con H & E, se observó el cambio de fenotipo en astrocitos a unos “astrocitos tipos Alzheimer II”, característicos por su aspecto pálido y vesiculoso con su núcleo dispuesto hacia la periferia (figura 9, panel f).

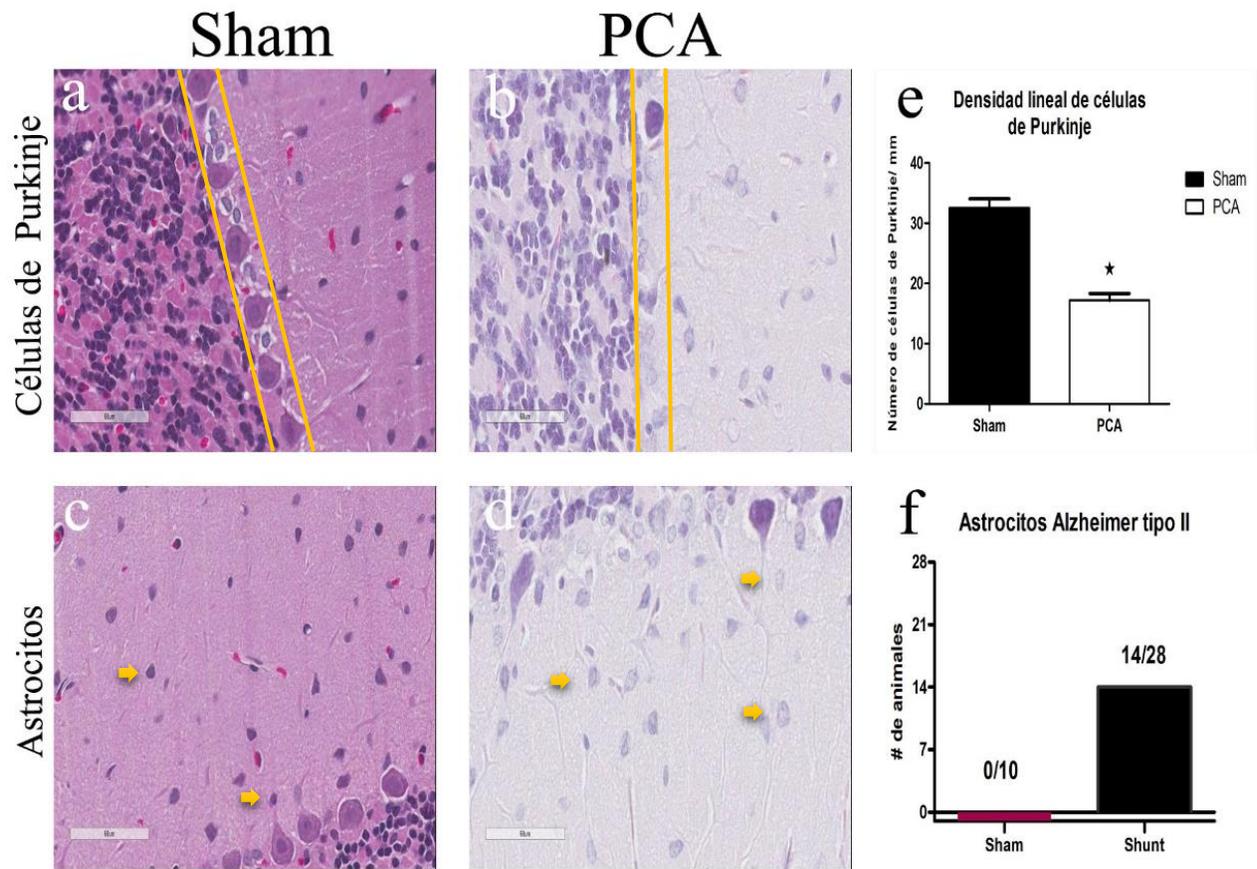
En ratas PCA se observó un tipo de daño característico de una “encefalopatía espongiiforme” dónde además de las vacuolas, se observó una “estructura irregular” globular amorfa de aspecto proteico similar a una “placa kuru” (amiloide) asociada a encefalopatologías espongiiformes; la recomendación por patólogos para descartar un posible amiloide fue el de

realizar una tinción de PAS- reactivo de schiff, positivo por su colocación púrpura-roja debido a la oxidación de grupos aldehídos. La tinción de PAS en laminillas de ratas PCA fue un PAS 100 % positivo, las observaciones realizadas en laminillas, ubicaron a estos amiloides en sustancia blanca y en la corteza del cerebelo (figura 10;  $n= 5$ ).

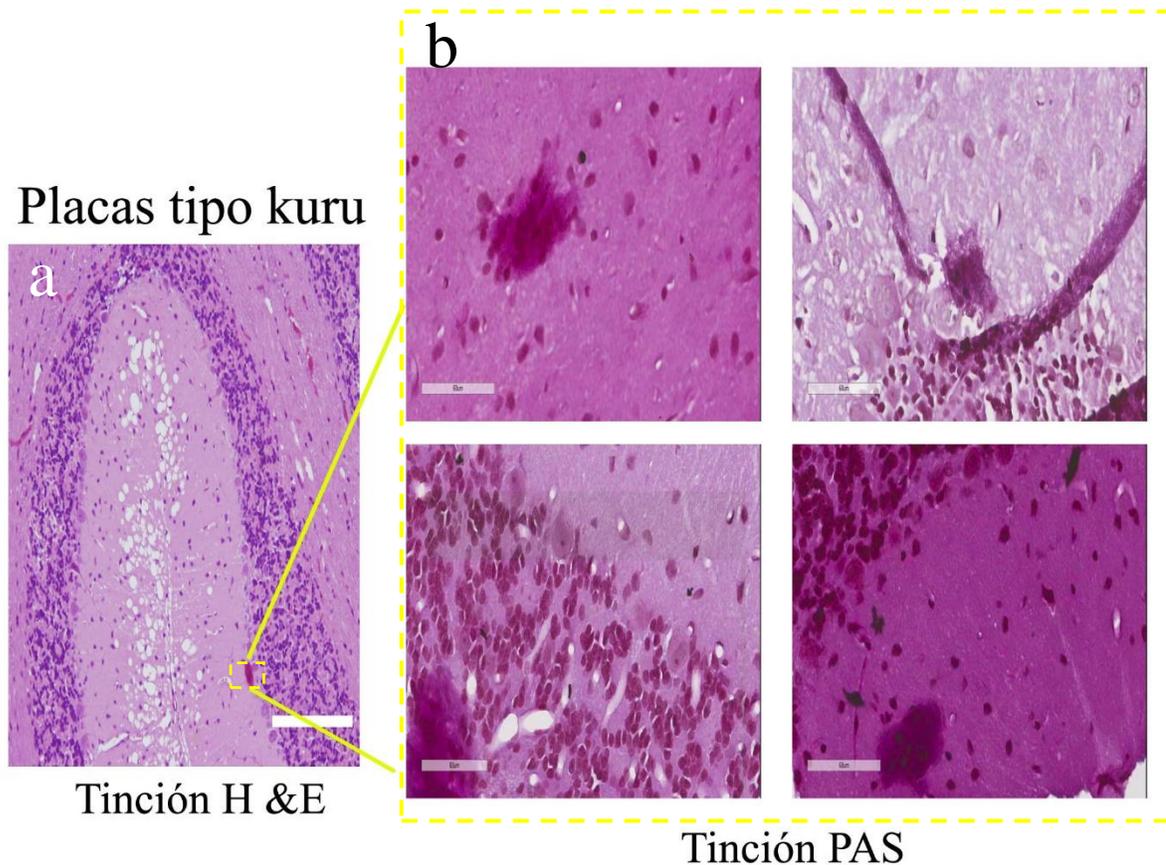
Además, la cuantificación de densidad lineal en la capa Purkinje mostró una disminución significativa de neuronas Purkinje fue de un 46% ( $P < 0.005$ ) con respecto al control, asimismo, se logró observar un daño en el citoplasma (figura 9, panel a y b)



**Figura 8.** Degeneración en cerebelo, ratas PCA 13 semanas post cirugía. Tinción de Hematoxilina & Eosina (H&E). Panel a) corte sagital de cerebelo de una rata sham, objetivo 10x. b) corte sagital de una rata PCA, objetivo 10x. c) vacuolas en la capa molecular de una rata PCA, la flecha indica “placa kuru”, objetivo 25x. d) imagen representativa del daño en la capa molecular de una rata PCA, objetivo 40 x. f) cuantificación de la presencia del daño en cerebelos de ratas PCA. Escala (barra= 100  $\mu$ m).



**Figura 9.** Pérdida de neuronas Purkinje y edema citotóxico en cerebelo, ratas PCA 13 semanas post cirugía. Panel a) sección de un corte sagital de cerebelo de una rata sham, representación de la capa Purkinje. b) sección de un corte sagital de una rata PCA. (Barras paralelas representan la capa Purkinje). c) Representación de astrocytos en una rata sham (flechas). d) Representación de astrocytos Alzheimer tipo II en una rata PCA (flechas). e) y f) cuantificación de densidad lineal de neuronas Purkinje y presencia de astrocytos Alzheimer tipo II. Significancia representada (\*), *prueba t*;  $P < 0.005$  Tinción H & E. Zoom óptico de 8x, escala (barra= 60  $\mu$ m).



**Figura 10.** Histología de la placa kuru (amiloide). Corte sagital del cerebelo de ratas PCA 13 semanas post cirugía. Panel a) Sección de un corte sagital de cerebelo de una rata PCA, objetivo 25 x, cuadro punteado representa la placa kuru con una tinción H&E. b) Tinción PAS en laminillas de ratas PCA, se observa el PAS positivo en las placas “kuru” (posible amiloide). Zoom óptico de 8x, escala (barra= 60  $\mu$ m;  $n= 5$ ).

