

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION

**Alteraciones de la neurotransmisión en
hipocampo de ratas hiperamonémicas. Papel de
la neuroinflamación. Modulación por GMPc
extracelular.**

Tesis doctoral

Autora: María Sancho Alonso

Directores:

Vicente Felipo

Andrea Cabrera Pastor

Marta Llansola

Tutor Académico:

Carmina Montoliu

Valencia, septiembre 2021

A mi familia

“Todo hombre puede ser, si se lo propone,
escultor de su propio cerebro” Santiago
Ramón y Cajal

AGRADECIMIENTOS

Aunque en esta tesis doctoral aparece mi nombre, son muchas las personas que han aportado su granito de arena de una forma u otra y han permitido el desarrollo de esta tesis.

En primer lugar, me gustaría agradecer al Doctor *Vicente Felipo* haberme dado la oportunidad de llevar a cabo esta tesis doctoral en su laboratorio. Gracias por darme la oportunidad de formarme y aprender tantísimo durante estos años de doctorado.

A mi directora de tesis la Doctora *Andrea Cabrera*, gracias por haberme guiado a lo largo de estos años, especialmente en el primer tramo de doctorado. Sin ti esta tesis no hubiese sido lo mismo. Gracias también por tus consejos a cerca de la carrera científica y por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A *Marta*, para mi la mamá del laboratorio, la persona a la que recurrir cuando te vuelves loco con la estadística o simplemente estás perdido. Es lo más similar a una enciclopedia I-06, no hay nada que no sepa. Gracias por haberme escuchado y soportado en momentos de agobio. ¡Qué hubiese hecho yo sin ti hasta las siete de la tarde, o incluso más, en el laboratorio!

A todos mis compañeros del laboratorio de Neurobiología. A *Lucas*, gracias por haberme enseñado tanto y tan bien, eres para mí en una persona de referencia; a *Mar*, gracias por ser el protocolo del laboratorio, al que recurrir cuando tienes cualquier tipo de duda experimental, gracias también por escucharme y hacer los días de trabajo más amenos, gracias también por tus consejos; a *Mari Carmen*, por haberme enseñado tanto desde el principio sobre los western blot y por estar siempre dispuesta a resolver una duda; a *Paola*, mi compañera desde el primer día, gracias por haber sido además de compañera amiga, la persona con la que tomarse una cerveza después del laboratorio o incluso ir al gimnasio. Este año te he echado muchísimo de menos; a *Annie*, gracias por ser la calma y ser capaz de transmitirme, aunque sólo sea un poco, gracias por estar siempre dispuesta a ayudar a los demás, deberían de existir más compañeros como tú; a *Paula*, si las paredes del CIPF hablasen sabrían que tú y yo cambiaríamos el mundo, es un placer tener compañeras tan inteligentes y con las ideas tan claras como tú; a *Yaiza*, ha sido un placer compartir estos años de tesis contigo y tantísimos experimentos y momentos; a *Fernando*, han sido pocos los meses que hemos coincidido, pero los suficientes como para darme cuenta que hay pocas personas tan apasionadas por la ciencia como tú, gracias por estar siempre dispuesto a ayudar y explicar, especialmente en momentos difíciles; a todo el resto de compañeros que han pasado por el laboratorio: *Tiziano*, *Michele*, *Carla*... todos me habéis enseñado algo y habéis colaborado para que esta tesis haya salido adelante.

También agradecer al grupo de *Gary Stephens* de la Universidad de Reading haberme dado la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio, haberme acogido tan bien y haberme enseñado tanto de electrofisiología.

A *Vicent Teruel*, para mi un director de tesis más. Gracias por haberme enseñado y ayudado tanto, desde el primer hasta el último día, y por haberme transmitido tu pasión

hacia la neurociencia y la docencia. Sin duda eres para mí un referente científico. Gracias también por tus consejos y por haberme ayudado a alcanzar mis metas.

A mis padres. Gracias por haber creado las neuronas que me han permitido realizar esta tesis doctoral y por haberme dado la oportunidad de crecer en un sitio tan cercano a la naturaleza y la vida en general, lo que me permitió hacerme miles de preguntas y encontrar mi verdadera vocación, la biología. Gracias por creer siempre en mí, por haberme dado la oportunidad de formarme, sin vuestra ayuda hoy no estaría a punto de depositar esta tesis doctoral. Por animarme a seguir formándome y apoyarme siempre. A ti *mama* gracias por transmitirme desde pequeña el valor del conocimiento, del saber por saber y enseñarme que eso será lo único que nunca nadie podrá arrebatar. A ti *papá* gracias por enseñarme el valor del esfuerzo y la constancia, y por haberme inculcado la importancia de luchar por lo que creemos y lo que queremos. Ambos sois un gran ejemplo.

A mi hermano Pablo. Eres una de las personas más buenas y generosas que conozco. Por esas largas llamadas de teléfono en las que me escuchas pacientemente cuando quiero reventar el mundo y el sistema, aunque entre en bucle durante una hora. por creer en mí y en mis posibilidades como pocas personas lo hacen y cuando ni yo misma soy capaz. Eres el mejor hermano que puedo tener.

A mi hermana Clara. La pequeña gran revolución de la casa. Gracias por alegrar cada día, por apoyarme cuando más lo necesito y animarme. Por preocuparte por mí. Sé que vas a volar tan alto como puedas y a llegar tan lejos como quieras. Gracias por apoyarme y creer firmemente que puedo y soy capaz de todo. Tú también eres la mejor hermana que los papás me han podido dar.

A mi estrella del cielo, mi abuelo. Gracias por los años que compartiste conmigo, por haberme enseñado tanto y, sobre todo, por haber sido y seguir siendo una persona tan importante para mí. No es fácil conectar tanto con una persona como tú y yo lo hacíamos. No hay un día que no te recuerde. Se que allá donde estés sigues mi camino y estás orgulloso tanto de mis virtudes como de mis defectos, de mis aciertos y de mis fallos. Durante estos años te sigo sintiendo cerca. *A mis otros tres abuelos,* gracias por vuestro cariño y apoyo. Hay pocas personas que me quieran y me valoren tanto como vosotros lo hacéis. Es una suerte poder compartir este momento con vosotros.

A mi tío Lis, gracias por haber convivido conmigo durante más de 8 años, por haberme aconsejado y comprenderme. Ha sido un placer.

A mis tíos, primos y sobrinos, por estar siempre en mi camino, por preocuparos por mí y por enseñarme el verdadero significado de familia.

A Inés y Yolanda, gracias por ser desahogo y alegría. Por saber estar siempre. Es difícil explicar cómo en cosa de 4-5 años os habéis convertido en personas imprescindibles para mí.

Por último, pero no menos importante (incluso más), a ti *David.* Gracias por ser mi apoyo incondicional y mi calma. Gracias por tu paciencia y comprensión, especialmente durante estos últimos meses. Eres el mejor compañero de viaje que podría haber elegido.

A TODOS VOSOTROS, GRACIAS

SUMMARY

INTRODUCCION

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric syndrome caused by liver disease. Patients with chronic liver diseases have reduced capacity to eliminate ammonia in the liver and, as a consequence, show hyperammonemia, which increases ammonia levels in the brain and is a main contributor to the neurological alterations in patients with HE (Felipo, 2013). Hyperammonemia (HA) and inflammation act synergistically to induce neuroinflammation which alters neurotransmission leading to cognitive and motor impairment in HE (Felipo, 2013; Shawcross, et al., 2004 y 2007; Felipo et al., 2012; Montoliu et al., 2009). Liver damage will induce both hyperammonemia and peripheral inflammation which, synergistically, will produce neuroinflammation. Hyperammonemia without liver failure can induce neuroinflammation (Rodrigo et al., 2010). Rats with chronic hyperammonemia show cognitive and motor impairment caused by alterations in different neurotransmission systems such as glutamatergic and GABAergic (Aguilar et al., 2000; Rodrigo et al, 2010; Hernández-Rabaza et al, 2016aa y 2016b). Alterations in spatial learning and working memory have been attributed to alterations in the hippocampus in hyperammonemic rats (Cabrera-Pastor et al., 2016a; Taoro-González et al., 2019). Treatment of hyperammonemic rats with extracellular cGMP reverses alterations in spatial reference memory, but not those in working memory (Cabrera-Pastor et al., 2016a). In the hippocampus of hyperammonemic rats, neuroinflammation seems to mediate some of the alterations in both, spatial learning and memory and in non-spatial learning and memory. Treatments that reverse neuroinflammation, either by reducing the activation of microglia and astrocytes or by reducing proinflammatory cytokines, normalize these alterations in learning and memory (Taoro-González et al., 2019).

Role of IL-1 β in neuroinflammation

IL-1 β is a proinflammatory cytokine produced by many cell types, which can exert its effects in an autocrine or paracrine manner. This cytokine plays a key role in the development of neuroinflammation in a large number of diseases, including hyperammonemia and HE (Hernández-Rabaza et al., 2015, 2016; Cabrera-Pastor et al., 2016a; Taoro-González et al., 2018). IL-1 β exerts its action by binding to its receptor, which is present on both neurons and glial cells. When this interleukin binds to its receptor on glial cells, activates these cells and trigger an inflammatory process characterized by the release of chemokines, cytokines and other inflammatory mediators (Hewett et al., 2012). The binding of IL-1 β to its receptor in neurons triggers different signaling cascades that produce changes in neurotransmission leading to

cognitive impairment. Blockade of the IL-1 receptor in vivo, by intracerebral IL-1Ra treatment with osmotic minipumps, reverses microglia activation in hippocampus. Furthermore, this blockade reverses the altered membrane expression of GluN2A subunit of NMDA receptor, GluA1 subunit of AMPA receptor and $\alpha 1$ subunit of GABA_A receptor in hippocampus and restores alterations in working memory and object recognition memory, both with a non-spatial component, but not alterations in spatial memory and learning. IL-1 β would be involved in the impairment of non-spatial memory induced by neuroinflammation, whereas the impairment of spatial memory would be independent of IL-1 β and it would be mediated by other proinflammatory factors (Taoro-González et al., 2019).

Modulation of neuroinflammation and neurotransmission by S1PR2

Sphingolipids regulate neuroinflammation, mediating cell death processes (Di Pardo and Maglione, 2018), glial activation (Assi et al., 2013) and the expression and production of inflammatory mediators (Maceyka et al., 2014). Sphingolipid alterations involving increased ceramide and decreased sphingosine kinase contribute to some neuroinflammatory diseases (Maceyka et al., 2014). For that reason, sphingolipids have been proposed as a therapeutic targets and diagnostic markers for different neuroinflammatory diseases.

S1P plays a prominent role in cell signaling to maintain body homeostasis and modulate inflammation. It can act as an intracellular second messenger or as an extracellular ligand for its 5 G-protein-coupled receptors S1P1-S1P5 (Fischer et al., 2011). It can act in autocrine and paracrine or endocrine manner. In the CNS, all receptors except S1PR4 are expressed; S1PR1 has been the most studied receptor.

CNS cells, including microglia, neurons and astrocytes highly express S1PRs and these cells regulate S1P levels through the sphingosine kinase SphK1. S1P play a key role in activation, proliferation and migration of astrocytes and microglia (Assi et al., 2012; Karunakaran et al., 2017). Cell activation by LPS stimulates SphK1-S1P signaling, increasing SphK1 expression and S1P generation. This, in turn, leads to increase in cell proliferation and synthesis of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-17) and neurotoxic molecules. S1P treatment induces a proinflammatory response, whereas SphK1 suppression reduces this response, suggesting that the production of these proinflammatory mediators is directly dependent on S1P synthesis by glial cells (Maceyka et al., 2014; Spiegel et al., 2011). Suppression of SphK or the S1P receptor reduces glial cell proliferation (Wu et al., 2008). Treatment of human astrocytes with FTY720, an antagonist of the S1PR1 receptor, reduces the secretion of monocyte chemoattractant protein-1, demonstrating that blockade of S1PR1 reduces the proinflammatory response of astrocytes (Rothhammer et al., 2015). These studies indicate that S1P produced by

SphK1 plays a crucial role in the proinflammatory response regulation in glial cells and it is a key component in the etiology of pathologies with a neuroinflammatory profile.

In the case of HE, treatment with FTY20, an antagonist of S1PR1, in BDL rats restores LTP and memory (Shabani et al., 2019). Furthermore, in patients with chronic liver disease, serum S1P levels decrease dramatically with advanced stages of liver disease and are a predictor of mortality. Since S1P is a potent regulator of endothelial integrity and immune response, low S1P levels can significantly influence multi-organ failure (Mücke et al., 2020). In BDL rats treatment with JTE013, a S1PR2 receptor antagonist, reduces both fibrosis and inflammation by inhibiting the ERK1/2 and AKT pathway which, in turn, activates NF- κ B (Gonzalez-Fernandez et al., 2017). These studies suggest that S1P play a key role in HE pathogenesis.

Inhibition of S1PR2 with JTE013 in ischemia results in a decrease in both the number and activation of microglia (Sapkota et al., 2019). In addition, microglia activation is reduced when S1PR1 and S1PR3 receptors are blocked in ischemia (Gaire et al., 2018a; Gaire et al., 2018b). Furthermore, S1P through S1PR2 can modulate the production of proinflammatory cytokines (IL-1 β and IL-18) in atherosclerosis. Treatment with JTE013 has been shown to reverse the increase IL-1 β and IL-18 levels in plasma (Skoura et al., 2011).

Since S1P seems to play a key role in HE pathogenesis, through the modulation of the neuroinflammatory response by S1PR2 receptor, we will try to elucidate the role of S1PR2 in the neuroinflammation and alterations in neurotransmission observed in hyperammonemia. We blocked S1PR2 with JTE013 in the hippocampus of hyperammonemic rats to analyze the pathways involved in the modulation of neuroinflammation and GABAergic neurotransmission by S1PR2.

Neuroinflammation and neurotransmission modulation by BDNF

Brain derived neurotrophic factor (BDNF) plays an important role in neuronal survival and growth, in formation of new synapses and dendritic branching. In addition, BDNF serves as a neurotransmitter modulator, and participates in neuronal plasticity, which is essential for learning and memory (Edelmann et al., 2014; Panja et al., 2014). Many brain pathologies lead to reduced BDNF protein levels in serum and brain (Lima et al., 2019). BDNF gene expression is regulated by a wide range of endogenous and exogenous stimuli (e.g., stress, physical activity, brain injury, diet).

On the other hand, BDNF plays a central role in neuroinflammatory processes. One of the main inflammatory triggering factors is nuclear factor-kappa B (NF- κ B), a transcription factor that induces the expression of several proinflammatory genes (Marini et al., 2004). BDNF binding to the TrkB receptor can activate several signaling cascades, including mitogen-activated protein

kinase (MAPK), phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), and the phospholipase C γ (PLC- γ) pathway. These signaling cascades induce an increase in Ca²⁺, activation of transcription factors such as NF- κ B, and expression of genes de novo such as the BDNF gene itself. BDNF binding to TrkB also activates phosphatidylinositol 3-phosphate-dependent kinase (PI3K), Akt and I κ B α , which induces BDNF mRNA transcription. BDNF stimulates PLC- γ /PKC signaling and activation of IKK α and IKK β kinases. These kinases phosphorylate the NF- κ B inhibitory protein, I κ B α , resulting in ubiquitin binding and subsequent degradation of I κ B α in proteasomes, which induces the release of NF- κ B and its translocation to the nucleus where it binds to DNA and induces the expression of genes related to the inflammatory response (Mattson et al., 2006). In addition, BDNF can modulate gene regulation by activating other transcription factors such as CREB. Gene modulation by BDNF induces neuronal survival, growth, long-term potentiation (LTP), de novo expression of BDNF and inflammatory response-related genes.

Rats with partial hepatectomy show reduced BDNF levels in the hippocampus and the treatment with nicotine increases BDNF levels, which improves learning and spatial memory. A decrease in BDNF levels has also been reported in the bile ligation model which favours the appearance of cognitive alterations (Dhanda et al., 2018).

BDNF can also modulate neurotransmission and synaptic plasticity. It can modulate both GABAergic and glutamatergic neurotransmission. BDNF would produce an increase in neurotransmitter release at the presynaptic level (Zafra et al., 1991; Tanaka et al., 1997; Kim et al., 2017).