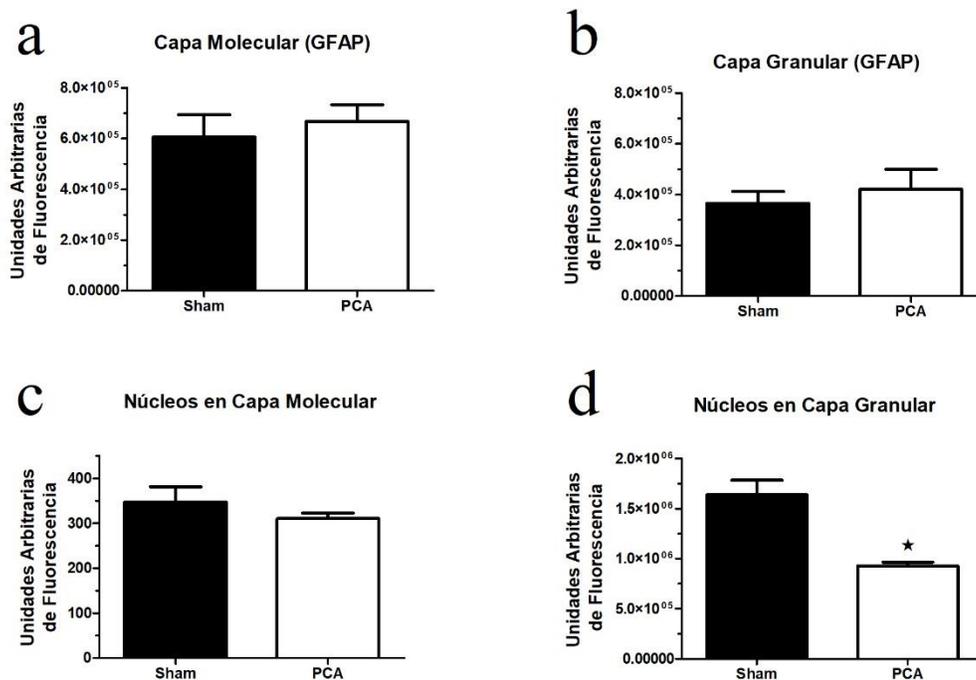
### 3.3 Caracterización de la celularidad por Inmunofluorescencia

#### 3.3.1 Inmuno marcaje en glía (GFAP) y núcleos en capa molecular y granular del cerebelo

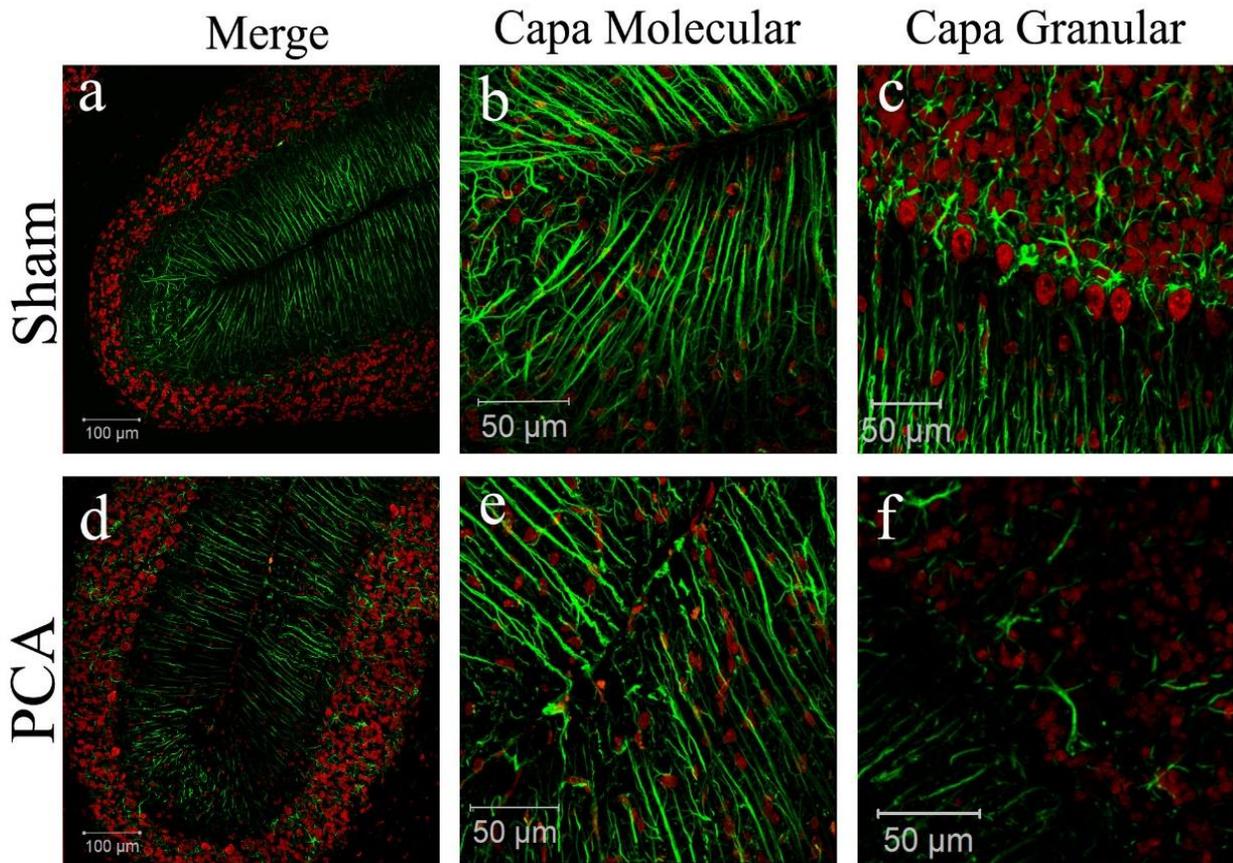
En cortes de cerebelo de ratas PCA a las 13 semanas, inmuno marcados con la Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), específico de glía (astrocitos) no se observó una gliosis marcada (Figura 11, panel a y b) por la expresión del marcador GFAP tanto en capa molecular y granular. Sin embargo, si se observó un desarreglo en los procesos de la glía de Bergman (Figura 12, panel a y d) además del hinchamiento de los pies perivascuales de los astrocitos que están en contacto con las células endimarias en la capa molecular del cerebelo (Figura

12, panel b y e). Sin embargo, el nivel de inmunoreactividad de GFAP fue similar entre las ratas sham y PCA (Figura 12, panel c y f).

En contraste con los datos anteriores, con el marcaje de los núcleos (rojo- yoduro de propidio) si se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) 47 % en la expresión de núcleos de la capa granular con respecto al control (Figura 11, panel d). Asimismo, la cuantificación de los núcleos en la capa molecular no mostró cambios significativos entre las ratas sham y PCA (Figura 11, panel c).



**Figura 11.** Densidad de fluorescencia en GFAP y núcleos de la capa molecular y granular en cerebelo de ratas PCA a las 13 semanas post cirugía. Cuantificación de densidad de fluorescencia en GFAP. Panel a) capa molecular. b) capa granular. Cuantificación de densidad de fluorescencia en núcleos marcados con Yoduro de propidio. c) capa molecular. d) capa granular. Significancia representada (\*), (*prueba t*, valor de  $P < 0.005$ ).

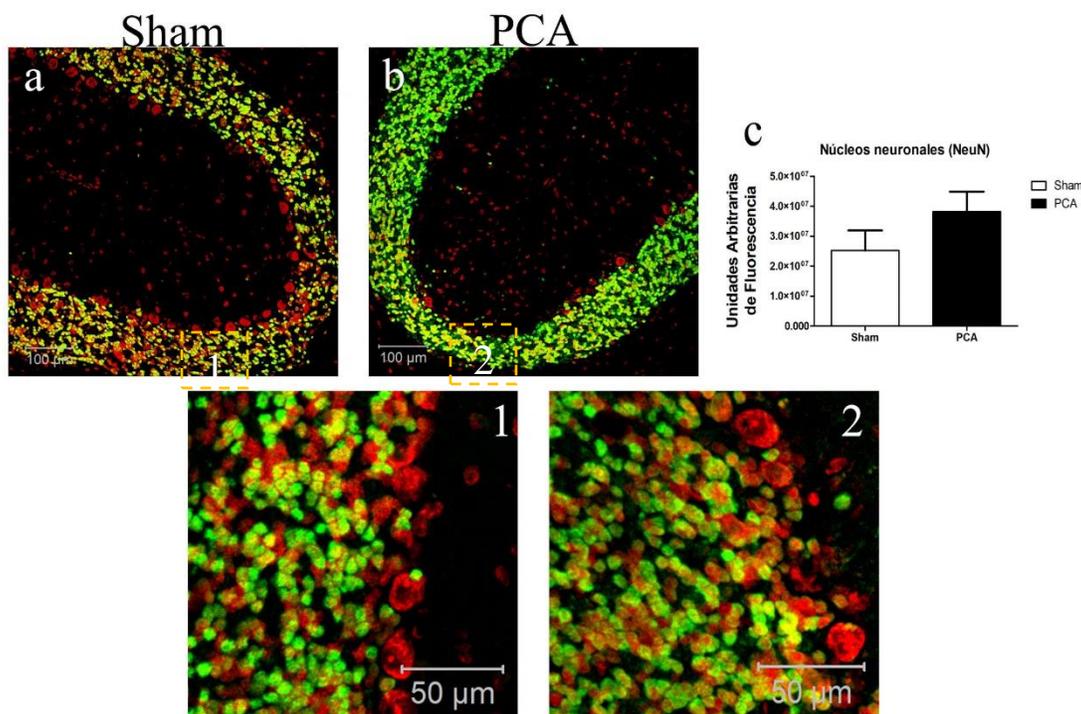


**Figura 12.** Inmunofluorescencia en GFAP y núcleos de la capa molecular y granular en cerebelo de ratas PCA a las 13 semanas post cirugía. Cuantificación de densidad de fluorescencia en GFAP. Panel a) capa molecular. b) capa granular. Cuantificación de densidad de fluorescencia en núcleos marcados con Yoduro de propidio. c) capa molecular. d) capa granular. En verde GFAP, rojo- Yoduro de propidio núcleos. (a y d) Tilescan 2 \* 2 tomada en confocal, objetivo 25x. (b-f) proyección en Z- stack de 5 µm en cortes de cerebelo, objetivo 25x. Significancia representada (\*), prueba t, valor de  $P < 0.005$ .

### 3.3.2 Células de la capa granular marcadas con NeuN

Continuando con la evaluación de la celularidad de la capa granular, se implementó un inmuno marcaje con el marcador de Núcleos neuronales (NeuN), específico de células de la granulosa.

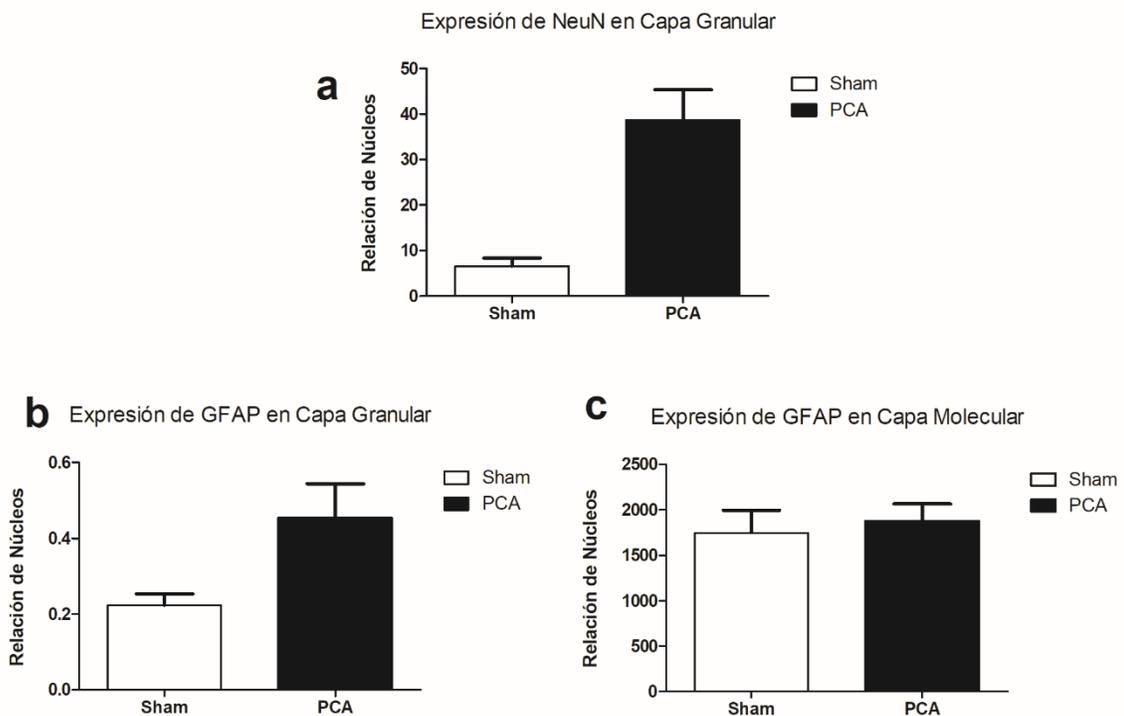
Los datos mostraron que existe una ligera tendencia a sobre expresar el marcador neuronal en la capa granular (Figura 13, panel a.1 y b.2); sin embargo, no fue significativa (n=6) con respecto al control (Figura 13, panel c)



**Figura 13.** Densidad de fluorescencia en NeuN en capa granular en cerebelo ratas PCA a las 13 semanas post cirugía. Panel a) Marcador NeuN en un lóbulo de una rata sham; 1) Acercamiento (crop 1.8) de la capa molecular en ratas sham. b) Marcador NeuN en un lóbulo de una rata PCA; 2) Acercamiento (crop 1.8) de la capa molecular en ratas PCA. c) cuantificación de densidad de florescencia de NeuN. En verde NeuN; rojo- Yoduro de propidio núcleos (a y d) Tilescan 2 \* 2 tomada en confocal, objetivo 25x. (b-f) proyección en Z-,stack de 5 µm en cortes de cerebelo, objetivo 25x.

Por otra parte, se realizó una normalización de la cuantificación de inmunoreactividad de los marcadores a GFAP y NeuN contra la expresión y cuantificación de los núcleos en la capa molecular y granular (Figura 14). Se observó un incremento del 70% del marcador NeuN que coincidió con la disminución de los núcleos de la capa molecular. Este dato se representa en la Figura 13, panel a. Con respecto a la expresión del marcador GFAP, se observó un

incremento del 45% con respecto al marcaje de núcleos en la capa granular de las ratas sham, este dato se correlaciona con una marcada disminución de los núcleos en la capa granular (Figura 14, panel b). En cuanto a los marcajes en la capa molecular, no se observó algún cambio significativo en las cuantificaciones individuales, ni en relación con los núcleos cuantificados en esa zona (Figura 14, panel c)

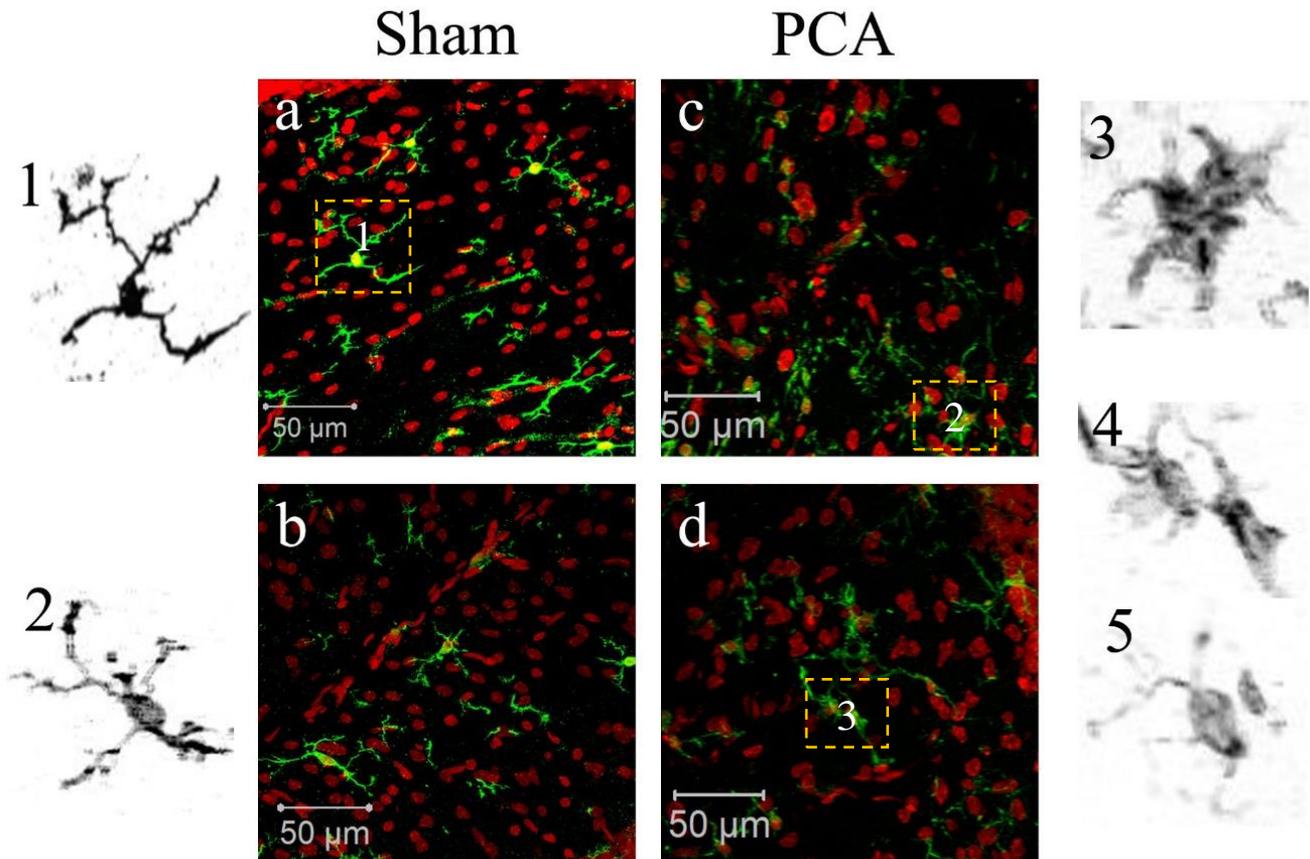


**Figura 14.** Normalización en la expresión de NeuN y GFAP contra los núcleos cada capa molecular y granular en laminillas de cerebelo de ratas a las 13 semanas post cirugía. Panel a) Relación de NeuN contra los núcleos de la capa granular. b) Relación de GFAP contra los núcleos de la capa granular. c) Relación en la expresión de GFAP contra los núcleos molecular. d) capa granular. % SEM obtenido de la relación promedio de los datos cada de los marcadores.

### 3.3.3 Estado reactivo de la microglía (IBA-1) en ratas PCA

Continuando con la caracterización del daño cerebelar, se evaluó el estado de activación de la microglía de tal forma que se inyectaron marcadores en cortes de cerebelo contra la *molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1* por sus siglas en inglés (IBA-1), la cual es una molécula específica de microglía.

Se seleccionaron imágenes representativas de 8 animales sham y PCA para evaluar el estado de la microglía, células de sistema inmune innato en cerebro. En cortes control se observó IBA-1 positivo en células de microglia en estado de reposo, es decir, sus procesos se observan alargados (Figura 15, panel a y b); en contraste con las ratas PCA las cuales muestran una morfología característica del estado reactivo, es decir, se observaron las retracciones de los procesos además de una posible migración de la microglia y comunicación a través de las capas de la corteza de cerebelo (Figura 15, panel c y d). Asimismo, se observaron más células reactivas en secciones de cerebelos PCA.

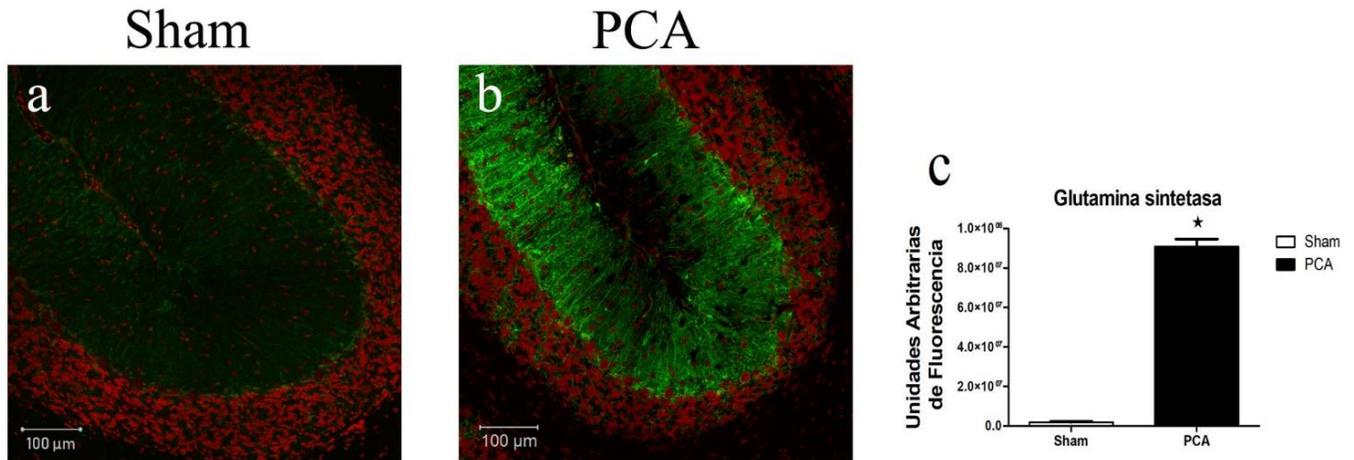


**Figura 15.** Cortes sagitales de la corteza del cerebelo de ratas PCA 13 semanas post cirugía con un marcador de microglia IBA-1. Panel a) Células IBA-1 positivo; microglía en reposo. b) Células IBA-1 positivo, microglía ameboida. (n= 7). En verde IBA-1 marcador de microglia. En rojo yoduro de propidio, marcador de núcleos. Imágenes vistas por microscopia confocal, proyección en Z, stack de 5  $\mu\text{m}$  en cortes de cerebelo, objetivo 25x.

### 3.3.4 Glutamino sintetasa en ratas PCA

Además de la evaluación de los posibles mecanismos responsables de la degeneración cerebelar; se determinó la actividad metabólica del manejo del amonio cerebelar mediante el inmuno marcaje contra la enzima glutamina sintetasa (GS), en cortes de cerebelo de ratas PCA, 13 semanas postcirugía.

La cuantificación de densidad de fluorescencia indicó un incremento significativo del 97 % ( $P < 0.001$ ) (Figura 16, panel c) con respecto al control, en la expresión de la GS (Figura 16, panel a y b), positiva para astrocitos (en cerebro de rata).