In this work, we will focus on the effects on GABAergic neurotransmission. Activation of PLC- γ by BDNF increases intracellular concentrations of inositol triphosphate, IP₃, which in turn increases intracellular Ca²⁺ concentration (Yamada et al., 1991). BDNF-TrkB signaling also affects the expression and functionality of GABA transporters. BDNF has been shown to increase both membrane expression of GAT-1 and the time it spends in the membrane, resulting in an increase in the rate of GABA clearance from the extracellular medium and thus a decrease in extracellular GABA concentration (Vaz et al., 2011). These alterations seem to be caused by up-regulation of neuronal GAT-1. In hippocampal neurons, BDNF causes a reduction in the immunoreactivity of the α 2, β 2, β 3 and γ 2 subunits of the GABA_A receptor in neuronal cultures, which is indicative of a reduction in its membrane expression (Brunig et al., 2001). In addition, BDNF reduces inhibitory postsynaptic GABA currents and up-regulates the expression of the α 4 subunit of the GABA_A receptor through stimulation of Egr-3 as a consequence of activation of the PKC pathway (Roberts et al., 2005, 2006). BDNF has been shown to selectively regulate GABA_A receptor transcription through activation of the Janus kinase (JAK) and activator of transcription (STAT) pathway. In addition, BDNF can also modulate Cl⁻ cotransporters, which

will in turn modulate (as explained in section 6.1.1.) GABAergic neurotransmission (Wardle and Poo, 2003). In some pathologies such as in chronic pain, BDNF/TrkB signaling results in a decrease of KCC2 expression, leading to hyperexcitability (Kong et al., 2014; Tao et al., 2015). Therefore, BDNF could alter several intracellular pathways that could modulate GABAergic neurotransmission. Thus, the effect of BDNF on GABAergic transmission is not limited to direct regulatory mechanisms, but also includes indirect mechanisms.

We evaluated the effect of TrkB blockade with ANA-12 in the hippocampus of hyperammonemic rats on neuroinflammation and GABAergic neurotransmission.

Role of CCL2 in neuroinflammation

CCL2 and its main receptor (CCR2) are expressed in different cell types in the CNS: astrocytes, endothelial cells, microglia and neurons, which is indicative of its importance in the CNS. It is involved in the development of inflammatory and immune responses and CCL2 is considered an indicator of the progression of some inflammatory processes (Madrigal et al., 2014).

CCL2 is involved in many neuroinflammatory and neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (Ishizuka et al. 1997) or cerebral ischemia (Kim et al. 1995). Binding of CCL2 to its receptor CCR2 leads to activation of microglia. In HE, CCL2 contributes to microglia activation and cognitive and motor alterations (McMillin et al., 2014). Zhang et al., (2017) showed that CCL2 levels are increased in thioacetamine-injected rats (HE model) and promote microglia activation and that blocking CCR2 receptor inhibits microglial activation. They also demonstrated that TNF- α treatment in vitro induces CCL2 release by neurons and expression of microglial proinflammatory M1 markers (iNOS, COX2, IL-6 and IL-1 β). In addition, CCR2 activation increases the expression of inflammatory mediators such as CCL2 itself, IL-1 β or TNF α .

Effects of extracellular cGMP on neuroinflammation and neurotransmission

cGMP plays a main role in synaptic plasticity and in memory and learning. Although it exerts functions in different brain areas, here we will focus mainly on the hippocampus. At hippocampal synapses, the application of a tetanus to induce LTP leads to activation of postsynaptic NMDA receptors, which increases intracellular calcium, which upon binding to calmodulin activates NO synthase and NO synthesis and release into the synaptic cleft. This NO is transported to the presynaptic neuron, where NO activates soluble guanylate cyclase (GC), increasing cGMP production. Elevated cGMP levels activate PKG, which in turn, activates phosphodiesterase 5 (PDE5) to induce cGMP degradation. This process is necessary for the correct induction and maintenance of LT. In fact, any alteration in this process leads to alterations in LTP (Monfort et al., 2002a, 2002b and 2005).

In animal models of HE, the function of the NMDA-NO-GMPc pathway is impaired, inducing alterations in synaptic plasticity and learning. Monfort et al. (2007) showed that in PCS rats (an animal model of HE) glutamatergic neurotransmission and LTP are altered in hippocampus, which contributes to cognitive deficits. Alterations in the amplitude and maintenance of LTP in the hippocampus of the PCS rats are caused by reduced activation of AMPA and NMDA receptors, which are associated with alterations in the membrane expression of the GluA1 and GluA2 subunits of AMPA receptors, and the GluN1, GluN2A and GluN2B subunits of NMDA receptors. These rats with HE had reduced hippocampal cGMP levels and impaired learning ability in the Morris water maze task. LTP is also altered in the hippocampus of hyperammonemic rats. In control rats the application of a tetanic stimulation induces a rapid increase in cGMP, followed by a decrease in cGMP levels mediated by PKG activation, which activates PDE5 that degrades cGMP. In hippocampal slices from hyperammonemic rats the increase in cGMP occurs normally following tetanic stimulation, but the rest of the process, including the subsequent degradation of cGMP, does not occur properly due to a lower activation of PKG and PDE5, resulting in reduced LTP magnitude (Monfort et al., 2010). Thus, altered cGMP-PKG play a key role in the impairment of LTP in hyperammonemia and this alteration would contribute to the impairment of cognitive function in animal models and patients with hepatic encephalopathy.

Previous studies have shown that cGMP plays an important role in the modulation of neuroinflammation and neurotransmission in HE. Alterations in cGMP and GC levels have been reported in cirrhotic patients, both in lymphocytes and plasma. GC activation is also altered in cerebellum and cerebral cortex of HE patients (Corbalan et al., 2002). These alterations correlate with the grade of HE analyzed with psychometric tests. The function of the NMDA-NO-GMPc pathway is altered in rats with hyperammonemia and HE. The alterations in some types of memory and learning are reversed by treatment with anti-inflammatory drugs or inhibitors of cGMP degradation, demonstrating that altered cGMP plays a key role in memory and learning alterations in hyperammonemia and HE (Cabrera-Pastor et al., 2018). In PCS rats treatment with sildenafil, a phosphodiesterase 5 inhibitor, which degrades cGMP, increases cGMP levels, reduces IL-1 β levels and neuroinflammation in hippocampus, is able to restore spatial learning (Hernandez-Rabaza et al., 2015). Cauli et al., (2009) showed that rats with chronic hyperammonemia have increased GABAergic neurotransmission, which interferes with the glutamate NO-GMPc pathway in cerebellum (Fedele et al., 2000; Cauli et al., 2009) resulting in a reduction of extracellular cGMP. Chronic treatment with a GABA_A receptor antagonist, bicuculline, restores the glutamate-NO-GMPc pathway, increasing extracellular cGMP levels in cerebellum and improving learning ability in the Y-maze. This study supports the idea that increased GABA_A receptor activation contributes to the reduction of the glutamate-NO-GMPc pathway and extracellular GMPc concentration, whereas GABA_A receptor inhibition can restore

the function of this pathway and it is able to improve learning in hyperammonemic rats (Cauli et al., 2009). Extracellular cGMP levels are reduced in cerebellum and hippocampus of hyperammonemic rats and increasing extracellular cGMP to normal levels reverses neuroinflammation and cognitive and motor alterations in hyperammonemic rats (Cabrera-Pastor et al., 2016). Erceg et al. (2005) demonstrated that restoring cGMP levels by intracerebral administration of zaprinast, a phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitor, in hyperammonemic or PCS rats leads to restoration of learning in the Y-maze. The same effect is obtained if extracellular cGMP levels are increased by continuous intracerebral administration of cGMP with miniosmotic pumps implanted in the cerebral ventricle. A subsequent study demonstrated that intracerebral treatment with extracellular cGMP in hyperammonemic rats, reduces neuroinflammation, restores TNF- α levels and reverses microglia and astrocyte activation in hippocampus and reverses the impairment in spatial learning, (Cabrera-Pastor et al., 2016a). Furthermore, increasing extracellular cGMP in the cerebellum of hyperammonemic rats also normalizes IL-1 β levels and microglia activation, indicating that extracellular cGMP reduces neuroinflammation (Cabrera-Pastor et al., 2018). Neuroinflammation and increased IL-1 β levels, in hyperammonemia induces alterations in the membrane expression of GluA1 and GluA2 subunits of AMPA receptors and GluN2B of NMDA receptors. Taoro-Gonzalez et al., (2018) demonstrated that treatment of hippocampal slices ex vivo with extracellular cGMP normalizes the membrane expression of GluA2 and GluA1 of AMPA receptors. These effects of extracellular cGMP are due to a reduction of IL-1 β levels in the hippocampus of hyperammonemic rats, which reduces the overactivation of the IL-1 β receptor and, consequently, the activation by phosphorylation of Src and NR2B-p38-PKC ϵ mediated phosphorylation of GluA2 at Ser880 and NR2B-CaMKII mediated phosphorylation of GluA1-Ser831. They also showed that both IL-1 receptor blockade and Src inhibition with PP2 ex vivo in hippocampal slices of hyperammonemic rats reverse the increased membrane expression of GluN2B and GluA2 and the reduced membrane expression of GluA1 (Taoro-Gonzalez et al., 2018). These results indicate that increased extracellular cGMP reverses neuroinflammation and the alteration in neurotransmission in the hippocampus of hyperammonemic rats.

HYPOTHESES

Hyperammonemia is a key contributor to HE. Hyperammonemic rats show neuroinflammation, alterations in different neurotransmitter systems and, as a consequence, cognitive and motor alterations. Taking into account the data summarized in the introduction we propose the following hypotheses:

1. Membrane expression of AMPA, NMDA and GABA_A receptors is crucial to regulate their function and the synaptic plasticity processes underlying memory and learning. Chronic hyperammonemia alters the membrane expression of glutamate (AMPA and NMDA) and GABA_A receptor subunits. We hypothesize that their function will be therefore altered.
2. In hyperammonemic rats, treatment with extracellular cGMP normalizes the membrane expression of some glutamate receptor subunits in hippocampus. We hypothesize that extracellular cGMP should also restore the function of NMDA, AMPA and, probably, of GABA_A receptors in the hippocampus of hyperammonemic rats.
3. Different factors may contribute to the alterations in GABAergic neurotransmission in the hippocampus of hyperammonemic rats, including alterations in membrane expression of GABA transporters, extracellular GABA concentration and membrane expression of GABA_A receptor subunits and/or chloride transporters.
4. IL-1 β plays a main role in neuroinflammation, alterations in glutamatergic neurotransmission and impairment of non-spatial learning in the hippocampus of hyperammonemic rats. We hypothesize that increased IL-1 β contributes to altered GABAergic neurotransmission in hippocampus of hyperammonemic rats by altering membrane expression of different GABA_A receptor subunits and/or GABA and/or Cl⁻ transporters.
5. Activation of the S1PR2 receptor induces neuroinflammation and promotes the production of proinflammatory cytokines such as IL-1 β in different pathologies. We hypothesize that in hippocampus of hyperammonemic rats an increased activation of the S1PR2 receptor contributes to neuroinflammation and subsequently to altered membrane expression of GABA_A receptors and/or GABA or Cl⁻ transporters.
6. Chronic hyperammonemia induces neuroinflammation, with activation of microglia. The chemokine CCL2, through activation of its receptor CCR2 in microglia, induces microglia activation. We hypothesized that CCL2 levels could be increased in hyperammonemic rats and that the CCR2 antagonist (RS504393) would decrease microglia activation.
7. BDNF through activation of its receptor TrkB modulates neuroinflammation, membrane expression of GABA_A receptors and GABAergic neurotransmission. We hypothesize that BDNF content could be altered in hyperammonemia and contribute to neuroinflammation

and alterations in the membrane expression of GABA_A receptor subunits and GABA and/or chloride transporters. The TrkB receptor antagonist (ANA-12) ex vivo could reverse some of these alterations.

OBJETIVES

1. Assess whether chronic hyperammonemia alters the postsynaptic evoked potentials (EPSPs) induced by activation of AMPA and NMDA receptors and/or inhibitory postsynaptic potentials (IPSPs) induced by activation of GABA_A receptors. Analyze the following parameters: amplitude, area over the curve, area under the curve, desensitization area and synaptic facilitation.
2. Evaluate the effects of extracellular cGMP on AMPA and NMDA receptor EPSPs and GABA_A receptor IPSPs by analyzing the synaptic response parameters indicated in objective 1.
3. Analyze the effect of hyperammonemia on membrane expression of GABA transporters, extracellular concentration of GABA, membrane expression of GABA_A receptors and chloride cotransporters in hippocampus. Analyze the pathways by which hyperammonemia alters these parameters.
4. Evaluate the role of IL-1 β in the induction of neuroinflammation and alterations of GABAergic neurotransmission in the hippocampus of hyperammonemic rats and identify the underlying mechanism. Analyze the effect of blocking the IL-1 receptor on:
 - 4.1. Neuroinflammation: microglia and astrocytes activation and IL-1 β , CC12 and BDNF levels.
 - 4.2. Membrane expression of GABA_A receptor subunits (α 1, α 2, α 5, γ 2, β 3 and δ), GABA transporters (GAT-1 and GAT-3) and chloride cotransporters (KCC2 and NKCC1).
5. Evaluate the role of S1PR2 receptor in neuroinflammation and GABAergic neurotransmission alterations in the hippocampus of hyperammonemic rats and identify the underlying mechanisms. Analyze the effects of blocking the S1PR2 ex vivo with JTE013 (an antagonist of S1PR2) on:
 - 5.1. Neuroinflammation: microglia and astrocytes activation and IL-1 β , CC12 and BDNF levels.
 - 5.2. Membrane expression of GABA_A receptor subunits (α 1, α 2, α 5, γ 2, β 3 and δ), GABA transporters (GAT-1 and GAT-3) and chloride cotransporters (KCC2 and NKCC1).
6. Evaluate the role of BDNF in neuroinflammation and GABAergic neurotransmission alterations in the hippocampus of hyperammonemic rats and analyze the underlying mechanisms. Analyze the effects of blocking TrkB ex vivo with ANA-12 (an antagonist of TrkB receptor) on:

- 6.1. Neuroinflammation: microglia and astrocytes activation and IL-1 β , CCL2 and BDNF levels.
- 6.2. Membrane expression of GABA_A receptor subunits (α 1, α 2, α 5, γ 2, β 3 and δ), GABA transporters (GAT-1 and GAT-3) and chloride cotransporters (KCC2 and NKCC1).
7. Evaluate the role of CCL2 on neuroinflammation in the hippocampus of hyperammonemic rats. Analyze the effect of blocking CCR2 *ex vivo* with RS504393 (an antagonist of CCR2 receptor) on microglia and astrocytes activation.
8. Assess if extracellular cGMP reverses the alterations in GABA_A receptor subunits (α 1, α 2, α 5, γ 2, β 3 and δ), GABA transporters (GAT1 y GAT3) and chloride cotransporters (KCC2 y NKCC1) membrane expression. Identify the mechanisms by which extracellular cGMP modulates them.

METHODS

Ex vivo experiments

In each experiment, four rats (two control and two hyperammonemic rats) were decapitated at 4–5 weeks of hyperammonemia and their brains quickly transferred to a plate where they were dissected, separating the two hemispheres by cutting through the midline and extracting both hippocampi using spatulas. Once dissected, hippocampi were immersed immediately into ice-cold Krebs buffer (in mmol/L): NaCl 119, KCl 2.5, KH₂PO₄ 1, NaHCO₃ 26.2, CaCl₂ 2.5, and glucose 11, aerated with 95% O₂ and 5% CO₂ at pH 7.4. After that, hippocampi were placed longitudinally on a manual chopper and cut to obtain transverse slices (400 μ m). Slices were transferred to incubation wells (15 slices in each well, from the two rats per group) without any distinction between dorsal or ventral hippocampus and incubated for 20 min at 35.5 °C in Krebs buffer for stabilization. One hundred nanogram per millileter of IL1Ra (R&D Systems cat# 1545-RA-025, Minneapolis, USA), Src inhibitor (PP2) at 10 μ M (Sigma cat# P0042, Darmstadt, Germany); the sphingosine-1-phosphate receptor inhibitor (JTE013) at 20 μ M (Tocris/Bio-Techne cat#2392, Minneapolis, MN); wortmanina, phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitor, at 2 μ M (Sigma cat#12-338, Darmstadt, Germany); TrkB receptor inhibitor (ANA-12) at 50 μ M (Tocris/Bio-Techne cat#4781, Minneapolis, MN); CCR2 receptor inhibitor (RS504393) at 50 μ M (Tocris/Bio-Techne cat#2517, Minneapolis, MN); GMPc at 40 nM (Sigma cat# G6129, Darmstadt, Germany); were added to the incubation buffer during 30 minutes to inhibit IL-1 receptor, Src, S1PR2, PI3K, TrkB and CCR2 respectively and to evaluate the effect of extracellular cGMP.

Western blott

Samples for immunoblot were processed differently to analyze the total protein content and phosphorylation ratio or to analyze the membrane expression of receptors and transporters.

Analysis of protein content and phosphorylation of residues

After the treatment, the hippocampal slices were rapidly transferred to tubes containing 200 μ l of phosphorylation buffer (Tris-HCl 66mM pH 7.4, SDS 1%, EGTA 1 mM, glycerol 10%, leupeptin 0.2 mg/ml, NaF 1 mM, sodium orthovanadate 1 mM), always kept on ice, and slices were sonicated. To measure the protein concentration by BCA, an aliquot of 3 μ l of each sample was taken. Finally, the samples were stored at -20°C for subsequent immunoblot analysis.

Analysis of membrane expression

In case of samples for membrane expression, slices from each rat must be processed in two different ways. One sample is incubated with BS3 (Pierce cat# 21580, Rockford, IL, USA), while the other one is incubated only with Krebs, as described by Boudreau et al., (2005). BS3 is a cell membrane impermeable cross-linker that binds to extracellular lysine residues of proteins. One replicate of each sample was transferred to a tube to which 200 μ l of Krebs (-) and the other replicate to another tube containing 200 μ l of Krebs with 2 mM BS3 (+). Both samples were incubated under agitation for 30 minutes at 4°C. Then, to stop the BS3 reaction, 200 μ l of 100 mM glycine in Krebs were added and incubated for 10 minutes at 4°C under agitation. Samples were then transferred to tubes containing 200 μ l of phosphorylation buffer and sonicated for 20-30 seconds. An aliquot of 3 μ l was taken to measure the protein using the BCA method. Then, the samples were stored at -20°C for western blot.

Hippocampal slices for GABA quantification

Hippocampal slices were homogenized in 100 μ l of H₂O by sonication and 10 μ l of Trifluoroacetic acid (TFA) was added to 50 μ l of homogenate to precipitate the proteins. After mixing the samples, they were centrifuged at 20,000 g (4°C) during 15 minutes. The supernatant was collected and transferred to another tube for subsequent measurement of GABA concentration by HPLC-MS. 100 μ L of NaOH were added to the pellet to measure the protein concentration using the BCA protocol.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry analysis hippocampal slices were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M PB during 24 hours and stored in a solution of 0.1 M PB with 0.01% sodium azide at 4°C. The samples were then processed using a Leica HistoCore PEARL automatic tissue processor (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany). The tissue is subjected to a dehydration process. The samples were then embedded in paraffin blocks and 5 µm sections were obtained using a microtome.

To analyze microglia activation, we analyzed the perimeter of cells labeled with the antibody against Iba1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1). This protein is only expressed in microglia in brain. Activated microglia is characterized by an amoeboid shape, unlike resting microglia, which have a more branched morphology; microglia activation leads to a decrease in the perimeter of the microglia.

A total of 10 photographs were taken of each animal at 40x magnification with ImageScope x64 software. The perimeter of Iba1-labeled cells was quantified using IpWin 32 software. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.0.1 software from the average perimeter of the microglia of each experimental group.

Astrocyte activation was assessed by staining glial fibrillary acidic protein (GFAP). GFAP is one of the intermediate filaments of the intracellular cytoskeleton, in astrocytes, and is therefore commonly used as a marker of astrocytes. The process of astrocyte activation is characterized by an increase in the number of processes, resulting in the characteristic stellate morphology of activated astrocytes that leads to an increase in the area of this cell type.

10 photos were taken at 40x magnification using ImageScope x64 software. The images were analyzed using ImageJ software: they were converted to 8 bits and the Autolocal Threshold function was applied to determine the percentage of GFAP-stained area of each image. Images were manually reviewed to ensure that the program correctly detected the GFAP mark. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.0.1. software with the data obtained from the percentage of stained area.

Hippocampal slices preparation for EPSPs and IPSPs register in the Schaffer collaterals

Briefly, hyperammonemias and control rats were decapitated and its brain was rapidly removed and dropped into ice-cold artificial cerebral spinal fluid (ACSF) recovery medium (in mM): NaCl 125, KCl 3.5, NaH₂PO₄·H₂O, glucose 10 NaHCO₃, CaCl₂·H₂O 2.4 and MgCl₂·H₂O 1,3 saturated with 95% O₂ and 5% CO₂. Then, the hippocampus was dissected and 350 µm transversal slices were obtained using a vibratome (Leica VT 1000S). The slices were maintained during 15 minutes in an interface holding chamber at 35°C for stabilization. After that, the slices were maintained in the same interface holding chamber at room temperature (25°C).

The MEA2100-system (Multi Channel Systems) was used for postsynaptic evoked potentials recordings. All recordings were performed on planar multi-electrode arrays with 120 titanium nitride electrodes (30 µm diameter) insulated with silicon nitride and internal reference electrode, arranged in a 12 x 12 matrix with 200 µm center-to-center spacing. After at least 1 hour at 25°C, some slices were placed into the well of a MEA continuously perfused with a peristaltic pump (flow rate 2,5-3 ml/min) with standard ACSF (in mM): NaCl 125, KCl 3.5, NaH₂PO₄·H₂O, glucose 10 NaHCO₃, CaCl₂·H₂O 0.5 and MgCl₂·H₂O 7 saturated with 95% O₂ and 5% CO₂. The temperature was maintained at 31 °C. The slices were immobilised by a silver ring with attached nylon mesh. The hippocampal slices were visualized by a Video Microscope Table MEA-VMTC-1 (multichannel systems). One of the 120 available planar microelectrodes was selected from the 120-switch box for tetanic stimulation, this electrode was in the medial or distal part of SR near CA1/CA3 border. A recording electrode was selected in the CA1 area. The tetanic stimulation protocol (10 minutes) consists on trains of biphasic rectangular voltaje. From -500/+500mV to -/+5000 mV, increasing 250mV in each stimulation, 3 cycles in each stimulation amplitude (10 seconds).

AMPA and NMDA recordings: The hippocampal slice was perfused during 20 minutes with standard ACSF with picrotoxin (70 mM). Then the postsynaptic evoked potentials were recorded with a tetanic stimulation during 10 minutes, curve 0. We perfused the slices with CNQX-ACSF (40 mM) solution during 15 minutes and we recorded postsynaptic evoked potentials during 10 minutes, curve 1. The difference between C₁ and C₂ evidence the AMPA response,

$$R_{AMPA} = C_1 - C_2$$

where R_{AMPA} is the curve derived from the AMPA receptor response; es la curva derivada de la respuesta de los receptores AMPA; C_1 , potential obtained by inhibiting GABA_A receptors with picrotoxin; and C_2 , in which both GABA_A by picrotoxine and AMPA receptors by CNQX are inhibited.

The hippocampus was then perfused with an ACSF solution with a low magnesium concentration during 30 minutes. For the low magnesium-solution, the concentration of MgCl₂·H₂O was lowered to 0.1 mM and the concentration of CaCl₂·H₂O was raised to 2,4 mM in the ACSF. After 30 minutes of low magnesium-solution perfusion, the postsynaptic evoked potentials were recorded during 10 minutes, curve 2. Finally, the hippocampal slice was perfused with AP5-ACSF (25 mM) during 15 minutes and we recorded the postsynaptic evoked potentials (10 minutes), curve 4.

$$R_{NMDA} = C_3 - C_4$$

where R_{NMDA} is the curve derived from the NMDA receptor response; C_2 , potential obtained by inhibiting GABA_A receptors with picrotoxin and AMPA receptors with CNQX and keeping active NMDA receptors with a low concentration of magnesium; and C_4 , potential obtained by inhibiting GABA_A receptors with picrotoxin, AMPA receptors with CNQX and NMDA receptors with AP5.

All treatments were continuously oxygenated. In case of extracellular cGMP-treated slices, the same procedure was followed, but the solutions additionally contained 40 nM cGMP. The subtraction of input-output curve 1, in which GABA_A receptors are inhibited by picrotoxin, minus curve 2, in which GABA_A receptors remain inhibited but, in addition, AMPA receptors are inhibited, gives the contribution of AMPARs to the EPSPs. On the other hand, the subtraction of curve 3 in which GABA_A and AMPA receptors are inhibited and, in addition, the magnesium concentration is lowered, minus curve 4 in which NMDA are inhibited by AP5, give us the contribution of NMDA receptors to the EPSPs.

GABA_A recordings: the slices were perfused with standard ACSF, solution A, during 20 minutes in order not to inhibit any receptors and we recorded the curve 0 during 10 minutes. Then, slices were perfused with solution B that containing ACSF and picrotoxin (70 mM) to inhibit GABA_A receptors and the curve 1 was recorded for 10 minutes. The subtraction of curve 0, in which no receptors are inhibited, minus curve 1, in which GABA_A receptors are inhibited by picrotoxin, indicates the GABA_A response,

$$R_{GABA} = C_0 - C_1$$

where R_{GABA} is the curve derived from the GABA_A receptor response; C_0 , potential obtained without inhibits receptors; and C_1 , in which GABA_A are inhibited by picrotoxine.

Digitized recordings were imported to the MATLAB (The MathWorks, Natick, MA, USA) for analyses. All the analysis were performed using built-in self-developed routines.

First, we reconstructed the input/output curves derived from the stimulation protocol. The individual amplitude measures were pooled in groups of 5 values, leading to a sigmoidal-like distribution depending on the stimulation intensity. Thus, we fitted the experimental dots' distribution to a sigmoidal function defined by amplitude (A [mV], dependent variable) and stimulus intensity (I [mA], independent variable):

$$A(I) = A_0 + \frac{A_{max} - A_0}{1 + e^{-k(I-I_{50})}}$$

where A_0 and A_{max} are the lower and higher asymptotic values, respectively; I_{50} is the stimulus intensity producing a response half-way between both asymptotic values; and k represents the slope around the inflection point. Response amplitudes were baseline-corrected to the first intensity value (1250 mV). A least square regression was applied, with adjusted R^2 to quantify the goodness of the fit. The variables of the excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) assessed

The same sigmoidal fitting was used for positive and negative components and desensitization area. For delay parameter we used a linear fitting.

As we noted, the ascending stimulations led to the presence of contiguous evoked EPSPs in those stimulations with the highest intensities, i.e., a temporal summation of a EPSPs' sequence. Thus, we applied a particular analysis to study each pulse separately. We used this fact to study the effect of our experimental conditions on the glutamatergic synaptic integration

We fitted the temporal components of the postsynaptic potential with gaussian (2) and exponential (3) theoretical functions,

$$V_g(t) = \exp\left(-\frac{t-p}{0.601 \cdot w}\right)^2 \quad (2)$$

where t is the time independent variable, p the time position of the gaussian EPSP and w the half-width of the curve; and

$$V_e(t) = \exp(-\tau_1 \cdot t) \cdot (1 - \exp(-\tau_2 \cdot t)) \quad (3)$$

where t is the time variable, τ_1 is the curve rise constant and τ_2 represents the curve decay constant. Thus, each EPSP of the global postsynaptic response was characterized by the time of response, the duration of the response and the kinetics of the postsynaptic depolarization and repolarization.

RESULTS AND DISCUSSION CHAPTER 1

Hyperammonemia alters the amplitude of the AMPA and NMDA receptors postsynaptic response in hippocampus. Extracellular cGMP reverses such alterations

The main goal of our study was to characterize the response of the neuronal CA1 assembly to its activation under hyperammonemic conditions. To analyse the basal synaptic transmission, field potential recordings in hippocampal slices were performed at Schaffer-CA1 collateral pyramidal synapses. The input-output correlation of excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) was calculated to measure the efficiency of the excitatory synaptic transmission, isolating the effect on AMPA and NMDA receptors, as previously described.

We based the EPSP measurements on various parameters on the mean curves of the postsynaptic response, with the aim of selecting the features that best reveals differential changes between conditions. The amplitude of the synaptic response led to a clear characterization of the behaviour of glutamate receptors. The fitting of sigmoidal curves to the pooled values, as an approximation of the I/O response, yielded characteristic parameters: the maximum amplitude (A_{max}), k constant and the voltage value which evoked the middle response (S_{50}), with R^2 values > 0.9 , thereby demonstrating the goodness of the fitting.

Slices from hyperammonemic rats showed lower amplitude of the synaptic AMPA response than slices from control rats either. The addition of extracellular cGMP increased the amplitude in hyperammonemic rats leading to a value similar to control rats. Extracellular cGMP decreased the amplitude of AMPA response in control rats reaching values similar to hyperammonemic rats.

Concerning the amplitude of the NMDA response, hyperammonemia showed higher amplitude than control rats and extracellular cGMP normalized it. In control rats, extracellular cGMP decreased the amplitude of NMDA response.

These findings indicate that the NMDA synaptic responses in CA1 are increased by hyperammonemia, whereas the AMPA synaptic responses are reduced. In both cases, extracellular cGMP reverses these alterations.

Effects of hyperammonemia and extracellular cGMP on the positive and negative component and the desensitization area of AMPA and NMDA postsynaptic responses in hippocampus

We decomposed the entire post-synaptic potential response of AMPA and NMDA receptors into its different stages: positive and negative component of the curve, desensitization area and delay. This approach allows us to understand better which features of AMPA and NMDA receptor function are affected by hyperammonemia and extracellular cGMP.

The positive component of the curve in AMPA response was not affected by hyperammonemia and no effects of extracellular cGMP were found. With the same comparisons between I/O model curves, the negative component in AMPA response is altered by hyperammonemia. Extracellular cGMP increased the negative component in hyperammonemia. Extracellular cGMP in the control group increases the AMPA negative component.

We also analysed the desensitization area, another component of the post-synaptic potential. In the case of the AMPA response, neither hyperammonemia nor extracellular cGMP affect the desensitization area. Concerning the delay of the AMPA response, hyperammonemia decrease it. Extracellular cGMP did not affect the delay in the hyperammonemic group nor in slices from control rats.

In contrast to what happens with the positive component of the AMPA curve, hyperammonemia increased the positive component of the curve in the NMDA response and extracellular cGMP decreased it in hyperammonemia. In control slices, extracellular cGMP decreases the NMDA positive component.

Concerning the negative component of NMDA curve, hyperammonemia increased it significantly compared to the control group. No noteworthy changes were induced by extracellular cGMP. Extracellular cGMP in control slices increases the negative component of the NMDA response.

On the other hand, hyperammonemia increased the desensitization area of the NMDA response and extracellular cGMP increased it even more. Extracellular cGMP in control slices decreases the desensitization area. Neither hyperammonemia nor extracellular cGMP affect the NMDA delay.

Taken together, these findings indicate that hyperammonemia increases the negative component of AMPA curves and all the parameters in the NMDA curves. Extracellular cGMP increases the negative component in AMPA receptors and decreases the positive component in NMDA receptors.

Input-output responses by intervals of stimulation

To study in more detail the effects of hyperammonemia and extracellular cGMP on the evoked potentials from AMPA and NMDA receptors we analyzed the I/O curves by ranges of stimulation intensities. We evaluated the presence of consecutive EPSPs in the average responses of each of these stimulation intervals: 1250-2500 mV (first range), 2750-4000 mV (second range), 4225-5000 mV (third range).

The fitting of the values to Gaussian and exponential curves, as an approximation to represent the different EPSPs, yielded four characteristic parameters for Gaussian curves: time position (time at which it reaches the maximum amplitude), amplitude, width and area of the EPSP. For EPSPs adjusted to an exponential curve, we obtain four characteristic parameters: τ_1 (rising velocity), amplitude of the EPSP, τ_2 (decay velocity) and area of the EPSP, the R² values were > 0.9, thereby demonstrating the goodness of the fitting. In the case of delay, the fitting of the values to a linear curve yielded two characteristic parameters: where the line crosses the y-axis of a graph ($Y_{\text{intercept}}$) and the slope (S).

Hyperammonemia decreases the amplitude of the AMPA responses

In the first range (1250-2500 mV) we only detected one EPSP. Hyperammonemia seems to decrease the amplitude of this first EPSP, while treatment of slices from hyperammonemic rats with extracellular cGMP seems to reverse this alteration. However no statistically significant differences were found. Additionally, extracellular cGMP in control slices delays the appearance of this peak and increases width and τ_2 compared to the untreated control group. However, neither hyperammonemia nor treatment with extracellular cGMP has an effect on area and τ_1 .

In the case of the second range (2750-4000 mV), two EPSPs were detected for AMPA responses. In the first EPSP, hyperammonemia decreases amplitude compared to control group and extracellular cGMP reverses this alteration. Hyperammonemia does not affect the other variables studied. In control slices extracellular cGMP delays the appearance of

the first EPSP, increases width, area and decreases τ_1 . Although extracellular cGMP in the control group tends to decrease amplitude, the differences are not statistically significant.