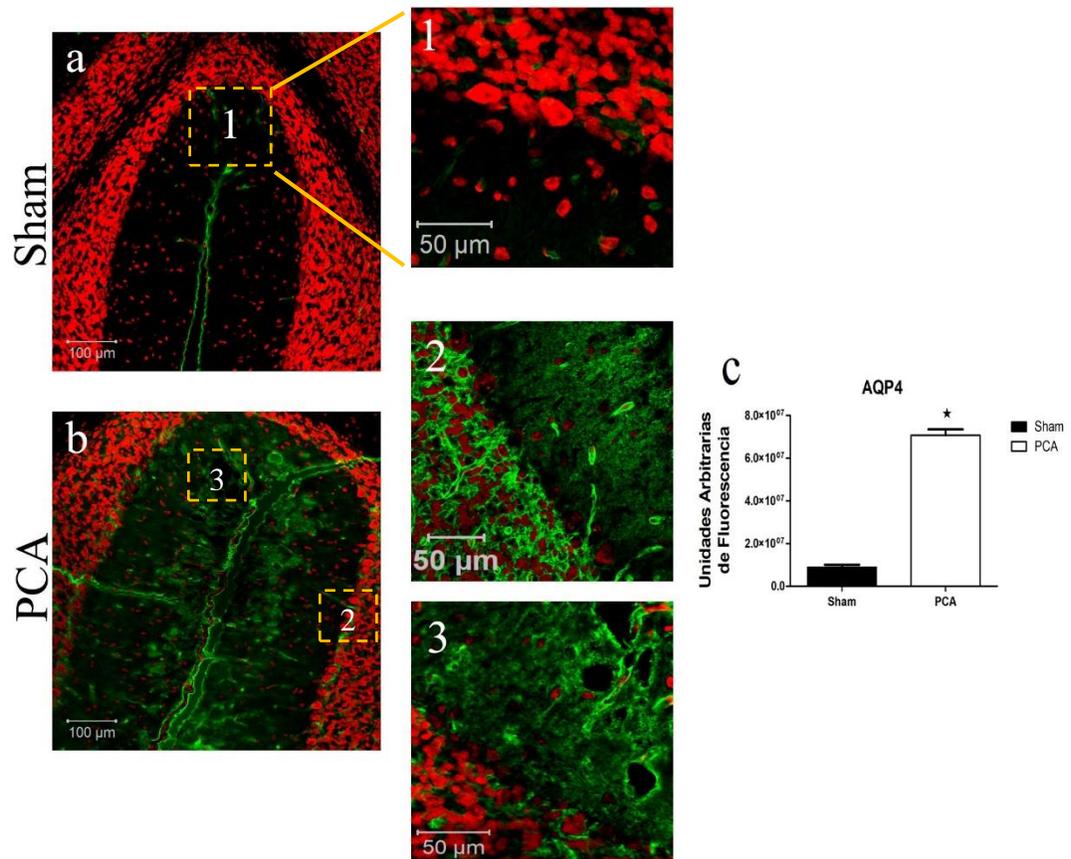
**Figure 16.** Inmunoreactividad contra GS en secciones sagitales un lóbulo del cerebelo a las 13 semanas post cirugía Panel a) GS positivo en un lóbulo de una rata sham. b) GS positivo en un lóbulo de ratas PCA. c) cuantificación de densidad de fluorescencia del marcado GS en animales experimentales. Significancia representada (\*), *prueba t*, valor de  $P < 0.005$ . En verde GS marcador de la enzima glutamina sintetasa. En rojo yoduro de propidio, marcador de núcleos. Tilescan 2 \* 2, microscopia confocal, objetivo 25x.

### 3.3.5 Aquaporina IV en ratas PCA

Por otro lado, los previos resultados obtenidos de la inmunofluorescencia contra GFAP y las evaluaciones histopatológicas nos dieron pauta a preguntarnos si las vacuolas observadas en el cerebelo pudieran asociarse a “edema cerebral” del tipo vasogénico y si además se lográbamos identificar en nuestro modelo el edemacitotóxico ya reportado. De tal forma, se buscó explorar el papel citotóxico del amonio con relación al equilibrio hídrico en la corteza del cerebelo mediante el inmuno marcaje para el canal de agua IV (aquaporina IV)

Los datos obtenidos mediante la cuantificación de AQP4 resultó que, en ratas con hiperamonemia, con 13 semanas de PCA, se incrementa significativamente ( $p < 0.005$ ) en un

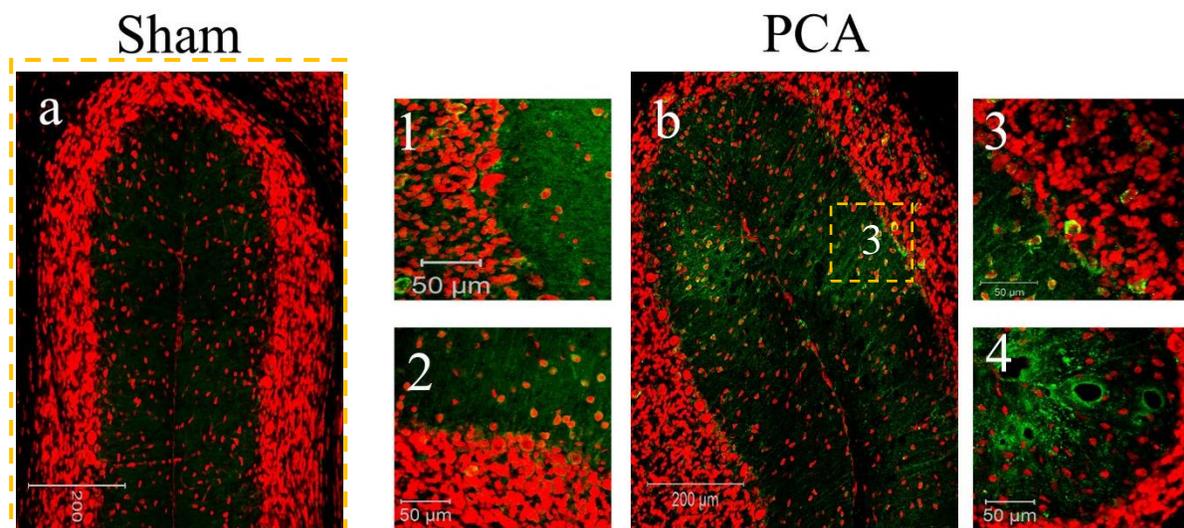
80 % la expresión de AQP4 con respecto a las ratas controles (Figura 17, panel c). Las imágenes obtenidas nos permiten visualizar la inmunoreactividad de AQP-IV en las capas del cerebelo observa posible internalización de agua del medio extracelular mediante células endoteliales (Figura 17, panel b1, b2)



**Figura 17.** Inmunoreactividad de AQP-IV en cerebelo ratas PCA a las 13 semanas post cirugía. Panel a) Marcador AQP-IV en un lóbulo de una rata sham; 1) Acercamiento (crop 1.8) de la capa molecular, granular y Purkinje. b) Marcador AQP IV en un lóbulo de una rata PCA; 2) Capa molecular (crop 1.8, proyección en Z stack). 3) Capa molecular, enfoque en las células endoteliales (crop 1.8). c) cuantificación de densidad de fluorescencia AQP4. Significancia representada (\*), *prueba t*, valor de  $P < 0.005$ . En verde AQP4; rojo- Yoduro de propidio núcleos (a y b) Tilesca 2 \* 2 tomada en confocal, objetivo 25x. (Proyección en Z-stack de 5  $\mu$ m)

### 3.3.6 Inflamasoma (NLRP3) en cerebelo de ratas con PCA NLRP3

La evidente respuesta diferencial del cuerpo de inflamación, NLRP3, en ratas controles (Figura 11, panel a) y ratas con ácido kaínico (datos no mostrados) hacen inferir la activación del inflamasoma en el cerebelo de ratas PCA con hiperamonemia, es decir, en cada capa del cerebelo, así como en sustancia blanca (Figura 18, panel b1, b2). Se identificó un cuerpo de inflamación de una morfología diferente al resto de la densidad celular. Este cuerpo se identificó con mayor frecuencia en capa molecular y granular con un estrecho contacto a la capa Purkinje del cerebelo (Figura 18, panel b4, b3). En el panel b2 se observa, además, que ciertas células, muy probablemente, astrocitos y/o microglía muestran una expresión, NLRP3, notoria en la periferia de su citoplasma; esta observación se sustenta con las imágenes del panel b3, b4 (cercanas a la lesión vacuolar y la capa Purkinje).



**Figura 18.** Inmunoreactividad de NLRP3 en cerebelo ratas PCA a las 13 semanas post cirugía. Panel a) Marcador NLRP3 en un lóbulo de una rata sham; b) Inmunoreactividad de NLRP3 en un lóbulo de una rata PCA. 1) iInflamasomas en la capa granular (crop 1.8). 2) Inmunoreactividad en la periferia de células residentes de capa molecular (crop 1.8). 3) Capa granular, inflammasoma (crop 1.8). 4) Inmunoreactividad de NLRP3 en el daño vacuolar del cerebelo. En verde NLRP3; rojo- Yoduro de propidio núcleos. Tilescan 2 \* 2 tomada en confocal, objetivo 25x.

### *3.4 Evaluación de la función motora*

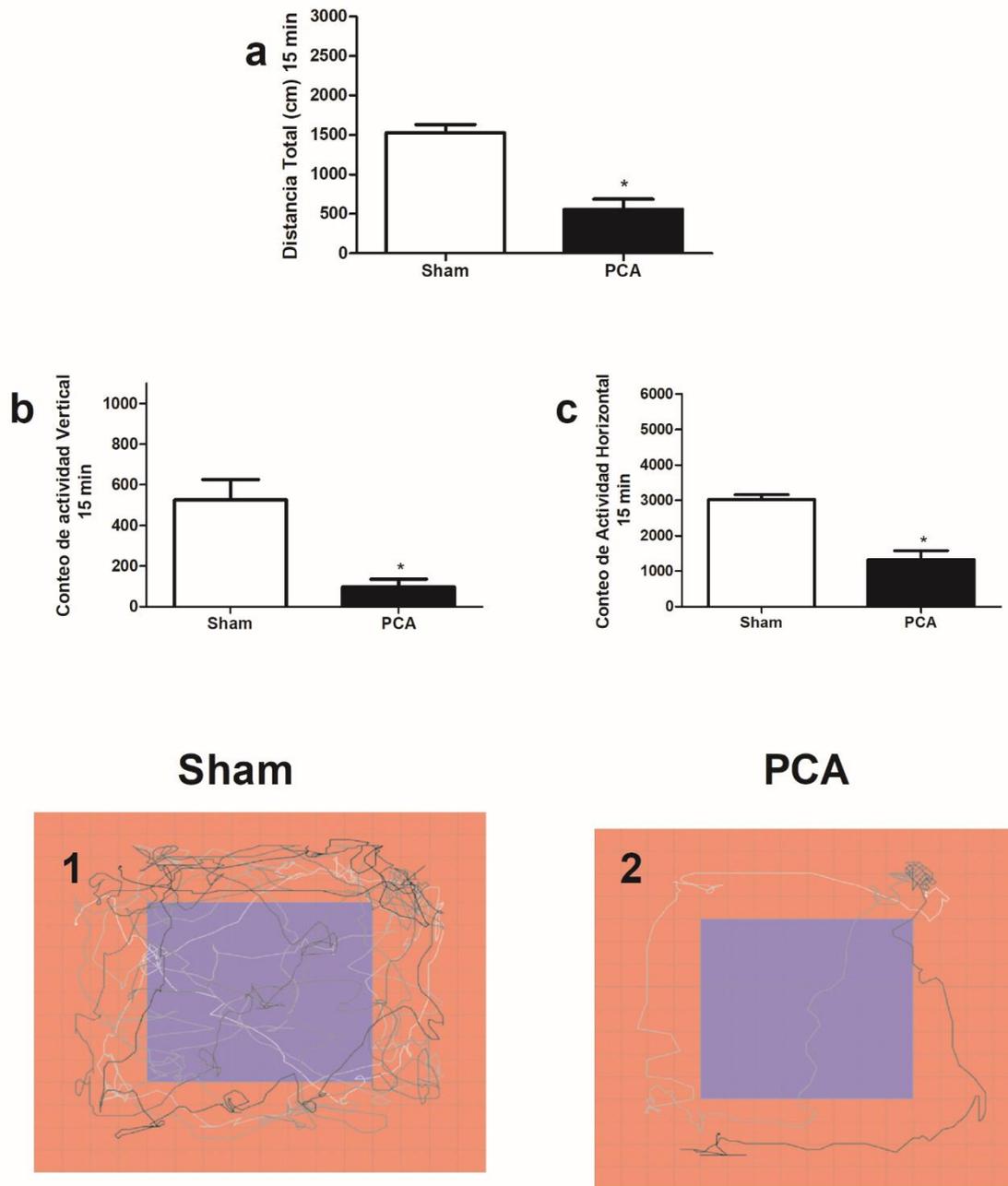
Una de las principales funciones que se le atribuyen al cerebelo es la del control del equilibrio corporal, tono muscular, y la planeación e iniciación de movimientos discretos en las extremidades. Por tal motivo las lesiones al cerebelo se relacionan con la ejecución de movimientos precisos y coordinación motora <sup>88</sup>.