With regard to the second EPSP, hyperammonemia decreases the amplitude and area of the second EPSP and extracellular cGMP reverses these alterations. Hyperammonemia does not affect the other variables. Extracellular cGMP prevents the appearance of this second EPSP in control slices.

In the third range (4225-5000 mV), we detected three EPSPs. Concerning the first EPSP, hyperammonemia decreases amplitude, which is normalized by treatment with extracellular cGMP. Extracellular cGMP in control slices delays the appearance of the first EPSP and increases width, area and τ_2 ($F = 4.913$; $p < 0.05$), whereas decreases τ .

On the other hand, extracellular cGMP eliminates the second EPSP in control slices. Hyperammonemia decreases the amplitude of this second EPSP and extracellular cGMP normalized it. No statistically significant differences were found in any of the other variables.

The third EPSP was also absent in the cGMP-treated control group and hyperammonemia causes this EPSP to appear earlier in time and decreases amplitude ($F = 5.55$; $p < 0.05$) and area. Extracellular cGMP seems to reverse these alterations, but the differences are not statistically significant.

Hyperammonemia increases several of the NMDA response parameters.

In the first range (1250-2500 mV) we only detected one NMDA EPSP, but not statistically significant differences were detected between groups.

In the second range (2750-4000 mV) we detected two EPSPs. Concerning the first EPSP, hyperammonemia delays its appearance, increases amplitude, width and τ_2 . Extracellular cGMP normalizes these alterations produced by hyperammonemia. Extracellular cGMP in control slices delays the appearance of the first EPSP, increases width, amplitude and τ_2 .

On the other hand, extracellular cGMP eliminates the second EPSP in control slices. Hyperammonemia has not any effect on the variables studied.

In the third range (4225-5000 mV), we detected three EPSPs. Hyperammonemia delays the appearance of the first EPSP, increases width, amplitude, τ_2 and area. Extracellular cGMP reverses these alterations in width, amplitude, τ_2 and area and makes the first EPSP to appear earlier in time. Extracellular cGMP in control slices delays the appearance of the first EPSP and increases width and τ_2 .

As previously, extracellular cGMP in control slices prevents the appearance of the second and third EPSPs and hyperammonemia increases τ_1 which is normalized by extracellular cGMP.

DISCUSSION

The results reported provide relevant new contributions about how chronic hyperammonemia impairs the synaptic responses mediated by AMPA and NMDA receptors in hippocampus. Moreover, we also saw how extracellular cGMP reverses some of these alterations and modulate AMPA and NMDA responses.

Previous studies have shown that extracellular cGMP levels are reduced in brain in vivo in hyperammonemic rats and that increasing extracellular cGMP by intracerebral administration restores spatial learning through the normalization of membrane expression of AMPA receptors in hippocampus (Cabrera-Pastor et al., 2016a). The molecular mechanisms by which extracellular cGMP is reducing neuroinflammation and normalizing the membrane expression of AMPA and NMDA receptors and the underlying signal transduction pathways have been unveiled in freshly isolated hippocampal slices from hyperammonemic rats (Taoro-Gonzalez et al., 2018). However, the effect of hyperammonemia and extracellular cGMP on the receptors function remained unknown.

The results presented here show that chronic hyperammonemia decreases the amplitude and the delay of the AMPA postsynaptic response and extracellular cGMP normalizes the amplitude, but not the delay. Extracellular cGMP seems to reverse the amplitude by increasing the negative component. Modulation of membrane expression of AMPA receptors plays a main role in synaptic plasticity in hippocampus (Anggono, 2012) and in long-term potentiation (LTP) (Malinow, 2003). LTP in hippocampus is considered the bases for spatial learning and memory (Richter-Levin et al., 1995). As previously reported, chronic hyperammonemia impairs LTP in hippocampus (Muñoz et al., MD 2000; Monfort et al., 2002b) and spatial learning and memory (Hernandez-Rabaza et al., 2016). Altogether, these data support that in hyperammonemic rats, altered membrane expression of AMPA receptor subunits lead to a decreased amplitude and delay of the AMPA receptors postsynaptic response in hippocampus, which would lead to impairment of LTP and of spatial learning and memory. Extracellular cGMP would normalize the amplitude of the AMPA receptors postsynaptic response by increasing the negative component of the I/O

curve. A plausible explanation for why extracellular cGMP would normalize the amplitude would be the normalization of the membrane expression of AMPA receptor subunits, as reported by Cabrera-Pastor et al (2016) and Taoro-Gonzalez et al (2019a).

The exocytosis of AMPA receptors to the plasma membrane is a key mechanism in modulation of synaptic strength. In the principal neurons of the hippocampus, the predominant AMPA receptors contain GluA2 (GluA1/2 or GluA2/3) and only a small subpopulation of AMPA receptors is GluA1 homomeric (Sheng et al., 1994; Wenthold et al., 1996). AMPA receptors that contain GluA2 are impermeable to calcium, providing to these channels a linear current–voltage relationship. In contrast, GluA1-homomeric receptors have higher calcium permeability, larger channel conductance, and a rectifying I–V relationship (Isaac et al., 2007; Coombs and Cull-Candy, 2009). This GluA1 homomeric receptors are present in the intracellular reserve pools of AMPA receptors in the hippocampal CA1 neurons under basal conditions and can be rapidly translocated into synapses under certain physiological and pathological conditions. GluA1 homomeric AMPARs play critical roles in mediating various forms of synaptic plasticity, particularly in the hippocampus, including long-term potentiation, long-term depression (LTD), and homeostatic synaptic scaling (Sutton et al., 2006; Sanderson et al., 2016). It has been shown that the stimulation leads to a structural enlargement of the spine head and the recruitment of Ca^{2+} -permeable AMPA receptors, with the exocytosis of GluA1, a key component of the AMPA response, LTP and memory and learning (Kopec et al., 2007; Fortin et al., 2010; Charter and Goda, 2014). Membrane insertion of GluA1 is required to increase in spine size, both in hippocampal slice cultures and in vivo (Kopec et al., 2007). In fact, the overexpression of GluA1 increases spine head area, mEPSC amplitude and synaptic expression of Ca^{2+} -permeable AMPARs (Fortin et al., 2010). Synaptic insertion of GluA1 has two functions: increasing synaptic strength via its ligand-gated ion channel, and a structural role through the stabilization of its C terminus that permits an increase in spine size (Kopec et al., 2007). In hyperammonemia, membrane expression of GluA1 is decreased, which could be leading to a reduction of the AMPA receptors synaptic response, which would explain the reduced amplitude and delays of AMPA EPSPs, since GluA1 containing receptors have a high conductance and a I-V rectifying relationship. Extracellular cGMP normalizes the membrane expression of GluA1 (Cabrera-Pastor et al, 2016a; Taoro-Gonzalez et al, 2019a) and, as a consequence, the function of AMPA receptors. Specifically, in hyperammonemia Src phosphorylates GluN2B at Ser1303, reducing membrane expression of CaMKII and phosphorylation of GluA1 at Ser831 and, as a consequence, the membrane expression (Taoro-Gonzalez et al., 2018).

On the other hand, extracellular cGMP in control slices reduces the amplitude of AMPA I/O curves and at the same time, increases the negative component (depolarization area). It can be a consequence of the depressed excitatory synaptic transmission in CA1 hippocampal neurons by cGMP through a phosphorylation-independent manner (Lei et al., 2000).

We also show that chronic hyperammonemia increases the amplitude of NMDA receptors postsynaptic response, and as a consequence the negative component and the desensitization area, from I/O curves in hippocampus. Moreover, extracellular cGMP normalizes the amplitude of the NMDA response.

The number and subtype composition of NMDA receptors at synapses determines their functional properties and its role in learning and memory. Different subunit composition of NMDA receptors and biophysical properties can be segregated in an input-specific manner (Carta et al., 2018). GluN2A and GluN2B are the predominant subunits in the hippocampus and confer distinct physiological and molecular properties. GluN2B-containing receptors have slower channel kinetics and lower open probabilities than those containing GluN2A. As GluA1 of AMPA receptors, GluN2A and GluN2B are crucial in LTP and LTD and, as a consequence, in behavioral and memory plasticity (Liu et al., 2004; Massey et al., 2004). Some studies demonstrate that a decrease of GluN2B membrane expression, age-related loss, or decreased tyrosine phosphorylation of GluN2B impair hippocampal and cortical LTP and learning (Clayton et al., 2002; Takehara et al., 2004; Nakazawa et al., 2006; Gardoni et al., 2009). In contrast, the overexpression of GluN2B or GluN2B hypodegradation enhances hippocampal LTP and learning (Tang et al., 1999; Hawasli et al., 2007). In addition, GluN2B-containing receptors are crucial for evoked or spontaneous release of glutamate at hippocampal CA3–CA1 synapses. In fact, the antagonists of GluN2B, completely prevent tonic activation and the facilitation of evoked or spontaneous glutamate release (Prius-Mengual et al., 2018). An overexpression of GluN2B would also promote a greater release of glutamate and, therefore, a greater response of NMDA receptors. Regarding to GluN2A, the membrane expression of GluN1 and GluN2A subunits increases in the synaptic fraction, in a PKC and Src kinases dependent manner, in slices from 6- to 8-week-old rats after plasticity induction, and this is a persistent postsynaptic modification (Grosshans et al., 2002).

In chronic hyperammonemia the membrane expression of NMDA subunits is increased (GluN1, GluN2A, GluN2B) in hippocampus (Cabrera-Pastor et al., 2016a; Taoro-Gonzalez et al., 2019b) which would contribute to the enhanced NMDA response observed in the present study.

Synaptic strength is determined by drive of release, release probability, and quantal transmitter content that is released and it is maintained by the binding of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) to the NMDA-type glutamate receptor subunit GluN2B, which in turn is required in learning and memory processes (Barcomb et al., 2016). Previously we reported that extracellular cGMP normalized the membrane expression of CaMKII and of the GluN2B subunit in hippocampus from hyperammonemic rats (Taoro-Gonzalez et al., 2018). This could contribute to the restoration of the amplitude of the NMDA receptor response by extracellular cGMP in hyperammonemic rats.

Previous studies have shown that the amplitude of the evoked fast EPSPs is decreased by NH_4Cl in a concentration-dependent manner in rat hippocampal CA1 neurons (Kameyama et al., 2020) and under acute hyperammonemia, the activity of NMDA receptors is increased, while the activity of AMPA receptors is decreased (Kosenkov et al., 2018). This agrees with the data reported here showing that the NMDA synaptic responses in CA1 region are increased by chronic hyperammonemia, while the AMPA synaptic responses are decreased.

AMPA receptor activation may lead to NMDA receptor activation (Cabrera-Pastor et al., 2012; Xin et al., 2005; Salonen et al., 2006). Activation of AMPA receptors allows the entry of Na^+ . Receptors lacking GluA2 subunits are also permeable to Ca^{2+} . There are both high- and low-affinity AMPA receptors in the brain (Liu et al., 2005, Geieger et al., 1995). In cerebellum it has been shown that in hyperammonemic rats, high affinity AMPA receptors induces a mild increase in calcium but a strong increase in Na^+ and this results in potentiation of NMDA receptors activation due both to reduced inhibition by calcium and enhanced activation by sodium (Cabrera-Pastor et al., 2012). In hippocampus previous studies have shown that in hippocampus from rats with hyperammonemia, the membrane expression of GluA2 is increased (Taoro-Gonzalez et al., 2018). These could contribute to increase the entry of Na^+ through AMPA leading to neuronal depolarization and increasing the NMDA response.

On the other hand, the results of the AMPA I/O curves by ranges of stimulation, showed that increasing intensity of stimulation elicits contiguous successive evoked EPSPs. We have observed a short-term depression in the AMPA postsynaptic currents under these conditions. This phenomenon has been previously described (Kielland and Heggelund, 2002), which may be implicated in the processes of gain control and temporal filtering by synaptic transmission (Markram and Tsodyks, 1996; Chance et al. 1998; Fortune and Rose, 2000). Kielland and Heggelund (2002) demonstrated that the AMPA component is more strongly depressed than the NMDA, this short-term depression phenomenon may explain why in the case of AMPA receptors there is a decrease in the amplitude of the second EPSPs of the second range and in the second and third EPSPs in the third range, whereas there are no difference in case of NMDA.

Hyperammonemia decreases the amplitude as in the first analysis, but the differences are only statistically significant from the second range of stimulation onwards, i.e., at stimulation intensities higher than 2750 mV, and extracellular cGMP normalize it. In addition, hyperammonemia also decreases the amplitude of the second EPSP in the second range of stimulation (2750-4000 mV) and in the second and third EPSPs of the third range of stimulation. These results suggest that the alterations of AMPA receptor function are accentuated as the stimulation increases and they are persistent in time and with the generation of different potentials. In hyperammonemia membrane expression of GluA1 is reduced (Taoro-González et al., 2018) and, as previously commented, AMPA receptors that contain GluA1 are recruited to the synaptic membrane as stimulation increases and have higher Ca^{2+} permeability and conductance. The

decrease of GluA1 membrane expression could alter the AMPA response, especially the EPSPs amplitude at increasing stimulation intensities, which would induce an exocytosis of GluA1 containing receptors to the synapsis.

An interesting result is the effect of extracellular cGMP on slices from control rats. Addition of cGMP delays the appearance of the first EPSP at all stimulation intensities, indicating that extracellular cGMP induces a slower kinetic response of CA1 neurons that also respond later in time. But, at the same time, cGMP in slices from control rats increases width, which suggests, together with the increase in τ_2 , that there is a delay in the return to the resting potential. This agrees with the above results showing that extracellular cGMP decreases the AMPA amplitude while increases the negative component. The increase in width and τ_2 lead to a rise in the depolarizing potential area (negative component). Another interesting finding is that extracellular cGMP in control slices abolish the appearance of the second and third EPSPs. One possible explanation is that cGMP slows down the AMPA response.

Concerning the results of the study of the NMDA I/O curves by ranges of stimulation, unlike the AMPA receptors, different variables showed statistically significant differences between the control group and the hyperammonemia group at all stimulation intensity ranges. Hyperammonemia delays the response of NMDA receptors, the first peak appears later (time position) in the three intensity ranges. In addition, hyperammonemia increases amplitude, width and τ_2 of the first peak at all intensities and extracellular cGMP normalizes all these variables: amplitude, width, τ_2 and time position. The delay in the response may be caused by a lower AMPA response; NMDA activation requires a depolarization that releases the Mg^{2+} that blocks the channel and this requires the previous activation of AMPA receptors. Hyperammonemia decreases the AMPA receptor postsynaptic response, which may delay the activation of NMDA receptors. The increase in amplitude and width is consistent with the results obtained above and can be the result of the altered membrane expression of NMDA receptor subunits under hyperammonemic conditions (GluN1, GluN2A and GluN2B). Concerning the return to the resting potential, several studies show that an increase in GluN2B subunits generate EPSCs with slow decay kinetics (Tovar and Westbrook 1999; Vicini et al. 1998). The increased membrane expression of GluN2B in hyperammonemia could explain the increase of amplitude and width. Extracellular cGMP could be reversing the alterations in amplitude, width and τ_2 by normalizing the membrane expression of GluN2B and GluN2A receptor subunit, as previously reported by Taoro-Gonzalez et al. (2019a).

Extracellular cGMP in slices from control rats delays the appearance of the NMDA first peak, but in this case, we found only statistically significant differences from the second curve onwards, but not in the first curve with lower stimulations. cGMP increases width and τ_2 ; it means that there is an acceleration in the return to the resting potential, possibly due to the increase in

membrane expression of GluN1 produced by extracellular cGMP in control rats (Cabrera-Pastor et al., 2016a). As in case of AMPA receptors, extracellular cGMP in control rats eliminates the appearance of the second EPSP of the second range of intensities and the second and the third EPSP of the third range of intensities, possibly due to the slowing of the NMDA response caused by extracellular cGMP.

In summary, the results reported show that chronic hyperammonemia reduces activation of AMPA receptors in hippocampus by reducing the amplitude of the response. In contrast, hyperammonemia delays the appearance of NMDA responses, likely due to the reduced activation of AMPA receptors, but increases activation of NMDA receptors by increasing the amplitude and the desensitization area.

Increased activation of NMDA receptors is a main contributor to the deleterious effects in both acute ammonia toxicity, resulting in death, and in chronic moderate hyperammonemia, resulting in cognitive impairment.