#### *3.4.1 campo abierto*

El sistema de campo abierto consiste en un área cuadrada, limitada por paredes, y dividida virtualmente en cuadrantes. El sistema registra la actividad horizontal, la actividad vertical, la distancia total recorrida, entre otras variables. Esta prueba permite evaluar la actividad locomotora y la conducta exploratoria. Evalúa la función de estructuras cerebrales que participan en la conducta motora.

Los parámetros cuantificados para la evaluación de la función motora fueron: actividad vertical, horizontal y distancia total en un registro de 15 min.

El conteo de actividad vertical, horizontal y distancia total fueron significativamente menores de 80 y 50 % respectivamente en ratas PCA con respecto su control ( $P < 0.001$ ) (Figura 12, panel b y c). En el panel panel a1 vs b2 se representa la diferencia en la conducta motora (distancia total recorrida) entre animales experimentales se observó una disminución del 67% con respecto al control.



**Figura 19.** Función motora “campo abierto” PCA a las 13 semanas post cirugía. Panel a) Distancia total recorrida en 15 min. b) Conteo de actividad vertical. c) conteo de actividad horizontal. 1) Esquema de la actividad motora en ratas sham. 2) Esquema de la actividad motora en ratas PCA. Significancia representada (\*), prueba *t*, valor de  $P < 0.005$ .

### 3.4.2 La pérdida de la coordinación motora ocurre de manera progresiva en un modelo de PCA

La prueba de rotarod es utilizada ampliamente para evaluar la coordinación motora es, además, especialmente sensible en la detección de disfunciones en cerebelo <sup>89</sup>. En general, la prueba de rotarod nos ayudó a descartar alguna posible lesión en ratas sham (Figura 20, círculos en gris) adicionando ratas control (las cuales no sufrieron algún procedimiento quirúrgico; Figura 20, círculos negros) en donde se muestra hubo una mejora en su desempeño a lo largo de la prueba, tal y como se esperaba.

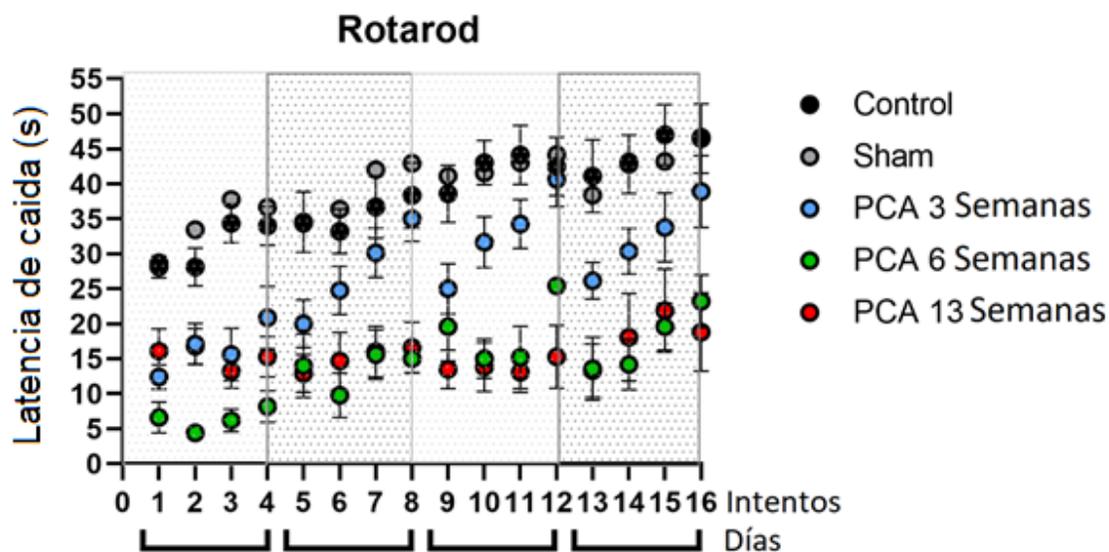
A las 3 semanas post cirugía (Figura 20, círculos azules): Existe una diferencia significativa (\*\*\*\*;  $P < 0.001$ ) entre el primer día (primer intento) y el último intento donde los animales PCA mejoran su rendimiento en la prueba manteniendo casi 60 segundos sobre el rodillo en aceleración. Entre grupos de 3 semanas vs 6 semanas se empieza a mostrar una diferencia significativa (\*\*;  $P < 0.005$ ) en el 8vo intento (2do día) este fenómeno se repite cuando se compara con las ratas a las 13 semanas (\*;  $P < 0.005$ ).

A las 6 semanas post cirugía (Figura 20, círculos verdes): Las ratas PCA muestran una reducción significativa (\*\*\*;  $P < 0.005$ ) en el desempeño motor con respecto a los controles, además se muestra que con cada intento los animales no mejoran en la En contraste, los cambios más significativos se muestran al comparar el desempeño de la prueba de ratas PCA 3 semanas (intentos 12- 14;\*;  $P < 0.005$ ) contra el desempeño de las ratas PCA 6 semanas. La comparación entre el desempeño de ratas PCA 6 y 13 no mostro diferencias significativas.

A las 13 semanas (círculos rojos): Las diferencias en el desempeño motor se acentúan conforme al desarrollo de la prueba, es decir, al hacer una comparativa contra los controles

se muestra que a las 13 semanas las ratas PCA no mejoran la prueba conforme a los días y además estas caen del rodillo en los primeros 15 segundos (16 intentos; \*\*,  $P < 0.005$ ).

De la misma manera al comparar el desempeño de ratas con 6 y 13 semanas post cirugía, no se observó alguna mejoría del desempeño de misma. En contraste y de manera relevante, al comparar el desempeño de las 13 semanas vs 3 semanas (8vo intento, 2do día) se observa la diferencia significativa (\*\*;  $P < 0.005$ ) en la ejecución motora, es decir, el patrón de desempeño en ratas a las 3 semanas postcirugía no se repite en ratas con 6 y 13 semanas post cirugía; este dato nos hace inferir durante el curso temporal de la cirugía las ratas PCA disminuyen el desempeño en la ejecución del Rotarod.



**Figura 20.** Coordinación motora “Rotarod”. Esquema representativo del desempeño temporal en la coordinación motora en ratas 3 semanas (círculos azules), 6 semanas (círculos verdes), 13 semanas (círculos rojos) vs controles (ratas sanas) y Sham (cirugía placebo).

## 4. DISCUSIÓN

Nuestro estudio tiene tres hallazgos principales. El primero, la respuesta diferencial entre poblaciones de las células de la gliales se asocian al incremento de amonio y a la participación del inflammasoma NLRP3, y en la pérdida de células de Purkinje en la corteza del cerebelo de ratas PCA. En segundo lugar, existe un incremento gradual en la gravedad de la pérdida de la coordinación y conducta motora. Tercer lugar, nuestros datos sugieren fuertemente la formación de placas oligoméricas (PAS positivo) similares a las Kuru de la enfermedad “encefalopatía espongiiforme”.

### *4.1 Sobre la respuesta diferencial de la glía de Bergman y la posible modulación en la pérdida de neuronas Purkinje en ratas PCA*

Con el uso de técnicas histológicas e inmunofluorescentes, se demostró existe un cambio cualitativo en los procesos de la glía de Bergman, es decir, se observa un desarreglo en los procesos de la glía (GFAP positivo) además de un hinchamiento en los pies perivasculares. Estos datos podrían sugerir que el incremento de amonio conlleva al desequilibrio hídrico en astrocitos y en la formación del edema cerebral<sup>75</sup>, nuestras observaciones se fortalecen con la pérdida de la inmuno reactividad del marcador GFAP y el incremento del canal de agua (AQP-IV). Otros grupos de investigación han reportado ya la respuesta diferencial entre la glía de Bergman y otros astrocitos donde hay una respuesta diferencial en modelos de ratas PCA con 4 semanas post cirugía<sup>62,90,91</sup>. Sin embargo, estas observaciones ya reportadas mencionan la respuesta diferencial está acompañada de una gliosis marcada (incremento en la expresión de GFAP), contrario a lo observado en nuestro modelo en ratas con 13 semanas post cirugía donde ni en la histología ni en la inmunofluorescencia, contra GFAP, se observó gliosis.

Suarez et al. (1992) reportó que el incremento en la inmunoreactividad de la glía de Bergman (GFAP positivo) se debe a las alteraciones sinápticas, principalmente, la glutamatérgicas <sup>91</sup>. En contraste, con algunos hallazgos en tejidos post mortem (EH mínima ) con inmunomarcajes en glía de Bergman (GFAP) <sup>92</sup> donde no se observa una gliosis pero si es evidente la pérdida de células Purkinje<sup>33</sup>, es decir, en modelos de rata con estadios agudos PCA existe gliosis celular mientras que en pacientes con reportes de EH mínima este mecanismo de proliferación no ocurre. La propuesta que ofrecemos entonces es que en estadios crónicos PCA la degeneración y pérdida de células Purkinje ocurre tal vez de forma progresiva similar a lo que ocurre en pacientes con EH.

#### *4.2 De la disminución en la proliferación de células en la capa granular*

Continuando con las observaciones sobre la respuesta diferencial entre la población de células de la capa molecular vs la capa granular. La cuantificación de los núcleos respectivos de cada capa mostro es menor el número de núcleos en la capa granular con respecto a la molecular entre grupos experimentales, esta observación nos hace recordar que 1) el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebelo es el glutamato<sup>15</sup>. 2) las terminales (glutamatérgicas) de las células granulares <sup>91</sup> ascienden dentro de la capa granular, Purkinje y recorren la capa molecular, por lo que existe una comunicación glía-neurona, la cual podría verse afectada por el incremento de amonio <sup>93</sup>. La pérdida de células granulares podría deberse a una respuesta de excitotoxicidad en la neurotransmisión glutamatérgica y/o GABAérgica (mencionada explícitamente en la introducción) <sup>19,94</sup> se debe recordar que 3) existe una interacción/modulación de la glía de Bergman sobre la sinapsis, GABAérgica, de las neuronas Purkinje <sup>95</sup>Entre los mecanismos mayormente explorados, se encuentra el ya mencionado de excitotoxicidad glutamatérgica mediada por la vía glutamato-óxido nítrico-

cGMP<sup>30</sup> y el estrés oxidante asociado a la muerte neuronal e incremento de la producción de lactato.<sup>96</sup>

#### *4.1.3 Microglía*

Nuestros resultados en los inmuno marcajes contra microglía (IBA 1 positivo) mostraron un cambio en la morfología de la microglia, aparentemente de una microglia en estado reactivo (ameboideo), en la corteza de secciones de cerebelos. El estado ameboso observado de la microglia data la existencia de una respuesta de inflamación por daño crónico asociado al incremento de amonio. En base a las observaciones de la pérdida de neuronas Purkinje, la activación de la microglía y la presencia del cuerpo de inflamación NLRP3, hacen dilucidar el conjunto de estos marcadores podrían sugerir, por una parte, la activación de la cascada de inflamación y de una posible muerte celular por piroptosis (se requieren hacer otros estudios de presencia de Cas-1 y GASDERMIN D<sup>9798</sup>). Por otro lado, la activación de la microglía subsecuentemente induce a la síntesis y liberación de citosinas pro inflamatorias IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , quienes participan de manera relevante en mecanismos de neurodegeneración<sup>80</sup>. Otras evidencias mencionan que cultivos de microglía expuestos a amonio, incrementan la activación del receptor tipo toll-4 (TLR4) el cual promueve la respuesta de inflamación en la formación del edema citotóxico y de la activación de células endoteliales<sup>82,99,100</sup>

#### *4.1.4 Edema asociado a incremento de amonio en ratas PCA*

Nuestros resultados mostraron la implicación del edema cerebral mediante el inmunomarcaje contra AQP-IV donde se observa una sobre expresión del marcador fluorescente en toda la corteza del cerebelo, es difícil sugerir este podría ser un edema vasogénico ya que hace falta de hacer algún experimento como “peso seco” donde se demuestre existe una correlación entre el % de agua total (perdido o ganado) del cerebelo. Sin embargo, podemos apoyar nuestros resultados de edema cerebral asociado aun efecto sinérgico y la inflamación crónica

<sup>62</sup>, es decir, el edema cerebral identificado podría ser propiamente un edema citotóxico, el cual se ha descrito por distintos grupos de investigación quienes mencionan el edema citotóxico y la inflamación contribuyen en la sobre expresión de genes que codifican para una amplia gama de proteínas con funciones clave en el control del estado energético y en la regulación del volumen celular <sup>29,36,42,75,80</sup> <sup>62</sup>. Y que además la acumulación propia del de amonio genera un cuadro de estrés oxidativo, la cual activa una cadena de daño en membranas y mitocondrias de astrocitos, donde en previos experimentos se ha asociado el daño mitocondrial con una apartemente sobre expresión de AQP-IV que puede contribuir al edema citotóxico <sup>101</sup>.

#### *4.1.5 La neuroinflamación induce a la perdida de la coordinación motora*

Nuestros resultados son consistentes con las anomalías motoras, similares a las que ocurren en la EH episódica y mínima <sup>62</sup>. La pérdida motora ocurre un curso temporal crónico en el que además la encefalopatía se agrava. Reciente evidencia propone la pérdida de la coordinación motora y de la misma actividad, debido a la reducción dependiente de la inhibición intra cortical lo que sugiere una inhibición reducida de las sinapsis GABAérgica en la corteza motora de pacientes con EH mientras que en el cerebelo existe aumento del tono GABAérgico, este efecto paradójico de inhibición GABAérgica sugiere algún efecto en la vía cerebelosa- tálamo- cortical probablemente debido a lesionen de los pedúnculos cerebelosos medios <sup>33</sup>. Existen otras evidencias en las que se ha correlacionado que durante mecanismos de neuroinflamación crónica, se induce al incremento de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), interleucina IL -1 $\beta$  y prostaglandina E2 en ganglios basales y corteza cerebral que deterioran la función cognitiva y motora en ratas con ligadura biliar e hiperamonémicas

<sup>102</sup> Los axones de las células de Purkinje son las únicas células de proyección del cerebelo,

es decir, la pérdida de estas neuronas conlleva a la aparición de ataxia e induce a la pérdida en la coordinación motora <sup>103</sup>.

#### *4.1.6 Inflamosoma en ratas PCA*

Finalmente, existen pocos o casi ningún reporte sobre el estudio de algún cuerpo de inflamación (en particular NLRP3) por exposición a amoníaco, en estadios crónicos, en algún sistema biológico. Sin embargo, hay diversos reportes donde mencionan una amplia variedad de células del sistema inmune expresa un repertorio de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR), en astrocitos y microglia <sup>104</sup>; estos PRR pueden estar unidos a la membrana como en el caso de los receptores tipo Toll que detectan señales del medio intra o extra celular capaces de contribuir a la respuesta inmune innata mediante el ensamblaje de los inflamasomas (NLR) <sup>84</sup>. La respuesta al ensamblaje del inflamosoma activa la caspasa 1 pro-inflamatoria, responsable de la maduración de citocinas inflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18 <sup>105</sup> que adicionalmente inducen a piroptosis<sup>97</sup>. Por lo tanto, extrapolando nuestros datos del inflamosoma NLRP3, asociado a enfermedades neurodegenerativas, se podría explicar que la activación del inflamasoma en la capa granular y molecular podría explicar la vacuolización en el cerebelo por un mecanismo de muerte celular piroptosis<sup>97</sup>. También se podría sugerir este mecanismo de inflamación es responsable de la formación de placas oligoméricas ya que en enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer si se ha observado el papel fundamental que implica la participación de un cuerpo de inflamación sobre la aparición de oligómeros de membrana plasmática causado por la escisión del N-terminal de la GASDERMINA D, causante de la perforación de la membrana plasmática para inducir inflamación celular y osmolisis<sup>84,97</sup>

Suárez et al. (2010) demostró, mediante análisis del ARNm, una sobre regulación de una proteína oligomérica,  $\alpha$ -sinucleína, en la capa granular y molecular en cortes de cerebelos de

ratas PCA (6 semanas) <sup>106</sup>. La aparición de estos agregados en la sustancia gris del cerebelo sugiere una expresión de citosinas proinflamatorias, de las cuales no se ha estudiado lo suficiente en modelos de hiperamonemia.

## **5. CONCLUSIONES**

1. El incremento de amonio se asocia con la respuesta diferencial entre poblaciones de células gliales, así como con la pérdida de células de la capa granular y neuronas Purkinje.
2. Se demostró la presencia de placas oligomérica (PAS positivo) en sustancia gris y blanca del cerebelo.
3. El marcador de microglía e inflammasoma nos permiten inferir existe un mecanismo de inflamación crónico causante de daño cerebelar y muerte celular por piroptosis.
4. Los cambios conductuales y de coordinación motora ocurren en un curso temporal asociados al daño histopatológico cerebelar y a la pérdida de células de Purkinje

## **6. PERSPECTIVAS**

Este trabajo nos permite tener un acercamiento del tipo de daño cerebelar y sus implicaciones en la pérdida de poblaciones neuronales y alteraciones histopatológicas muy evidentes en condiciones crónicas experimentales en ratas PCA y en la formación del edema e inflamación. Sin embargo, a partir de estos resultados surgen nuevas interrogantes interesantes de explorar.

En primer lugar, evaluar la bionergética y estado mitocondrial en cerebros de ratas PCA con hiperamonemia crónica.

Segundo lugar, describir la progresión de la inflamación e inflammasoma que subyace a la degeneración cerebelar así como evaluar marcadores de muerte por piroptosis que podrían estar implicadas en la vacuolización del cerebelo.

Tercer lugar, caracterizar la proteína amiloide asociada a la presencia de placas oligoméricas tipo kuru- $\zeta$  de qué tipo?

## BIBLIOGRAFÍA

1. Agusti, A., Hernández-Rabaza, V., Balzano, T., Taoro-Gonzalez, L., Ibañez-Grau, A., Cabrera-Pastor, A., ... Felipo, V. (2017). Sildenafil reduces neuroinflammation in cerebellum, restores GABAergic tone, and improves motor in-coordination in rats with hepatic encephalopathy. *CNS Neuroscience and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1111/cns.12688>
2. Albert, L. L., & Lehninger, A. L. (2005). Lehninger principles of biochemistry / David L. Nelson, Michael M. Cox. In *Principles of biochemistry*.
3. Albrecht, J. (2007). Ammonia toxicity in the central nervous system. In *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Amino Acids and Peptides in the Nervous System* (pp. 261–276). [https://doi.org/10.1007/978-0-387-30373-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-0-387-30373-4_12)
4. Amodio, P., Montagnese, S., Gatta, A., & Morgan, M. Y. (2004). Characteristics of Minimal Hepatic Encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 19(3/4), 253–267. <https://doi.org/10.1023/B:MEBR.0000043975.01841.de>
5. Apodaca, L. E. (2018). Nitrogen-ammonia. *Mining Engineering*. Retrieved from [pubs.er.usgs.gov/publication/70186008](https://pubs.er.usgs.gov/publication/70186008)
6. Auron, A., & Brophy, P. D. (2012). Hyperammonemia in review: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Pediatric Nephrology*, 27(2), 207–222. <https://doi.org/10.1007/s00467-011-1838-5>
7. Bachmann, C. (2002). Mechanisms of hyperammonemia. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40(7), 653–662. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2002.112>
8. Bak, L. K., Schousboe, A., & Waagepetersen, H. S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry*, 98(3), 641–653. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x>
9. Balzano, T., Forteza, J., Molina, P., Giner, J., Monzó, A., Sancho-Jiménez, J., ... Felipo, V. (2018). The Cerebellum of Patients with Steatohepatitis Shows Lymphocyte Infiltration, Microglial Activation and Loss of Purkinje and Granular Neurons. *Scientific Reports*, 8(1), 3004. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21399-6>
10. Barmore, W., & Stone, W. L. (2018). Physiology, Urea Cycle. In *StatPearls*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30020695>
11. Bellamy, T. (2006). Interactions between Purkinje neurones and Bergmann glia. *The Cerebellum*, 5(2), 116–126. <https://doi.org/10.1080/14734220600724569>
12. Bosoi, C. R., & Rose, C. F. (2013). Brain edema in acute liver failure and chronic liver disease: Similarities and differences. *Neurochemistry International*, 62(4), 446–457. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.01.015>
13. Brusilow, S. W., Koehler, R. C., Traystman, R. J., & Cooper, A. J. L. (2010). Astrocyte glutamine synthetase: Importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy. *Neurotherapeutics*, 7(4), 452–470. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.05.015>
14. Butterworth, R. F. (2002). Glutamate transporters in hyperammonemia. *Neurochemistry International*, 41(2–3), 81–85. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00027-X](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00027-X)
15. Butterworth, R. F. (2011). Hepatic encephalopathy: A central neuroinflammatory disorder? *Hepatology*, 53(4), 1372–1376. <https://doi.org/10.1002/hep.24228>