Acute ammonia intoxication with large doses of ammonia leads to activation of NMDA receptors in brain (Hermenegildo et al, 2000) and to rapid death, which is nearly completely prevented in rats and mice by blocking NMDA receptors with selective antagonists (Marcaida et al,1992; Hermenegildo et al, 1996). These studies show that in acute ammonia intoxication with large doses of ammonia, ammonia-induced death is mediated mainly by an excitotoxic mechanism similar to that occurring for example in cerebral ischemia (Felipo et al, 1998) which is mediated by excessive activation of NMDA receptors.

In chronic hyperammonemia, with lower ammonia concentrations, activation of NMDA receptors is also increased (Eimlili et al, 2010), but not enough to induce death. However, chronic hyperammonemia allows adaptive mechanisms to occur to prevent the damage induced by excessive NMDA receptor activation. These adaptive mechanisms include reduced activation of nitric oxide synthase in response to NMDA receptors activation. This leads to impaired function of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway, which in turn leads to impaired cognitive function (Hermenegildo et al, 1998; Llansola et al, 2007; Monfort et al, 2009).

The results reported here provide the bases to understand some of the mechanisms underlying this enhanced NMDA response and the associated deleterious consequences. Moreover, we also show the mechanisms by which enhancing extracellular cGMP restores both AMPA and NMDA responses. This sheds light on possible therapeutic approaches in pathologies in which the activation of AMPA receptors is reduced or activation of NMDA receptors is enhanced. This occurs in many neurological and neurodegenerative diseases as well as in hyperammonemia and hepatic encephalopathy.

RESULTS AND DISCUSSION CHAPTER 2

Effects of hyperammonemia and extracellular cGMP on the function OF GABA_A receptors

The main objective of this chapter was to characterize the effects of hyperammonemia and extracellular cGMP on the response of the CA1 neuronal ensemble to GABA_A receptors activation. By applying depolarizing stimuli, we studied whether hyperammonemia induces changes in GABA_A receptor-mediated synaptic responses.

Field potential recordings were performed at Schaffer-CA1 collateral synapses in hippocampal slices, as for AMPA and NMDA receptors. The input-output correlation of inhibitory postsynaptic potentials (IPSPs) was calculated to measure the efficiency of GABA_A receptor-mediated synaptic transmission.

As for AMPA and NMDA responses, we also analysed several parameters for GABA_A receptor-mediated IPSPs: amplitude, positive component (hyperpolarization area), negative component (depolarization area), desensitization area and delay.

Hyperammonemia increases the amplitude of GABA_A responses, compared to the control group, and extracellular cGMP normalizes this alteration, reducing the amplitude to values similar to those found in control rats. Addition of extracellular cGMP to hippocampal slices from control rats increases the amplitude of the GABA_A IPSPs, to similar values to those observed in slices from hyperammonemic rats.

Hyperammonemia increases the positive component, which reflects an increase in the hyperpolarization area, and extracellular cGMP reverses this alteration, decreasing the hyperpolarization area to values similar to those observed in the control group. Addition of extracellular cGMP to slices from control rats increases the positive.

In addition, hyperammonemia increases the negative component and reduces the desensitization area compared to the control group. Extracellular cGMP reverses the decrease in the desensitization area, returning the area to similar values to those found in control group. In contrast, extracellular cGMP does not normalize the negative component. Addition of extracellular cGMP to slices from control rats increases the negative component and decreases the desensitization area.

Input-output GABA_A responses by intervals of stimulation

To study in more detail the effects of hyperammonemia and extracellular cGMP on the evoked potentials from GABA_A receptors we analyzed the I/O curves by ranges of stimulation intensities.

We evaluated the presence of consecutive EPSPs in the average responses of each of these stimulation intervals: 1250-2500 mV (first range), 2750-4000 mV (second range), 4225-5000 mV (third range).

The fitting of the values to Gaussian and exponential curves, as an approximation to represent the different EPSPs, yielded four characteristic parameters for Gaussian curves: time position (time at which it reaches the maximum amplitude), amplitude, width and area of the EPSP. For EPSPs adjusted to an exponential curve, we obtain four characteristic parameters: τ_1 (rising velocity), amplitude of the EPSP, τ_2 (decay velocity) and area of the EPSP, the R² values were > 0.9, thereby demonstrating the goodness of the fitting. In the case of delay, the fitting of the values to a linear curve yielded two characteristic parameters: where the line crosses the y-axis of a graph (Yintercept) and the slope (S).

Hyperammonemia delays the IPSP in the first range of stimulation and increases amplitude, area and width, as well as the rates of fall and return to the resting state. Extracellular cGMP normalizes some of these alterations.

Hyperammonemia delays the appearance of IPSP in the first range of stimulation and increases the amplitude, area and width, as well as the rates of decay and return to the resting state. Extracellular cGMP normalizes some of these alterations. In addition, hyperammonemia increases the amplitude and width of the first IPSP compared to the control group and extracellular cGMP reverses the increase in amplitude. Hyperammonemia also increases the depolarization area of GABA_A IPSPs and extracellular cGMP reverses this alteration. Hyperammonemia increases the rate at which the maximum amplitude is reached, as well as the rate of return to the resting state and extracellular cGMP does not reverse the increase in τ_2 or τ_1 . Although extracellular cGMP in the control group seems to increase width, area, τ_1 and τ_2 , we did not find significant differences.

Even if we detected two IPSPs, neither hyperammonemia nor extracellular cGMP affect any of the parameters studied in the second IPSPs in the first range of stimulation.

Hyperammonemia increases the amplitude, width, area and τ_2 IPSP of the response in the second stimulation range (2750-4000 mV). Extracellular cGMP normalizes some of these alterations.

Two or three IPSPs were detected in all experimental groups. Hyperammonemia delays the appearance of IPSP and increases its amplitude, width, area and τ_2 . Extracellular cGMP normalizes amplitude, width and area, but not the increase in τ_2 .

Addition of extracellular cGMP to slices from control rats increases width and τ_2 . In addition, extracellular cGMP in slices from control rats tends to delay the appearance of the IPSP and to increase width and area, but the differences are not significant.

Neither hyperammonemia nor extracellular cGMP affect any of the variables studied in the second and third IPSPs in the second stimulation range.

Hyperammonemia increases the amplitude, width, area and τ_2 IPSP of the response in the third stimulation range of stimulation (4250-5000 mV). Extracellular cGMP normalizes some of these alterations.

At high stimulation intensities (4225 mV to 5000 mV) two or three IPSPs were detected. Hyperammonemia delays the appearance of IPSP, increases amplitude, area and width and tends to increase τ_2 . Extracellular cGMP reverses the increase in amplitude, area and normalizes the time at which the maximum amplitude is reached (temporal position of the IPSP). In addition, extracellular cGMP tends to reverse the increase in IPSP width. No effect on τ_2 was detected.

Neither hyperammonemia nor extracellular cGMP affects any of the parameters studied in the second and third IPSPs in the third stimulation range.

Effect of hyperammonemia and extracellular cGMP on GABAergic neurotransmission in hippocampus

Total GABA concentration was measured by liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) in hippocampal slices. Hyperammonemia decreases total GABA content and addition of extracellular cGMP reverses this alteration, reducing GABA content to normal levels.

GABA is synthesized from glutamate by decarboxylation by the enzyme glutamate decarboxylase (GAD). There are two main types GAD in the CNS: GAD-65 and GAD-67; the total content of these enzymes in hippocampus was analysed by immunoblot. Hyperammonemia does not alter the content of GAD-65 compared to control rats, and extracellular cGMP does not alter the GAD-65 content either in the slices from control or hyperammonemic rats. However, hyperammonemia decreases the GAD-67 content compared to the control group. Extracellular cGMP reverses this decrease, increasing the total GAD-67 content to values similar to those of control rats. Extracellular cGMP also increases GAD-67 content in the control group. Although hyperammonemia decreases GAD67 and GABA content, GABA_A receptor is activated by extracellular GABA. Its concentration was analyzed by microdialysis in vivo. Hyperammonemia increases extracellular GABA compared to control rats, so there is more GABA available for binding to GABA_A receptors.

Hyperammonemia alters membrane expression of some AMPA and NMDA receptor subunits, as well as the $\alpha 1$ and $\alpha 5$ subunits of GABA_A receptors (Cabrera-Pastor et al., 2016a; Hernández-Rabaza et al., 2016a; Taoro-González et al., 2018; Taoro-González et al., 2019). However, it was not known if hyperammonemia affects the membrane expression of other GABA_A receptor subunits. To study how hyperammonemia and extracellular cGMP affect GABAergic neurotransmission, the membrane expression of different GABA_A receptor subunits was analyzed by immunoblot using the BS3 crosslinker procedure as described in methods.

Hyperammonemia increases the membrane expression of the $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ and δ subunit of GABA_A receptors and extracellular cGMP reverses these alterations. Extracellular cGMP in control rats does not alter the membrane expression of $\alpha 1$, $\beta 3$ and δ , whereas seems to decrease the membrane expression of $\alpha 2$ and $\gamma 2$. Hyperammonemia reduces membrane expression of the $\alpha 5$ subunit of GABA_A receptors and, in this case, extracellular cGMP is not able to normalize the membrane expression. Moreover, extracellular cGMP in the control group also decreases the membrane expression of $\alpha 5$.

One of the main mechanisms of modulation of membrane expression of GABA_A receptor is by phosphorylation. The $\beta 3$ subunit of the GABA_A receptor phosphorylation at serine residues 408-409 prevents the AP2 binding and, as a consequence, reduces the GABA_A receptor endocytosis. Hyperammonemia increases $\beta 3$ phosphorylation at S408-S409 compared to the control group and extracellular cGMP normalizes $\beta 3$ phosphorylation at these two residues. Addition of extracellular cGMP to slices from control rats tends to decrease the phosphorylation of $\beta 3$ at residues S408-S409, however, the differences are not statistically significant.

Gephyrin is a structural protein that binds synaptic proteins to the cytoskeleton. It is indispensable for the clustering of GABA_A receptors at inhibitory synapses. The total content of gephyrin was analysed by western blot. Hyperammonemia increases total gephyrin content in hippocampus and extracellular cGMP reverses this increase, decreasing total gephyrin content to values similar to those present in control rats. Extracellular cGMP in control rats does not alter the content of gephyrin.

The elimination of GABA from the extracellular space is carried out by specific transporters. The GABA transporters are mainly responsible for maintaining proper levels of extracellular GABA to avoid the tonic activation of GABA receptors. These transporters are located both synaptically and extrasynaptically. We analysed both the total content and the membrane expression of the two main GABA transporters in the CNS: GAT-1, which is mainly expressed in neurons, but also in glia, and GAT-3, which is expressed only in astrocytes. The total content of both GAT-1 and GAT-3 are increased in chronic hyperammonemia and extracellular cGMP normalizes the total content of both GAT-1 and GAT-3. Extracellular cGMP in control rats does not alter the total

content of these transporters. In contrast, hyperammonemia decreases the membrane expression of GAT-1 and GAT-3 and extracellular cGMP normalizes these alterations. In control rats extracellular cGMP decreases the membrane expression of GAT-1, but has no effect on GAT-3 membrane expression.

Cl⁻ transporters play a key role in the modulation of GABAergic neurotransmission, as regulators of Cl⁻ homeostasis. KCC2 extracts Cl⁻ from the cytosol (mainly in neurons) to the extracellular medium, whereas NKCC1 captures Cl⁻ from the extracellular medium for incorporation into astrocytes. The outflow of Cl⁻ ion from the cell to extracellular medium produces a decrease in intracellular Cl⁻ levels, below those in the extracellular fluid, so that activation of the GABA receptor will produce hyperpolarization of the membrane. Under these conditions, when the GABA_A receptor is activated, chloride ions flow into the cell producing the classic postsynaptic hyperpolarization. We have analysed the membrane expression of the two main Cl⁻ transporters in the hippocampus: NKCC1, which is mainly expressed in glia, but also in neurons, and KCC2, whose expression is restricted to pyramidal neurons and interneurons in the hippocampus. Hyperammonemia increases membrane expression of NKCC1 and extracellular cGMP reverses this alteration. In contrast, hyperammonemia decreases the membrane expression of KCC2, and extracellular cGMP increases KCC2 expression to levels similar to those observed in the control group. Extracellular cGMP in the control group decreased membrane expression of KCC2.

The results obtained show that chronic hyperammonemia increases the amplitude of GABA_A receptor-mediated IPSPs in Schäffer collaterals, as well as the area of depolarization (negative component) and the hyperpolarization area (positive component), which is indicative of an increased GABAergic activation and inhibitory response. On the other hand, extracellular cGMP normalizes both the amplitude and the positive component of GABA_A receptor-mediated IPSPs in hyperammonemic rats. Although extracellular cGMP also tends to reverse the increase in the negative component, the differences do not become significant.

Increased GABAergic tone in different brain areas has been linked to the etiopathology of hepatic encephalopathy (Schafer and Jones, 1982; Cauli et al., 2009). The increase in GABAergic tone may be the result of different factors: increase of extracellular GABA in the brain, increase in the amount of GABA_A receptors, increase in the concentration of endogenous benzodiazepine-like compounds that increase GABA_A receptor activation, by an increase the concentration of neurosteroids that also increase GABA_A receptor activation or directly by an increase in GABA_A receptor activation by ammonium (Cauli et al., 2009). As seen in the results of this thesis, in chronic hyperammonemia there is a decrease in total GABA content in the hippocampus. However, the extracellular GABA concentration is increased. This would be due to the decreased membrane expression of GABA transporters, GAT-1 and GAT-3, leading to a lower GABA

reuptake from the extracellular medium, although the total GABA content in the hippocampus is decreased in hyperammonemia. So far, it was only known that chronic hyperammonemia increases hippocampal membrane expression of the $\alpha 1$ subunit and a decrease $\alpha 5$ (subunit which is mainly expressed extrasynaptically) of GABA_A receptor. In this thesis we have shown that in hippocampal slices from hyperammonemic rats there is also an increase in membrane expression of $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ and δ subunits of GABA_A receptors. This increased membrane expression of GABA_A receptor synaptic subunits, together with decreased membrane expression of GABA transporters and increased extracellular GABA, could be responsible for the observed increase in GABA_A receptor-mediated response. This would explain the increase in both the amplitude and depolarization area of IPSPs. There are studies that directly relate the increase in membrane expression GABA_A receptors with the increase in the amplitude of the GABA response and inhibitory synaptic efficacy (Nusser et al., 1998).

Phosphorylation is one of the most important mechanism for modulation of GABA_A receptors membrane expression. GABA_A receptor endocytosis is regulated by direct binding of endocytosis-specific motifs to the clathrin adaptor protein AP2 in the intracellular domains of specific subunits of the receptor, including $\beta 3$ and $\gamma 2$ (Vithlani and Moss, 2009). At least one of these two subunits or both at the same time are present in all hippocampal GABA_A receptors. The phosphorylation of $\beta 3$ and $\gamma 2$ prevents AP2 binding and subsequent endocytosis. Mutation of the $\beta 3$ S408/9 phosphorylation residue reduces the binding to AP2, increasing the membrane expression of GABA_A receptors. As a consequence, the size and number of inhibitory synapses increase as well as the amplitude and frequency of mIPSCs. Our results show that hyperammonemia increases $\beta 3$ phosphorylation at residues S408/9, which would be responsible of the increase in membrane expression of $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ and δ subunit of GABA_A receptors. Extracellular cGMP reverses both, the increase of $\beta 3$ S408/9 phosphorylation and the increase in membrane expression of $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ and δ subunit.

On the other hand, activation of GABA_A receptors induces hyperpolarization through the opening of an anion channel, allowing Cl⁻ to move into the cell while HCO₃⁻ moves towards extracellular medium under physiological conditions, leading to hyperpolarization of the plasma membrane. Cl⁻ cotransporters will play a fundamental role in the modulation and maintenance of chloride concentrations (Zhu et al., 2008). In fact, depending on the chloride equilibrium potential, GABA will act as an excitatory or inhibitory agent when it binds to its receptor (Ben-Ari, 2002; Kaila, 1994). Two Cl⁻ transporters are particularly important in the CNS: KCC2 (not expressed in glia) that transport Cl⁻ from inside to the outside of neurons and NKCC1 that transport Cl⁻ into the cell. In this thesis we have shown that hyperammonemia decreases the membrane expression of KCC2 and increases NKCC1 membrane expression in hippocampus, which would result in a higher concentration of Cl⁻ in neurons and astrocytes which should lead to a decrease in the GABAergic

inhibitory response. However, we found an increased response of GABA_A receptors. Rabee (1993) demonstrated that under conditions of hyperammonemia there is a decrease in Cl⁻ extrusion and the efficacy of postsynaptic inhibition did not show any significant impairment. It should be noted that both membrane expression and function of KCC2 may be modulated by other mechanisms such as phosphorylation. As discussed above, probably the increased GABA_A receptor-mediated inhibitory response is due to increased membrane expression of GABA_A receptors and extracellular GABA concentration.