16. Butterworth, R. F., Norenberg, M. D., Felipo, V., Ferenci, P., Albrecht, J., & Blei, A. T. (2009). Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver International*, 29(6), 783–788. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2009.02034.x>
17. Cabrera-Pastor, A., Arenas, Y. M., Taoro-Gonzalez, L., Montoliu, C., & Felipo, V. (2019). Chronic hyperammonemia alters extracellular glutamate, glutamine and GABA and membrane expression of their transporters in rat cerebellum. Modulation by extracellular cGMP. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.01.011>
18. Cabrera-Pastor, A., Hernandez-Rabaza, V., Taoro-Gonzalez, L., Balzano, T., Llansola, M., & Felipo, V. (2016). In vivo administration of extracellular cGMP normalizes TNF- $\alpha$  and membrane expression of AMPA receptors in hippocampus and spatial reference memory but not IL-1 $\beta$ , NMDA receptors in membrane and working memory in hyperammonemic rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 57, 360–370. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.05.011>
19. Cabrera-Pastor, A., Llansola, M., Montoliu, C., Malaguarnera, M., Balzano, T., Taoro-Gonzalez, L., ... Felipo, V. (2019, June 22). Peripheral inflammation induces neuroinflammation that alters neurotransmission and cognitive and motor function in hepatic encephalopathy: Underlying mechanisms and therapeutic implications. *Acta Physiologica*, Vol. 226, p. e13270. <https://doi.org/10.1111/apha.13270>
20. Cauli, O., Rodrigo, R., Llansola, M., Montoliu, C., Monfort, P., Piedrafita, B., ... Felipo, V. (2009). Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 24(1), 69–80. <https://doi.org/10.1007/s11011-008-9115-4>
21. Cavanagh, J. B., & Kyu, M. H. (1971). Type II Alzheimer change experimentally produced in astrocytes in the rat. *Journal of the Neurological Sciences*, 12(1), 63–75. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(71\)90252-8](https://doi.org/10.1016/0022-510x(71)90252-8)
22. Cavanagh, J. B., Lewis, P. D., Blakemore, W. F., & Kyu, M. H. (1972). Changes in the cerebellar cortex in rats after portocaval anastomosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 15(1), 13–26. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(72\)90118-9](https://doi.org/10.1016/0022-510x(72)90118-9)
23. Chamuleau, R. A. (1996). Animal models of hepatic encephalopathy. *Seminars in Liver Disease*, 16(3), 265–270. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1007239>
24. Charles, A. (2005). Reaching out beyond the synapse: glial intercellular waves coordinate metabolism. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, 2005(270), pe6. <https://doi.org/10.1126/stke.2702005pe6>
25. Cooper, A. J. L., & Plum, F. (1987). Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiological Reviews*, Vol. 67, pp. 440–519. <https://doi.org/10.1152/physrev.1987.67.2.440>
26. Cooper, A., & Jeitner, T. (2016). Central Role of Glutamate Metabolism in the Maintenance of Nitrogen Homeostasis in Normal and Hyperammonemic Brain. *Biomolecules*, 6(2), 16. <https://doi.org/10.3390/biom6020016>
27. Coulter, D. A., & Eid, T. (2012). Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia*, 60(8), 1215–1226. <https://doi.org/10.1002/glia.22341>
28. Cudalbu, C., & Taylor-Robinson, S. D. (2019). Brain Edema in Chronic Hepatic Encephalopathy. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 9(3), 362–382. <https://doi.org/10.1016/J.JCEH.2019.02.003>

29. Dai, W., Yan, J., Chen, G., Hu, G., Zhou, X., Zeng, X., ... Zeng, X. (2018). AQP4-knockout alleviates the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in astrocytes via SPHK1/MAPK/AKT signaling. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(3), 1716–1722. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3749>
30. Dhiman, R. K. (2015). Impact of minimal/covert hepatic encephalopathy on patients with cirrhosis. *Clinical Liver Disease*, 5(3), 75–78. <https://doi.org/10.1002/cld.452>
31. Dincer, I., & Bicer, Y. (2018). 2.1 Ammonia. In *Comprehensive Energy Systems* (pp. 1–39). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809597-3.00201-7>
32. Eid, T., Tu, N., Lee, T.-S. W., & Lai, J. C. K. (2013). Regulation of astrocyte glutamine synthetase in epilepsy. *Neurochemistry International*, 63(7), 670–681. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.06.008>
33. Esteban-Jiménez, O., Martínez-Raposo-Piedrafita, M. C., Blasco-Pérez-Aramendia, M. J., Cebollada-Gracia, A. D., & Herráiz-Gastesi, G. (2015, March 1). Trastornos del ciclo de la urea en atención primaria. *Semergen*, Vol. 41, pp. 113–115. <https://doi.org/10.1016/j.semerng.2014.01.004>
34. F. Butterworth, R. (2007). Neuronal cell death in hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 22(3–4), 309–320. <https://doi.org/10.1007/s11011-007-9072-3>
35. Felipo, V. (2013). Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(12), 851–858. <https://doi.org/10.1038/nrn3587>
36. Felipo, V., & Butterworth, R. F. (2002). Neurobiology of ammonia. *Progress in Neurobiology*, 67(4), 259–279. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00019-9)
37. Ferenci, P. (2017). Hepatic encephalopathy. *Gastroenterology Report*, 5(2), 138–147. <https://doi.org/10.1093/gastro/gox013>
38. Freeman, L. C., & Ting, J. P.-Y. (2016). The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases. *Journal of Neurochemistry*, 136, 29–38. <https://doi.org/10.1111/jnc.13217>
39. Freeman, L., Guo, H., David, C. N., Brickey, W. J., Jha, S., & Ting, J. P.-Y. (2017). NLR members NLRC4 and NLRP3 mediate sterile inflammasome activation in microglia and astrocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(5), 1351–1370. <https://doi.org/10.1084/jem.20150237>
40. García-Lezana, T., Oria, M., Romero-Giménez, J., Bové, J., Vila, M., Genescà, J., ... Cordoba, J. (2017). Cerebellar neurodegeneration in a new rat model of episodic hepatic encephalopathy. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(3), 927–937. <https://doi.org/10.1177/0271678X16649196>
41. Gropman, A. L., Summar, M., & Leonard, J. V. (2007). Neurological implications of urea cycle disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0709-5>
42. Hadjihambi, A., Arias, N., Sheikh, M., & Jalan, R. (2018). Hepatic encephalopathy: a critical current review. *Hepatology International*, 12(S1), 135–147. <https://doi.org/10.1007/s12072-017-9812-3>
43. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. (2009). In A. Lajtha, D. Javitt, & J. Kantrowitz (Eds.), *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-30410-6>
44. Hassan, S. S., Baumgarten, T. J., Ali, A. M., Füllenbach, N.-D., Jördens, M. S., Häussinger, D., ... Groiss, S. J. (2019). Cerebellar inhibition in hepatic encephalopathy. *Clinical Neurophysiology*, 130(6), 886–892. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2019.02.020>

45. Hernandez-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Gonzalez-Usano, A., Agusti, A., Balzano, T., ... Felipo, V. (2016). Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarization of microglia. *Journal of Neuroinflammation*, *13*(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0549-z>
46. Hiba, O. El, Elgot, A., Ahboucha, S., & Gamrani, H. (2016). Differential regional responsiveness of astroglia in mild hepatic encephalopathy: An Immunohistochemical approach in bile duct ligated rat. *Acta Histochemica*, *118*(4), 338–346. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.03.003>
47. Hubbard, J. A., Hsu, M. S., Seldin, M. M., & Binder, D. K. (2015). Expression of the Astrocyte Water Channel Aquaporin-4 in the Mouse Brain. *ASN Neuro*, *7*(5), 175909141560548. <https://doi.org/10.1177/1759091415605486>
48. Jayakumar, A.R., & Norenberg, M. D. (2018). Hyperammonemia in Hepatic Encephalopathy. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, *8*(3), 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2018.06.007>
49. Jayakumar, Arumugam R., Rama Rao, K. V., & Norenberg, M. D. (2015, March). Neuroinflammation in hepatic encephalopathy: Mechanistic aspects. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, Vol. 5, pp. S21–S28. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2014.07.006>
50. Jayakumar, Arumugam R., Tong, X. Y., Curtis, K. M., Ruiz-Cordero, R., Abreu, M. T., & Norenberg, M. D. (2014). Increased toll-like receptor 4 in cerebral endothelial cells contributes to the astrocyte swelling and brain edema in acute hepatic encephalopathy. *Journal of Neurochemistry*, *128*(6), 890–903. <https://doi.org/10.1111/jnc.12516>
51. Jover, R., Madaria, E., Felipo, V., Rodrigo, R., Candela, A., & Compañ, A. (2005). Animal Models in the Study of Episodic Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis. *Metabolic Brain Disease*, *20*(4), 399–408. <https://doi.org/10.1007/s11011-005-7925-1>
52. Jover, R., Rodrigo, R., Felipo, V., Insausti, R., Sáez-Valero, J., García-Ayllón, M. S., ... Pérez-Mateo, M. (2006). Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.21180>
53. KLEJMAN, A., WEGRZYNOWICZ, M., SZATMARI, E., MIODUSZEWSKA, B., HETMAN, M., & ALBRECHT, J. (2005). Mechanisms of ammonia-induced cell death in rat cortical neurons: Roles of NMDA receptors and glutathione. *Neurochemistry International*, *47*(1–2), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.04.006>
54. Kosenko, E. A., Tikhonova, L. A., Alilova, G. A., Montoliu, C., Barreto, G. E., Aliev, G., & Kaminsky, Y. G. (2017). Portacaval shunting causes differential mitochondrial superoxide production in brain regions. *Free Radical Biology and Medicine*, *113*, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.023>
55. Kosenko, E., Kaminsky, Y., Stavroskaya, I. G., & Felipo, V. (2000). Alteration of mitochondrial calcium homeostasis by ammonia-induced activation of NMDA receptors in rat brain in vivo. *Brain Research*, *880*(1–2), 139–146. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02785-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02785-2)
56. Kril, J. J., Flowers, D., & Butterworth, R. F. (1997). Distinctive pattern of

- Bergmann glial pathology in human hepatic encephalopathy. *Molecular and Chemical Neuropathology*, 31(3), 279–287. <https://doi.org/10.1007/BF02815130>
57. Labenz, C., Wörns, M.-A., Schattenberg, J., Huber, Y., Galle, P., & Labenz, J. (2017). Epidemiology of hepatic encephalopathy in german hospitals – the EpHE study. *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, 55(08), 741–747. <https://doi.org/10.1055/s-0043-114671>
  58. Lee, S., Chandler, J. G., Broelsch, C. E., Flamant, Y. M., & Orloff, M. J. (1974). Portal-systemic anastomosis in the rat. *Journal of Surgical Research*, 17(1), 53–73. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(74\)90168-1](https://doi.org/10.1016/0022-4804(74)90168-1)
  59. Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V. G., Wu, H., & Lieberman, J. (2016). Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, 535(7610), 153–158. <https://doi.org/10.1038/nature18629>
  60. Llansola, M., Montoliu, C., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Gomez-Gimenez, B., ... Felipo, V. (2015). Interplay between glutamatergic and GABAergic neurotransmission alterations in cognitive and motor impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Neurochemistry International*, 88, 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.10.011>
  61. Llansola, M., Rodrigo, R., Monfort, P., Montoliu, C., Kosenko, E., Cauli, O., ... Felipo, V. (2007). NMDA receptors in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 22(3–4), 321–335. <https://doi.org/10.1007/s11011-007-9067-0>
  62. Louis, E. D., Babij, R., Lee, M., Cortés, E., & Vonsattel, J. P. G. (2013). Quantification of cerebellar hemispheric purkinje cell linear density: 32 ET cases versus 16 controls. *Movement Disorders*, 28(13), 1854–1859. <https://doi.org/10.1002/mds.25629>
  63. Lozeva-Thomas, V. (2004). Serotonin Brain Circuits with a Focus on Hepatic Encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 19(3/4), 413–420. <https://doi.org/10.1023/B:MEBR.0000043985.25055.b3>
  64. Luo, M., Guo, J.-Y., & Cao, W.-K. (2015). Inflammation: A novel target of current therapies for hepatic encephalopathy in liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*, 21(41), 11815–11824. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i41.11815>
  65. Magistretti, P. J., Pellerin, L., Rothman, D. L., & Shulman, R. G. (1999). Energy on demand. *Science*, Vol. 283, pp. 496–497. <https://doi.org/10.1126/science.283.5401.496>
  66. Marcaggi, P., & Coles, J. A. (2001). Ammonium in nervous tissue: Transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Progress in Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00043-5](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00043-5)
  67. Martinelli, D., Diodato, D., Ponzi, E., Monné, M., Boenzi, S., Bertini, E., ... Dionisi-Vici, C. (2015). The hyperornithinemia–hyperammonemia–homocitrullinuria syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 10(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0242-9>
  68. Martinez-Hernandez, A., Bell, K., & Norenberg, M. (1977). Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*, 195(4284), 1356–1358. <https://doi.org/10.1126/science.14400>
  69. Mohiuddin, S. S., & Khattar, D. (2019). Biochemistry, Ammonia. In *StatPearls*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31082083>
  70. Muñoz, M. D., Monfort, P., Gaztelu, J. M., & Felipo, V. (2000). Hyperammonemia

- impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the CA1 of rat hippocampus in vitro. *Neurochemical Research*.  
<https://doi.org/10.1023/A:1007547622844>
71. Namdari, S., Goel, D. P., Romanowski, J., Glaser, D., & Warner, J. J. P. (2011). Principles of glenoid component design and strategies for managing glenoid bone loss in revision shoulder arthroplasty in the absence of infection and rotator cuff tear. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, *20*(6), 1016–1024.  
<https://doi.org/10.1016/j.jse.2011.03.016>
  72. Natesan, V., Mani, R., & Arumugam, R. (2016). Clinical aspects of urea cycle dysfunction and altered brain energy metabolism on modulation of glutamate receptors and transporters in acute and chronic hyperammonemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *81*, 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.04.010>
  73. Neri, M., Frati, A., Turillazzi, E., Cantatore, S., Cipolloni, L., Di Paolo, M., ... Fineschi, V. (2018). Immunohistochemical Evaluation of Aquaporin-4 and its Correlation with CD68, IBA-1, HIF-1 $\alpha$ , GFAP, and CD15 Expressions in Fatal Traumatic Brain Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(11).  
<https://doi.org/10.3390/ijms19113544>
  74. Newsholme, P., Lima, M. M. R., Procopio, J., Pithon-Curi, T. C., Doi, S. Q., Bazotte, R. B., & Curi, R. (2003). Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *36*(2), 153–163.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2003000200002>
  75. Newsholme, Philip, Procopio, J., Lima, M. M. R., Pithon-Curi, T. C., & Curi, R. (2003). Glutamine and glutamate?their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochemistry and Function*, *21*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/cbf.1003>
  76. NEWSOME, P., PLEVRIS, J., NELSON, L., & HAYES, P. (2000). Animal models of fulminant hepatic failure:A critical evaluation. *Liver Transplantation*, *6*(1), 21–31. [https://doi.org/10.1016/S1527-6465\(00\)80029-5](https://doi.org/10.1016/S1527-6465(00)80029-5)
  77. Norenberg, M. D., Jayakumar, A. R., Rama Rao, K. V., & Panickar, K. S. (2007). New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metabolic Brain Disease*, *22*(3–4), 219–234. <https://doi.org/10.1007/s11011-007-9062-5>
  78. Norenberg, Michael D., & Martinez-Hernandez, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Research*, *161*(2), 303–310. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90071-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90071-4)
  79. Ochoa-Sanchez, R., & Rose, C. F. (2018). Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy in Chronic Liver Disease. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, *8*(3), 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2018.08.001>
  80. Rama Rao, K. V., & Norenberg, M. D. (2007). Aquaporin-4 in hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, *22*(3–4), 265–275.  
<https://doi.org/10.1007/s11011-007-9063-4>
  81. Rama Rao, Kakulavarapu V., Jayakumar, A. R., & Norenberg, M. D. (2014). Brain edema in acute liver failure: mechanisms and concepts. *Metabolic Brain Disease*, *29*(4), 927–936. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9502-y>
  82. Ramos-Junior, E. S., & Morandini, A. C. (2017). Gasdermin: A new player to the inflammasome game. *Biomedical Journal*, *40*(6), 313–316.  
<https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.10.002>
  83. Rao, K. V. R., & Norenberg, M. D. (2001). Cerebral Energy Metabolism in Hepatic Encephalopathy and Hyperammonemia. *Metabolic Brain Disease*, *16*(1/2), 67–78.

- <https://doi.org/10.1023/A:1011666612822>
84. Redondo, J., Kemp, K., Hares, K., Rice, C., Scolding, N., & Wilkins, A. (2015). Purkinje Cell Pathology and Loss in Multiple Sclerosis Cerebellum. *Brain Pathology*, 25(6), 692–700. <https://doi.org/10.1111/bpa.12230>
  85. Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez–Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez–Rabaza, V., Garcia–Verdugo, J., & Felipo, V. (2010). Hyperammonemia Induces Neuroinflammation That Contributes to Cognitive Impairment in Rats With Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology*, 139(2), 675–684. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.03.040>
  86. Rose, C. F. (2014). Ammonia: more than a neurotoxin? *Liver International*, 34(5), 649–651. <https://doi.org/10.1111/liv.12518>
  87. Shiotsuki, H., Yoshimi, K., Shimo, Y., Funayama, M., Takamatsu, Y., Ikeda, K., ... Hattori, N. (2010). A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *Journal of Neuroscience Methods*, 189(2), 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.03.026>
  88. Skowrońska, M., & Albrecht, J. (2012, February 27). Alterations of blood brain barrier function in hyperammonemia: An overview. *Neurotoxicity Research*, Vol. 21, pp. 236–244. <https://doi.org/10.1007/s12640-011-9269-4>
  89. Stokum, J. A., Kurland, D. B., Gerzanich, V., & Simard, J. M. (2015). Mechanisms of astrocyte-mediated cerebral edema. *Neurochemical Research*, 40(2), 317–328. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1374-3>
  90. Suárez, I., Bodega, G., Arilla, E., Rubio, M., Villalba, R., & Fernández, B. (1992). Different response of astrocytes and bergmann glial cells to portacaval shunt: An immunohistochemical study in the rat cerebellum. *Glia*, 6(3), 172–179. <https://doi.org/10.1002/glia.440060304>
  91. Suárez, I., Bodega, G., & Fernández, B. (2002). Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochemistry International*, 41(2–3), 123–142. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00033-5](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00033-5)
  92. Suárez, I., Bodega, G., & Fernández, B. (2010). Upregulation of  $\alpha$ -synuclein expression in the rat cerebellum in experimental hepatic encephalopathy. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 36(5), 422–435. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2010.01083.x>
  93. Suarez, I., Bodega, G., Rubio, M., & Fernandez, B. (2005). Down-regulation of astroglial proteins in the rat cerebellum after portacaval anastomosis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 31(2), 163–169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2004.00623.x>
  94. Taoro-Gonzalez, L., Arenas, Y. M., Cabrera-Pastor, A., & Felipo, V. (2018). Hyperammonemia alters membrane expression of GluA1 and GluA2 subunits of AMPA receptors in hippocampus by enhancing activation of the IL-1 receptor: underlying mechanisms. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1082-z>
  95. Torre-Delgado, A. (1997). Revista de gastroenterología de México. In *Revista de Gastroenterología de México* (Vol. 76). Retrieved from <http://www.revistagastroenterologiamexico.org/es-encefalopatia-hepatica-articulo-X0375090611252985>
  96. Torre-Delgado, A. (2011). Encefalopatía hepática. *Revista de Gastroenterología de México*, 76, 159–162. Retrieved from

<http://www.revistagastroenterologiamexico.org/es-encefalopatia-hepatica-articulo-X0375090611252985>

97. Unverdi, M., & Alsayouri, K. (2019). Neuroanatomy, Cerebellar Dysfunction. In *StatPearls*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31424835>
98. Vaquero, J., Chung, C., & Blei, A. T. (2003). Brain edema in acute liver failure. A window to the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Annals of Hepatology : Official Journal of the Mexican Association of Hepatology*.
99. Vázquez-Martínez, O., Valente-Godínez, H., Quintanar-Stephano, A., Gasca-Martínez, D., López-Cervantes, M. L., Palma-Tirado, L., ... Díaz-Muñoz, M. (2019). Reduced Liver Lipid Peroxidation in Subcellular Fractions is Associated with a Hypometabolic State in Rats with Portacaval Anastomosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/4565238>
100. Voet, S., Srinivasan, S., Lamkanfi, M., & van Loo, G. (2019). Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *EMBO Molecular Medicine*, 11(6), e10248. <https://doi.org/10.15252/emmm.201810248>
101. Walker, V. (2014). Ammonia Metabolism and Hyperammonemic Disorders. *Advances in Clinical Chemistry*, 67, 73–150. <https://doi.org/10.1016/BS.ACC.2014.09.002>
102. Wang, H., Ran, J., & Jiang, T. (2014). *Urea*. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9343-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9343-8_2)
103. Weissenborn, K., Bokemeyer, M., Krause, J., Ennen, J., & Ahl, B. (2005). Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease. *AIDS*. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000192076.03443.6d>
104. Wilkinson, D. J., Smeeton, N. J., & Watt, P. W. (2010). Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link. *Progress in Neurobiology*, 91(3), 200–219. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.01.012>
105. Zee, P. C., Mehta, R., Turek, F. W., & Blei, A. T. (1991). Portacaval anastomosis disrupts circadian locomotor activity and pineal melatonin rhythms in rats. *Brain Research*, 560(1–2), 17–22. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91209-J](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91209-J)
106. Zemtsova, I., Görg, B., Keitel, V., Bidmon, H.-J., Schrör, K., & Häussinger, D. (2011). Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. *Hepatology*, 54(1), 204–215. <https://doi.org/10.1002/hep.24326>