Extracellular cGMP normalizes the membrane expression of the α 1, α 2, γ 2, β 3 and δ subunits of the GABA_A receptor and membrane expression of GAT-1 and GAT-3, as well as, the total GABA content in hyperammonemia, which could explain the normalization of the amplitude of GABA_A receptor-mediated IPSPs by extracellular cGMP. In addition, extracellular cGMP also normalizes the membrane expression of KCC2 and NKCC1, which would contribute to the normalization of the Cl⁻ gradient.

As for the effect of extracellular cGMP in the control group, it increases both the amplitude and the negative component, i.e., it induces an increased GABA_A receptor response. GABA_A receptors are known to be one of the main modulators of extracellular cGMP. GABA_A receptor agonists block the increase in NMDA receptor-mediated cGMP production under hyperammonemia (Cauli et al., 2009). However, we do not know how extracellular cGMP is augmenting the GABA_A receptor-mediated response in control rats, since there are no changes in membrane expression of either GABA_A receptors or GABA transporters. One possibility would be that there is negative feedback: the increase in extracellular cGMP increases the activation of GABA_A receptors in order to reduce NMDA receptor-dependent cGMP production. However, we do not know if this is the case or the mechanisms involved.

On the other hand, in the study of GABA_A receptor-mediated IPSPs by stimulation intensity ranges, we detected an increase of the inhibitory response in hyperammonemia, evident at low stimulation intensities (range 1, 1250-2500 mV) that remains at higher stimulations. Hyperammonemia induces an increase in IPSP amplitude, width and, as a consequence, area, which fits with the results obtained in the first analysis. However, although hyperammonemia increases GABA_A receptor responsiveness, it causes GABA_A receptors to respond later in time, which could be result of two factors: decreased membrane expression of KCC2, which would decrease Cl⁻ extrusion and slow the response, and to the fact that the time at which the peak amplitude is reached was taken as a measure of temporal position. As the peak amplitude is higher under hyperammonemia, it would be consistent that more time would be required to reach it. Extracellular cGMP reverses both the increase in amplitude, width and area. However, it should be noted that the normalization of IPSP width by extracellular cGMP in hyperammonemic rats is

statistically significant only at high stimulation intensities (range 2: 2750-4000 mV and range 3: 4250-5000 mV). Extracellular cGMP also normalizes the temporal position of the IPSP, the timing of the response, possibly by normalizing Cl⁻ extrusion through the normalization of KCC2 and NKCC1 membrane expression.

Considering all these results together we can say that hyperammonemia increases the GABA_A receptor response by increasing both the amplitude and area and width of IPSPs and extracellular cGMP normalizes the GABA_A receptor mediated inhibitory response. Furthermore, extracellular cGMP increases GABAergic tone in the control group, so it would have opposite effects in hyperammonemic and control rats.

RESULTS CHAPTER 3

Mechanisms involved in the induction of neuroinflammation in the hippocampus of hyperammonemic rats

We have shown that in the hippocampus of hyperammonemic rats there is an activation of microglia and astrocytes and increased levels of IL- β , CCL2 and BDNF. We analysed the mechanisms leading to these alterations. We analysed the levels of these three proteins and the activation of microglia and astrocytes in hippocampal slices after ex vivo treatment with: JTE013 (S1PR2 receptor antagonist), IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist) and ANA-12 (TrkB receptor antagonist). In addition, the activation of microglia and astrocytes was also analysed following the treatment with RS504393, a CCR2 antagonist.

Role of S1PR2 in neuroinflammation in the hippocampus of hyperammonemic rats.

Blocking S1PR2, which is expressed in neurons, astrocytes and microglia in hippocampus (Anelli et al., 2005; Chun et al., 2010; Dong et al., 2019), with JTE013 reverses microglia activation in hyperammonemic rats. Sapkota et al., (2019) showed that JTE013 administration reduces microglia activation in cerebral ischemia by suppressing NF- κ B activation (Jayakumar et al., 2010; Adlimoghaddam et al., 2021). In hyperammonemia, nuclear translocation of NF- κ B is also increased (Balzano et al., 2020). It is possible that treatment with JTE013 normalizes microglia activation through suppression of NF- κ B activation.

We have found that JTE013 treatment normalizes IL-1 β , CCL2 and BDNF content in hippocampus of hyperammonemic rats. In atherosclerosis, activation of S1PR2 has been shown to stimulate the release of proinflammatory cytokines, including IL-1 β . Spkota et al., (2019) demonstrated that in cerebral ischemia the blockade of S1PR2 by JTE013 reverses increased IL-1 β production and activation of microglia. In the hippocampus of hyperammonemic rats, treatment with JTE013 normalizes IL-1 β levels and reverses microglia activation. The decrease in IL-1 β levels by JTE013 would occur in neurons, as previous studies of our group have shown that IL-1 β increases mainly in neurons (Cabrera-Pastor et al., 2016; Taoro-Gonzalez et al., 2019; Balzano et al., 2020). Since IL-1 β transcription is modulated by NF- κ B, the mechanism by which JTE013 decreases IL-1 β levels could involve normalization of NF- κ B activation (Jayakumar et al., 2011).

On the other hand, Li et al., (2014) demonstrated that sphingosine-1-phosphate induces CCL2 release. The CCL2 increase was reversed by JTE013 treatment by inhibiting the S1PR2 receptor, which is consistent with our results. Since S1PR2 receptor blockade normalizes IL-1 β increase and IL-1 β promotes CCL2 production in neurons, we believe that normalization of CCL2 content by JTE013 is a consequence of normalization of IL-1 β content.

On the other hand, activation of the S1PR2 receptor also induces BDNF production (Wang et al., 2020), which would explain the normalization of BDNF levels by the blockade of S1PR2 receptor in the hippocampus of hyperammonemic rats.

We propose the following mechanism: activation of the S1PR2 receptor promotes IL-1 β production in neurons, which increases CCL2 production. Binding of CCL2 to its receptor CCR2 in microglia would promote microglia activation and membrane insertion of the P2X4 receptor (Toyomitsu et al., 2012), resulting in Ca²⁺ entry into microglia and activation of p38 MAP kinase, through its phosphorylation at threonine 180 and tyrosine 182 residues, which would stimulate BDNF production (Trang et al., 2011). Blockade of the S1PR2 receptor normalizes this pathway and the activation of microglia.

In addition, treatment with JTE013 also reverses astrocyte activation in hyperammonemic rats. Pébay et al. (2001) demonstrated that S1P promotes astroglial proliferation. Our results indicate that BDNF would promote astrocyte activation, since blockade of the TrkB receptor which normalizes BDNF levels, but not IL-1 β and CCL2, reverses astrocyte activation. Ding et al. (2020) demonstrated that BDNF activates the TrkB receptor in astrocytes promoting its activation and that blocking S1PR2 reduces it. The same would be occurring in the hippocampus of hyperammonemic rats.

In conclusion, astrocytes activation in hyperammonemia occurs by a different pathway than that of microglia, since blockade of the CCR2 receptor does not reverse astrocyte activation, but reverses microglia activation. We hypothesize that following IL-1 β receptor activation, the neurons in addition to CCL2, also produce BDNF that contributes to astrocytes activation.

Role of IL-1 and its receptor activation in the induction of neuroinflammation in the hippocampus of hyperammonemic rats

Blocking IL-1 receptor by IL-1Ra treatment reverses the alterations produced by hyperammonemia in working memory and object recognition memory (Taoro-Gonzalez et al., 2019). Taoro-González et al., (2019), also showed that in hyperammonemic rats treatment with IL-1Ra in vivo using osmotic minipumps reverses microglia activation. In the present doctoral thesis, we show that ex vivo treatment of hippocampal slices from hyperammonemic rats with IL-1Ra reverses microglia and astrocyte activation.

In this same study (Taoro-Gonzalez et al., 2019) also showed that IL-1Ra treatment in vivo reverses the increase in hippocampal IL-1 β levels. In this thesis we show that ex vivo IL-1Ra treatment reverses the increase in the production of IL-1 β in the hippocampus of hyperammonemic rats. IL-1Ra is an endogenous peptide with anti-inflammatory effects (Klementiev et al., 2014). IL-1Ra competes with IL-1 β for binding to the IL-1 receptor, which is

expressed in neurons, microglia and astrocytes. IL-1Ra treatment increases IL-1Ra production by microglia, reducing brain levels of IL-1 β , probably by inhibiting its production (Clausen et al., 2016). This may contribute to the reversal by IL-1Ra treatment of microglia activation in hyperammonemic rats.

IL-1 receptor blockade also reverses the increase in CCL2, p38 phosphorylation and BDNF levels produced by hyperammonemia. Different studies have shown that IL-1 β promotes the production and release of chemokines such as CCL2 (Chui et al., 2010). Thus, the increase of IL-1 β in hyperammonemia would increase the production of CCL2 by neurons. CCL2 released by neurons would activate its receptor CCR2 in microglia, which would promote membrane insertion of the P2X4 receptor in microglia (Toyomitsu et al., 2012), resulting in Ca²⁺ influx and activation of p38 MAP kinase, through its phosphorylation at threonine 180 and tyrosine 182 residues, which would stimulate BDNF production (Trang et al., 2011). Therefore, it seems reasonable to think that IL-1Ra treatment by normalizing IL-1 β and CCL2 content would also normalize microglia activation and BDNF production by microglia by normalizing the CCL2-CCR2-P2X4-MAPK38-BDNF pathway.

Role of BDNF and its receptor activation in the induction of neuroinflammation in the hippocampus of hyperammonemic rats

Treatment with ANA-12 normalizes BDNF content, but does not reverse the increase in CCL2 and IL-1 β content in hyperammonemic rats. Normalization of BDNF content by TrkB blockade could occur through normalization of CREB activation. TrkB receptor activation activates the PLC γ /CAMKII/CREB signaling pathway that promotes BDNF gene transcription in neurons (Finkbeiner et al., 1997). Blockade of TrkB with ANA-12 would inhibit this pathway and decrease gene transcription and thus BDNF content. BDNF through its receptor TrkB can also increase BDNF levels via the PI3K/Akt pathway (Qiao et al., 2013) which, like PLC γ and MAPK activation, activates CREB and the transcription of CREB-modulated genes (Palasz et al., 2020). The fact that wortmanin, a PI3K inhibitor, reduces Akt activation, CREB and BDNF levels, but not CCL2 levels, supports the idea that in hyperammonemic rats BDNF activate TrkB, which activates the PI3K/Akt pathway which also activates CREB, contributing to increasing BDNF, but not CCL2, expression.

The mechanism by which BDNF and TrkB induces microglia activation would be the following: microglia activation promotes BDNF release. Activation of TrkB by BDNF produced by activated microglia and/or by other cell types such as neurons is crucial for maintenance of microglial activation in the hippocampus. Blockade of TrkB with ANA-12 reverses microglia activation by preventing this process.

Role of PI3K in the induction of neuroinflammation in the hippocampus of hyperammonemic rats

We also analysed the effect of PI3K inhibition with wortmannin on IL-1 β , BDNF and CCI2 content. The PI3K inhibitor wortmannin reverses the increase in BDNF content produced by hyperammonemia, but does not reverse the increase in CCI2 or IL-1 β . This suggests that one mechanism that modulates BDNF production in neurons and glia involves the PI3K. Qiao et al., (2013) demonstrated that BDNF itself through its receptor TrkB promotes BDNF release. They also demonstrated that inhibition of PI3K with wortmannin reverses the increase in BDNF levels observed in dorsal root ganglia in response to cystitis bladder inflammation. The increase in BDNF levels was a result of TrkB activation which activates the PI3K/Akt pathway leading to BDNF gene transcription. The same could be occurring in hyperammonemia, as PI3K inhibition reverses the increase in Akt phosphorylation and BDNF levels. The mechanisms of induction of CCI2 and IL-1 β production in hyperammonemia would be independent of PI3K, since wortmannin does not normalize CCI2 and IL-1 β levels in the hippocampus of hyperammonemic rats.

Role of Src in the induction of neuroinflammation in the hippocampus of hyperammonemic rats

We analyzed the effect of Src inhibition with PP2 on IL-1 β , BDNF and CCI2 content. Treatment with PP2, an inhibitor of Src, reverses the increase in BDNF and CCI2 content, but not that of IL-1 β . Moreover, Src is activated as a consequence of IL-1 receptor activation (Taoro-Gonzalez et al., 2019), suggesting that the induction of CCI2 and BDNF induced by IL-1 β activation of IL-1 receptor could be mediated by Src activation. Src activation leads to activation of NMDA receptors, which increases intracellular Ca²⁺ levels that activates CAMKII and CREB, which induces BDNF gene transcription (Tsakiri et al., 2008). Our results show that IL-1 receptor blockade reverses the increase in Src and CREB phosphorylation and normalizes BDNF levels. This suggests that in hyperammonemia the IL-1 β - IL-1 receptor - Src - CREB pathway may contribute to the increase in BDNF content. The increase in CCI2 levels occurs through a different pathway since TrkB inhibition does not normalize CREB phosphorylation, but normalizes CCI2 levels. These results suggest that, as seen in other studies (Parry et al., 1998), NF- κ B would be the transcription factor that modulates CCI2 expression in hippocampus of hyperammonemic rats.

On the other hand, it has been shown that Src kinases are essential for TrkB activation. The activation of TrkB by BDNF promotes the production and release of more BDNF (Huang et al., 2010). According to the results obtained, Src inhibition could be normalizing the increase in BDNF levels in hippocampus of hyperammonemic rats both by inhibiting CREB activation, as indicated above, and by preventing proper TrkB activation that increases BDNF levels.

In summary, in the hippocampus of hyperammonemic rats, S1PR2 receptor activation increases IL-1 β levels, which activates the IL-1 receptor. The activation of the IL-1 receptor induces the production and release of CCL2 by neurons that binds to CCR2 in microglia, which promotes membrane insertion of P2X4, increasing Ca²⁺ entry into microglia, which activates p38 MAP kinase, through its phosphorylation at threonine 180 and tyrosine 182 residues, which stimulates BDNF production by microglia. The increase in BDNF levels will contribute to the maintenance of microglial activation.

On the other hand, IL-1 β also promotes the production of BDNF by neurons, which binds to the TrkB receptor and activates astrocytes. Increased levels of IL-1 β activates the IL-1 receptor, increasing the activation of p38 and Src, which promotes BDNF transcription by CREB. Furthermore, we propose that IL-1 receptor activation and Src activation activate NF- κ B which increases CCL2 transcription. According to the proposed mechanisms, blocking the S1PR2 receptor, by normalizing IL-1 β levels also normalizes Src activation and CCL2 and BDNF levels and activation of microglia and astrocytes. Blocking the IL-1 receptor normalizes IL-1 β , CCL2 and BDNF levels and reverses microglia and astrocyte activation. CCR2 blockade normalizes only microglia activation. Blocking TrkB with ANA-12, only normalizes BDNF levels and microglia and astrocytes activation.

Mechanisms involved in alterations in GABAergic neurotransmission in hippocampus of hyperammonemic rats.

Modulation of extracellular GABA levels and of the glutamate decarboxylase enzymes, GAD65 and GAD67

As already discussed in chapter 2, the GABA content is reduced in the hippocampus of hyperammonemic rats. Since hyperammonemia does not alter the content of GAD65, but decreases the content of GAD67, we believe that reduced GAD67 amount would lead to a lower synthesis of GABA from glutamate.

We also analyzed the extracellular concentration of GABA which, unlike the total GABA content, is increased in hippocampus of hyperammonemic rats. This may be due to the reduced membrane expression of GABA transporters, GAT-1 and GAT-3, which would result in a lower GABA reuptake from the extracellular medium and, as a result, increase its extracellular concentration, in spite of the reduced total GABA content in hippocampus in hyperammonemia. A higher extracellular concentration of GABA, together with increased membrane expression of GABA_A receptors, would be responsible for the increased GABAergic tone observed in the hippocampus of hyperammonemic rats.

BDNF is an important modulator of GABAergic neurotransmission. BDNF modulates the membrane expression of GABA transporters and their function (Law et al., 2000; Whitworth and Quick, 2001; Vaz et al., 2011). Vaz et al., (2008) showed that BDNF inhibits GAT-1-mediated GABA uptake, which increases extracellular GABA concentration and that this inhibition is abolished by blocking TrkB. In hyperammonemic rats the increase in BDNF levels would contribute to the increase in extracellular GABA concentration by decreasing GABA uptake through GAT-1. Blockade of TrkB with ANA-12 normalizes the membrane expression of GABA transporters, so it would be expected that it normalizes extracellular GABA as well. In addition, blockade of IL-1 and S1PR2 receptors also reverses the decrease in membrane expression of GABA transporters. It is expected that blockade of these receptors would also normalize extracellular GABA levels. However, because extracellular GABA is measured in vivo by microdialysis and our experiments are ex vivo, with hippocampal slices, we do not know the effect of blockade of TrkB, IL-1 and S1PR2 receptors on extracellular GABA concentration.

Our results also show that blocking TrkB with ANA-12 normalizes both GAD67 expression and total GABA content, without altering GAD65 expression. Blockade of the IL-1 receptor and S1PR2 also normalizes total GABA content and membrane expression of GAT-1 and GAT-3, possibly as a result of normalization of BDNF levels.

As discussed in chapter 2 the increase in GABAergic tone in hippocampus may be the result of different factors: increase in extracellular GABA, increase in the amount of GABA_A receptors in the membrane, increase in the concentration of endogenous benzodiazepine-like compounds and neurosteroids that increase GABA_A receptor activation or directly by an increase in GABA_A receptor activation by ammonium (Cauli et al., 2009).

The results of this thesis suggest that in hyperammonemia increased BDNF levels reduce membrane expression of GAT-1 and GAT-3, which increases extracellular GABA concentration. Blockade of TrkB, IL-1 or S1PR2 receptors, which normalize BDNF levels, reverses the reduction in membrane expression of the two GABA transporters and possibly also normalizes the extracellular GABA concentration.

At the same time, hyperammonemia decreases GAD67 expression and, as a result, decreases GABA synthesis, resulting in a lower total GABA content. Blockade of the TrkB receptor and of IL-1 or S1PR2 receptors, which reverses the increase in BDNF levels normalizes both GAD67 and total GABA content in hippocampus of hyperammonemic rats.

Mechanisms by which hyperammonemia alters membrane expression of GABA_A receptors, GABA transporters and Cl⁻ cotransporters in hippocampus.

Hyperammonemia increases the membrane expression of the $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ and δ subunits of GABA_A receptor and reduces the membrane expression of the $\alpha 5$ subunit in hippocampus. Furthermore, in hippocampus of hyperammonemic rats the membrane expression of the GABA transporters GAT-1 and GAT-3 and of the Cl⁻ cotransporter KCC2 is decreased, whereas the membrane expression of the Cl⁻ cotransporter NKCC1 is increased. We assume that these alterations are a consequence of neuroinflammation. To analyze the mechanisms by which neuroinflammation alters the membrane expression of the GABA_A receptor, Cl⁻ cotransporters and GABA transporters, we analyzed the effects of the following *ex vivo* treatments: JTE013 (S1PR2 receptor antagonist), IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist) and ANA-12 (TrkB receptor antagonist).

Role of TrkB in the alterations in membrane expression of GABA_A receptor subunits, GABA transporters and Cl⁻ cotransporters in the hippocampus of hyperammonemic rats.

Blocking the TrkB receptor with ANA-12, normalizes the membrane expression of the $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ and δ subunits of the GABA_A receptor but not that of the $\alpha 5$ subunit. In hyperammonemia, BDNF content increases and treatment with ANA-12 normalizes it. It has been shown that BDNF increases the expression of GABA_A receptor subunits and facilitates GABA release in cultured hippocampal neurons (Yamada et al., 2002). These data suggest that increased BDNF contributes to increased membrane expression of the $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ and δ subunits of the GABA_A receptor.

One key subunit in the modulation of GABA_A receptor membrane expression is the $\beta 3$ subunit. The $\beta 3$ subunit of the GABA_A receptor contains an AP2-binding motif at residues 401-412. The $\mu 2$ subunit of the AP2 complex binds to these motifs inducing GABA_A receptor endocytosis (Kittler et al., 2005). Phosphorylation of the $\beta 3$ subunit of the GABA_A receptor at serine residues 408 and 409 (within the AP2-binding motif) prevents AP2 binding, which increases membrane expression of both $\beta 3$ and other subunits and gephyrin content (Nakamura et al., 2015). In epilepsy, phosphorylation of serine 408/9 residues of the $\beta 3$ subunit by PKC decreases, which increases AP2 binding and promotes endocytosis of some GABA_A receptor subtypes. Increasing S408/9 phosphorylation and blocking $\beta 3$ binding to AP2 increases membrane expression of GABA_A receptors and restores the efficacy of synaptic inhibition (Terunuma et al., 2014). We show that in hyperammonemic rats phosphorylation of the $\beta 3$ subunit at residues S408/409 is increased and that blocking TrkB with ANA-12 reverses this increase. One of the signal transduction pathways activated by the TrkB receptor is the PI3K-PKC pathway (Porcher et al., 2018) and PKC is one of the kinases that catalyzes $\beta 3$ phosphorylation. Blocking TrkB receptor

could normalize membrane expression of the GABA_A receptor in hyperammonemic rats because it normalizes $\beta 3$ phosphorylation, allowing AP2 binding and restoring GABA_A receptor internalization. Inhibition of the PI3K by wortmannin also reverses increased phosphorylation at residues S408/409 of the $\beta 3$ subunit of the GABA_A receptor in hyperammonemic rats suggesting that it is mediated by the TrkB-PI3K-PKC pathway. Another pathway activated by TrkB is the PLC- γ /PKC- δ pathway, through which it could also modulate phosphorylation of the $\beta 3$ subunit of the GABA_A receptor (Minichiello, 2009).

The KCC2/NKCC1 ratio changes during development and in certain pathologies (Zhang et al., 2021). In some pathologies, such as in cerebral ischemia or epilepsy, membrane expression of KCC2 decreases due to BDNF, which induces phosphorylation of phospholipase C gamma1 (PLC γ 1) at residue T783, leading to KCC2 internalization (Carter et al., 2018). Other studies have also shown that treatment with TrkB antagonists increases KCC2 expression (Rivera et al., 2002; Béjot et al., 2010). In the hippocampus of hyperammonemic rats, treatment with ANA-12 reverses the decrease in membrane expression of KCC2. Furthermore, in the control group, TrkB receptor blockade also increases membrane expression of KCC2. These data support that TrkB activation by BDNF is responsible for the reduced membrane expression of KCC2 in the hippocampus of hyperammonemic rats.

Another mechanism by which TrkB activation could reduce membrane expression of KCC2 in hyperammonemia is by phosphorylation of tyrosine residues 903 and 1087 by Src that promotes KCC2 internalization. In hippocampal slices BDNF through TrkB activation activates two signal transduction pathways involving Shc/FRS-2, with a Src homology domain, and PLC γ , which increase KCC2 phosphorylation at tyrosine residues 903 1087, thereby increasing its internalization and decreasing its membrane expression. However, we do not know the phosphorylation levels of these residues in the hippocampus of hyperammonemic rats.

In the present thesis we have described that hyperammonemia increases the membrane expression of NKCC1 and that treatment with ANA-12 normalizes it. Eftekhari et al., (2014) showed that BDNF increases the membrane expression of NKCC1 and decreases that of KCC2 in hippocampus of animal models of epilepsy. TrkB activation activates the WNK-SPAK/OSR1 pathway, which phosphorylates NKCC1 increasing its cotransport function. However, we have not found reports identifying posttranslational modifications that modulate the membrane expression of NKCC1. Different studies in vascular endothelial cells and enterocytes show that transport to and from the membrane is regulated by different mechanisms, for example, interactions with cytoskeletal components, in a phosphorylation-independent manner (Klein et al., 1995; Flatman et al., 2002; Flatman et al., 2005). Similar mechanism may be acting in

hyperammonemia. We do not know the mechanisms by which hyperammonemia increases the membrane expression of NKCC1 in hippocampus nor how TrkB blockade reverses it.

We have also shown that blocking TrkB receptor not only normalizes total GAT-1 and GAT-3 content, but also reverses the decreased membrane expression of these two GABA transporters in hyperammonemic rats. Syntaxin positively modulates the membrane expression of GAT-1 and phosphorylation of Munc-18 by PKC inhibits syntaxin binding to GAT-1 and reduces its membrane expression (Beckman et al., 1998). Activation of TrkB by BDNF activates the PLC γ pathway. Tyrosine 816 phosphorylation of TrkB leads to recruitment and phosphorylation of PLC γ 1. Activated PLC γ 1 hydrolyzes phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to generate inositol-1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5)P₃) and diacylglycerol (DAG). Ins(1,4,5)P₃ promotes intracellular Ca²⁺ release, which activates enzymes such as Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. DAG activates different PKC isoforms (Minichiello, 2009). One possibility is that TrkB activation decreases membrane expression of GAT-1 through activation of PKC via the PLC γ pathway, in a PI3K-independent manner, since wortmannin does not reverse GAT-1 membrane expression decrease. This would increase Munc-18 phosphorylation, reducing syntaxin binding to GAT-1 and decreasing membrane expression of GAT-1. This would explain that blocking TrkB with ANA-12 normalizes membrane expression of GAT-1, while wortmannin does not. However, we do not know if Munc-18 phosphorylation is increased in the hippocampus of hyperammonemic rats.

It has also been shown that low concentrations of extracellular GABA increase phosphorylation at tyrosine residues of GAT-1, which increases membrane expression of the transporter (Whitworth and Quick, 2001). Conversely, higher concentrations of extracellular GABA increases GAT-1 phosphorylation at serine residues, which reduces membrane expression of the transporter. This is consistent with our results, since in the hippocampus of hyperammonemic rats there is an increase in extracellular GABA content and a decrease in membrane expression of GAT-1. These effects could be mediated by the PLC γ /DAG/PKC pathway. There are reports showing modulation of GAT-1 by BDNF binding to TrkB and activation of this pathway. Vaz et al., (2008) showed that BDNF treatment inhibits GAT-1-mediated GABA uptake in hippocampal neurons, which increases extracellular GABA concentration, and that this inhibition is eliminated with TrkB or PLC inhibition.

Although hyperammonemia also decreases membrane expression of GAT-3, we do not know the mechanism involved. We do not have found literature about the mechanisms that modulate GAT-3 membrane expression.

Role of IL-1 receptor in the alterations in membrane expression of GABA_A receptor subunits, GABA transporters and Cl⁻ cotransporters in the hippocampus of hyperammonemic rats.

Taoro-Gonzalez et al., (2019) showed that blocking the IL-1 receptor with IL-1Ra reverses the increase in membrane expression of the $\alpha 1$ subunit of the GABA_A receptor induced by hyperammonemia. However, the effect of hyperammonemia and IL-1Ra treatment on the membrane expression of the other GABA_A receptor subunits was not known. Here, we show that IL-1Ra treatment *ex vivo* reverses the increase in membrane expression of the $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ and δ subunits of the GABA_A receptor, but does not reverse the decrease in membrane expression of $\alpha 5$ produced by hyperammonemia. Since blocking IL-1 receptor normalizes BDNF content, one possible explanation is that the increase of IL-1 β increases membrane expression of GABA_A receptor subunit by increasing BDNF and TrkB activation as discussed in the previous section.

The IL-1 receptor also activates other signal transduction pathways by which it could modulate the membrane expression of GABA_A receptor subunits. Taoro-Gonzalez et al., (2018) showed that IL-1Ra treatment reverses the increase in Src phosphorylation at tyrosine residue 418, but not the increase in Akt phosphorylation at serine residue 473. Serantes et al., (2006) showed that in oocytes IL-1 β promotes, in an IL-1 receptor-dependent manner, the activation of PI3K and Akt, which induces membrane insertion of GABA_A receptor. According to this study IL-1 β induces membrane insertion of GABA_A receptor by promoting phosphorylation of the $\gamma 2$ and $\beta 3$ subunits in hippocampal neurons. However, they failed to demonstrate that these phosphorylations were mediated by Akt. Here, we show that IL-1 receptor blockade normalizes membrane expression of GABA_A receptor subunits, except for the $\alpha 5$ subunit, in an Akt-independent manner, since IL-1Ra treatment does not reverse the increased phosphorylation of Akt at residue Ser473 induced by hyperammonemia. This suggests that modulation of membrane expression of GABA_A receptor subunits may occur by different mechanisms in different cell types, being different in hippocampal neurons and oocytes, probably due to different signal transduction pathways.

On the other hand, blocking the IL-1 receptor reverses the increase in Src phosphorylation at Y418. One possibility is that IL-1Ra-mediated normalization of membrane expression of GABA_A receptor subunits occurs by normalization of phosphorylation of the $\beta 3$ subunit of the GABA_A receptor. This phosphorylation can be mediated by Src or by a signal transduction pathway that includes Src, since as will be seen later inhibition of Src by PP2 normalizes membrane expression of the $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$, and δ subunits of the GABA_A receptor. Another possibility is that IL-1Ra treatment normalizes the membrane expression of GABA_A receptor subunits by normalizing the phosphorylation of the $\beta 3$ subunit through the BDNF-TrkB-PKC pathway discussed above.

IL-1 receptor blockade also reverses the decrease in KCC2 membrane expression induced by hyperammonemia. IL-1Ra may normalize KCC2 membrane expression by normalizing BDNF

levels or directly by signal transduction pathways associated with the receptor itself. The membrane expression of KCC2, is regulated by phosphorylation at residues Y903, Y1087, catalyzed by Src-type kinases which promotes the internalization of this transporter (Côme et al., 2019). In hyperammonemia Src phosphorylation at residue Y418 is increased which increases its activity. This would increase KCC2 phosphorylation and promote the internalization of this Cl⁻ cotransporter, reducing its membrane expression in hyperammonemia. IL-1Ra treatment could be normalizing KCC2 membrane expression by decreasing Src activity and phosphorylation at residues Y903/Y1087. However, inhibition of Src with PP2 treatment does not normalize KCC2 membrane expression, so this hypothesis would be excluded. IL-1 receptor blockade would normalize KCC2 membrane expression by reversing the increase in BDNF levels and TrkB activation, as discussed in the previous section.

On the other hand, IL-1Ra treatment does not reverse the increase in NKCC1 membrane expression produced by hyperammonemia, indicating that the mechanisms of regulation of KCC2 and NKCC1 membrane expression are different.

IL-1Ra treatment also normalizes both the total content and membrane expression of GABA transporters (GAT-1 and GAT-3). Taoro-Gonzalez et al., (2018) showed that in the hippocampus of hyperammonemic rats, increased IL-1 β results in increased IL-1 receptor activation, which increases phosphorylation and activity of Src that activates PKC δ and that ex vivo IL-1Ra treatment normalizes all these alterations. PKC δ can phosphorylate GAT-1 at serine residues (Law et al., 2000; Vaz et al., 2011), which, as discussed in the previous section, decreases its membrane expression. Thus, IL-1 β could reduce membrane expression of GAT-1 by two different mechanisms, both PKC-dependent: by phosphorylating Munc-18 and inhibiting syntaxin binding to GAT-1 or/and by direct phosphorylation of GAT-1 at serine residues. Blocking the IL-1 β receptor by normalizing PKC activity would also normalize membrane expression of GAT-1. However, this pathway does not appear to be responsible for IL-1Ra-mediated normalization of GAT-1 membrane expression, since Src inhibition does not normalize GAT-1 membrane expression. Probably, IL-1Ra treatment normalizes GAT-1 membrane expression indirectly through normalization of BDNF levels and, consequently, by decreasing TrkB and the PLC γ /DAG/PKC pathway activation as discussed above.

Role of S1PR2 in the alterations in membrane expression of GABA_A receptor subunits, GABA transporters and Cl⁻ cotransporters in the hippocampus of hyperammonemic rats.

As for IL-1Ra treatment, blocking the S1PR2 receptor normalizes membrane expression of the α 1, α 2, γ 2, β 3 and δ subunits of the GABA_A receptor. Since JTE013 treatment normalizes total IL-1 β and BDNF content, one possibility is that JTE013 normalizes membrane expression of GABA_A receptor subunits through the IL-1 and TrkB receptor signal transduction pathways

discussed in the previous sections. However, S1PR2 also activates other signal transduction pathways that can directly modulate membrane expression of GABA_A receptors, GABA transporters and Cl⁻ cotransporters.

JTE013 also normalizes the phosphorylation of the $\beta 3$ subunit at residues S408/409. The decrease of $\beta 3$ subunit phosphorylation by JTE013 would increase AP2 binding to GABA_A receptors and promote GABA_A receptor internalization. As a result, S1PR2 blockade by JTE013 reduces the membrane expression of $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$ and δ subunits, in parallel to that of the $\beta 3$ subunit in hyperammonemic rats returning to normal levels. One of the signal transduction pathways activated by S1PR2 receptor is PI3K-Akt (Zhang et al., 2013; Liu et al., 2016). The $\beta 3$ subunit of the GABA_A receptor can be phosphorylated by Akt kinase. In hyperammonemia, phosphorylation of Akt at serine 133 and phosphorylation of the $\beta 3$ subunit, are increased. Both phosphorylations are normalized by treatment with JTE013. Increased S1PR2 receptor activation in hyperammonemia would increase Akt activation, which may increase $\beta 3$ subunit phosphorylation, reducing receptor internalization and, therefore, increasing membrane expression of the $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ and δ subunits of the GABA_A receptors. S1PR2 also can modulate the membrane expression of GABA_A receptor subunits through another signal transduction pathway involving Src, either directly through S1PR2 (Lorenz-Guertin and Jacob, 2018) or through the IL-1 receptor, as treatment with JTE013 reverses both the increase in Src phosphorylation at Y418 (which increases its activity) and the increase in IL-1 β levels. Thus, blockade of the S1PR2 receptor would increase $\beta 3$ phosphorylation either by direct modulation of Akt and/or Src or as a consequence of normalizing IL-1 β and BDNF levels and thus the pathways by which IL-1 β and BDNF modulate GABA_A subunits membrane expression.

Effects of PI3K inhibition on membrane expression of GABA_A receptor subunits, GABA transporters and Cl⁻ transporters.

To analyse whether the effects on membrane expression of GABA_A receptor, GABA transporters and Cl⁻ transporters are mediated by PI3K, we performed ex vivo experiments in hippocampal slices treated with wortmannin, an inhibitor of PI3K. The results show that wortmannin reverses the increase in membrane expression of the $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ and δ subunits of the GABA_A receptor and in the phosphorylation of the $\beta 3$ subunit. This supports the idea that activation by BDNF of TrkB in hyperammonemia would normalize the membrane expression of GABA_A receptor subunits through the PI3K/PKC pathway, leading to phosphorylation of $\beta 3$ and increased membrane expression of the $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ and δ subunits of the GABA_A receptor.

Wortmannin also reverses the decrease in membrane expression of the $\alpha 5$ subunit of the GABA_A receptor, while the other treatments do not. This indicates that the modulation of membrane expression of this subunit would occur by a different pathway, but mediated by PI3K

Wortmannin normalizes the membrane expression of both KCC2 and NKCC1, so the mechanisms that modulate the membrane expression of both transporters must be mediated by signaling pathways involving the PI3K. Garzon-Muvdi et al, (2012) demonstrated that NKCC1 in glioblastoma is phosphorylated by the PI3K-Akt-WNK3 pathway. We do not know whether this pathway is altered in hyperammonemia.

Inhibition of PI3K does not reverse the decrease in the membrane expression of GABA transporters GAT-1 and GAT-3, indicating that PI3K is not involved in the modulation of the membrane expression of these transporters.

The results reported support that the reversal of the alterations observed in the hippocampus of hyperammonemic rats by blockade of IL-1 receptor, S1PR2 and TrkB in the membrane expression of GABA_A receptor subunits, KCC2 and NKCC1 may be mediated by PI3K. In contrast, the modulation of GAT-1 and GAT-3 membrane expression would be independent of the PI3K.

Effects of Src inhibition on membrane expression of GABA_A receptor subunits, GABA transporters and Cl⁻ transporters.

To study if Src activation could mediate the alterations in membrane expression of GABA_A receptor subunits, we performed ex vivo experiments in which we inhibited Src with PP2. The results show that PP2 treatment reverses the alterations induced by hyperammonemia in the membrane expression of the α 1, α 2, γ 2, β 3 and δ subunits of the GABA_A receptor, but it is not able to reverse the decrease in the membrane expression of α 5.

Inhibition of Src does not reverse the decrease in membrane expression of KCC2 induced by hyperammonemia, suggesting that phosphorylation at residues Y903, Y1087, which is catalyzed by Src-type kinases, and promotes the internalization of this transporter, is not responsible for KCC2 internalization in hyperammonemia. Blocking IL-1 receptor and S1PR2 reverses the increase in Src phosphorylation and the decrease in KCC2 membrane expression, but Src blockade fails to reverse the decrease in KCC2 membrane expression, indicating that the reversal by IL-1Ra and JTE013 is not mediated by Src. Inhibition of Src reverses the increase in NKCC1 membrane expression, indicating that it is modulated by increased Src activity. However, Src must be activated through a pathway independent of the IL-1 receptor, since treatment with IL-1Ra does not reverse the increase in NKCC1 membrane expression produced by hyperammonemia.

Treatment with PP2 reverses the decrease in GAT-3 membrane expression, but does not normalize GAT-1 membrane expression, so that modulation of GAT-3 membrane expression is Src-dependent, but not that of GAT-1. Blockade of the IL-1 receptor reverses both the increase

in Src phosphorylation and the decrease in GAT-3 membrane expression; it could be that the normalization of GAT-3 membrane expression by IL-1Ra is Src-dependent, as is that of S1PR2 blockade. Src inhibition does not normalize GAT-1 membrane expression, suggesting that the normalization of GAT-1 membrane expression by TrkB receptor blockade is mediated via the G α Q protein pathway that activates phospholipase G and PKC, since this pathway is independent of Src. Blockade of TrkB would decrease PKC activity and phosphorylation of syntaxin and/or phosphorylation of GAT-1 at serine residues, which would increase membrane expression of GAT-1.

The results obtained show that the reversal of the alterations in hyperammonemic rats by IL-1 receptor or S1PR2 blockade in membrane expression of GABA_A receptor subunits, NKCC1 and GAT-3 subunits would be mediated by Src, while the normalization of KCC2 and GAT-1 membrane expression would be independent of Src.

In summary, in hyperammonemia, activation of the S1PR2 receptor increases the production of IL-1 β , which binds to the IL-1 receptor. The IL-1 receptor activates Src which, through the transcription factor CREB, increases BDNF production. BDNF binds to the TrkB receptor in neurons which activates the PI3K-PKC pathway. PKC phosphorylates the β 3 subunit of the GABA_A receptor at serine residues 408 and 409, which prevents AP2 binding to GABA_A receptors and their internalisation, thus increasing membrane expression of α 1, α 2, γ 2, β 3 and δ subunits of the GABA_A receptor. Increased BDNF levels in the hippocampus of hyperammonemic rats also decrease the membrane expression of GAT-1, mainly in neurons, and GAT-3, mainly in astrocytes. In addition, increased BDNF levels and TrkB activation decrease the membrane expression of KCC2, possibly by increasing the phosphorylation of KCC2 at tyrosine residues 903 1087, which increases its internalisation and decreases its membrane expression. Hyperammonemia also decreases the membrane expression of the α 5 subunit of the GABA_A receptor and increases the membrane expression of NKCC1, but by different mechanisms to that proposed above.

CONCLUSIONS

1. Hyperammonemia reduces the function of AMPA receptors in hippocampus, reducing the amplitude of the EPSPs mediated by AMPA receptors. Extracellular cGMP normalizes the amplitude of these EPSPs induced by activation of AMPA receptors.
2. Hyperammonemia increases the function of NMDA receptors in hippocampus increasing the amplitude of the NMDA receptor mediated EPSPs. Increasing extracellular GMPc normalizes the amplitude of these EPSPs induced by activation of AMPA receptors.
3. Hyperammonemia increases the function of GABA_A receptors in hippocampus, increasing the amplitude, area and width of the IPSPs. The main factors that would contribute to the increased GABAergic response are increased extracellular concentration of GABA and increased membrane expression of GABA_A receptors. Increasing extracellular cGMP normalizes the membrane expression of $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ and δ GABA_A receptor subunits, which would be responsible for the normalization of amplitude, area and width of the GABA_A receptor-induced IPSPs.
4. Hyperammonemia decreases the membrane expression of GABA transporters, GAT-1 and GAT-3, in hippocampus, which would be responsible for the increasing in extracellular concentration of GABA.
5. The decrease in membrane expression of KCC2 and the increase in membrane expression of NKCC1, which modulate the chloride gradient, may contribute to the alterations of GABA_A receptor function in hippocampus of hyperammonemic rats.
6. In hyperammonemia increased S1PR2 receptor activation increases IL-1 β levels, which activates the IL-1 receptor, which increases the production and release by neurons of CCL2 that binds to CCR2 in microglia, promoting activation of microglia and membrane insertion of P2X4, and activation of p38 MAP kinase, which stimulates BDNF production by microglia. The increase in BDNF levels contributes to the maintenance of microglial activation in hippocampus of hyperammonemic rats.
7. IL-1 β also promotes the production of BDNF by neurons, which would bind to the TrkB receptor and activate astrocytes.
8. The increase of BDNF levels in hippocampus of hyperammonemic rats increases the activation of TrkB receptor that activates PI3K/PKC pathway. PKC would phosphorylate the $\beta 3$ subunit of GABA_A receptors at serines 408 and 409, which increases membrane expression of $\beta 3$, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$ and δ subunits of the GABA_A receptor. Blocking S1PR2, IL-1 receptor or TrkB reduces BDNF levels and TrkB activation resulting in normalization of $\beta 3$ subunit phosphorylation and of membrane expression of $\beta 3$, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ and δ subunits of GABA_A receptor.

9. Hyperammonemia reduces the membrane expression of $\alpha 5$ subunit of GABA_A receptors. The alteration of membrane expression of this subunit occurs by a different mechanism than for $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ and δ subunits, since it is not reversed by blocking the IL-1 receptor, TrkB or S1PR2.
10. In hyperammonemia increased BDNF levels increase TrkB activation which activates the PI3K-PKC pathway which reduces the membrane expression of GAT-1. Blocking the IL-1 receptor or TrkB normalizes membrane expression of GAT-1 by normalising BDNF levels, activation of TrkB and the PI3K-PKC pathway.
11. Hyperammonemia also reduces the membrane expression of GAT-3 and this is mediated by increased BDNF levels. Blocking TrkB, IL-1 receptor or S1PR2 normalizes it.
12. In hyperammonemia, the increase of BDNF levels reduces KCC2 membrane expression, likely by increasing its phosphorylation at tyrosines 903 and 1087, which increases its internalisation and decreases KCC2 membrane expression. Blocking S1PR2 or IL-1 receptor normalizes BDNF levels, reduces TrkB activation and reverses the decrease of KCC2 membrane expression. In contrast, hyperammonemia increases the membrane expression of NKCC1 and only blocking TrkB or S1PR2 reverses this alteration.

INTRODUCCIÓN	1
1. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA. PAPEL DE LA HIPERAMONEMIA	3
1.1. Encefalopatía Hepática	3
1.1.1. Alteraciones cognitivas en EH	5
1.2. Acción sinérgica de hiperamonemia e inflamación en la EH.....	8
1.2.1. Toxicidad del amonio.....	9
1.2.2. Papel de la hiperamonemia en la encefalopatía hepática.....	12
1.2.3. Neuroinflamación.....	13
2. NEUROINFLAMACIÓN EN MODELOS ANIMALES DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA 16	
2.1. Modelo de EH por anastomosis porta-cava (PCS, porta-caval shunt)	16
2.2. Modelo de EH por ligadura biliar (BDL, Bile duct-ligation).....	17
2.3. Modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático.....	17
3. ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN COGNITIVA EN HIPERAMONEMIA Y ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA	18
3.1. La neuroinflamación altera la neurotransmisión conduciendo a alteraciones cognitivas en hiperamonemia crónica y EHM.	19
4. EL HIPOCAMPO	21
4.1. Estructura y conectividad hipocampal, el circuito trisináptico	22
5. NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA	24
5.1. Receptores AMPA	25
5.2. Receptores NMDA.....	25
6. NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA	27
6.1. Receptores GABA _A	27
6.1.1. Cotransportadores de cloro.....	31
6.1.2. Respuestas sinápticas inducidas por la activación de los receptores GABA _A	32
7. PLASTICIDAD SINÁPTICA	32
7.1. Plasticidad sináptica de corta duración	34
7.1.1. Plasticidad sináptica de corta duración en el hipocampo	37
7.2. Plasticidad de larga duración	37
7.2.1. Plasticidad de larga duración: neurotransmisión glutamatérgica	38
7.2.2. Plasticidad de larga duración: neurotransmisión GABAérgica	38
8. PAPEL DE LOS ESFINGOLÍPIDOS EN LA NEUROINFLAMACIÓN Y EN LA MODULACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN	40
8.1. Esfingosina-1-fosfato.....	41
9. NEUROTROFINAS: BDNF	42
9.1. Papel del BDNF en la modulación de la neuroinflamación	43
9.2. Papel del BDNF en la modulación de la neurotransmisión GABAérgica.....	45
10. PAPEL DEL CCI2 EN LA MODULACIÓN DE LA NEUROINFLAMACIÓN Y LA NEUROTRANSMISIÓN	46
11. GMP cíclico (GMPC)	48
11.2. Papel del GMPC en hiperamonemia y en la encefalopatía hepática	51

ÍNDICE

12. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE RECEPTORES DE GLUTAMATO Y GABAA CON MATRIZ DE MÚLTIPLES ELECTRODOS	53
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
MATERIAL Y MÉTODOS	61
1. MODELO ANIMAL DE HIPERAMONEMIA SIN DAÑO HEPÁTICO	63
2. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE RODAJAS DE HIPOCAMPO: EXPERIMENTOS EX VIVO	63
2.1. Procesamiento de rodajas de hipocampo para western blot	64
2.1.1. Análisis del contenido de proteína y fosforilación de residuos	65
2.1.2. Análisis de la expresión en membrana de proteínas	65
2.1.3. Determinación de la concentración de proteína de muestras para inmunoblot.	65
2.2. Procesamiento de rodajas de hipocampo para la cuantificación de GABA	66
2.3. Procesamiento de rodajas de hipocampo para inmunohistoquímica.	66
3. INMUNOBLOT	66
4. INMUNOHISTOQUÍMICA	70
4.1. Análisis de la activación de microglía. Tinción de Iba1.	71
4.2. Análisis de la activación de astrocitos. Tinción de GFAP.	72
5. CONCENTRACIÓN DE GABA POR HPLC-MS	72
6. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN EXTRACELULAR DE GABA POR MICRODIÁLISIS IN VIVO EN HIPOCAMPO	73
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74
8. REGISTROS DE CURVAS DE INPUT-OUTPUT A NIVEL POSTSINÁPTICO POR MULTIELECTRODE ARRAY (MEA)	75
8.1. Preparación de rodajas frescas de hipocampo para registro en MEA	75
8.2. Curvas I-O de receptores AMPA y NMDA	77
8.3. Curvas I-O de receptores GABA _A	79
8.4. Análisis de las curvas I-O de receptores AMPA, NMDA y GABA _A	80
8.4.1. Análisis de potenciales postsinápticos secundarios	81
CAPÍTULO 1: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
RESULTADOS	85
1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA HIPERAMONEMIA Y EL GMPc EXTRACELULAR SOBRE LA FUNCIÓN DE RECEPTORES AMPA Y NMDA EN HIPOCAMPO EX VIVO	85
1.1. Función de los receptores AMPA	85
1.1.1. Estudio de las curvas Input-Output (I/O) de receptores AMPA en función de la intensidad de estimulación	85
1.1.2. Estudio de las curvas I/O por rangos de estimulación	88
1.2. Efectos de la hiperamonemia y el GMPC extracelular sobre la función de los receptores NMDA	92
1.2.1. Estudio de las curvas Input-Output de receptores NMDA en función de la intensidad de estimulación	92
1.2.2. Estudio de los EPSPs de las curvas I/O mediadas por receptores NMDA por rangos de estimulación	95

ÍNDICE

DISCUSIÓN.....	98
CAPÍTULO 2: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	107
RESULTADOS.....	109
1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA HIPERAMONEMIA Y EL GMPc EXTRACELULAR SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA EN HIPOCAMPO DE RATAS HIPERAMONÉMICAS	109
1.1. Estudio de los efectos de la hiperamonemia y el GMPc extracelular sobre la función de los receptores GABA _A	109
1.1.1. Estudio de las curvas Input-Output (I/O) de receptores GABA _A en función de la intensidad de estimulación	109
1.1.2. Estudio de las curvas I-O por rangos de estimulación	112
1.2. Efecto de la hiperamonemia y el GMPc EXTRACELULAR sobre factores que modulan la neurotransmisión GABAérgica en hipocampo	118
1.2.1. La hiperamonemia disminuye los niveles de GABA en hipocampo.....	118
1.2.2. Efecto de la hiperamonemia y el GMPc extracelular sobre la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA _A en hipocampo.....	119
1.2.3. Efecto de la hiperamonemia y el GMPc extracelular sobre la fosforilación de la subunidad β3 del receptor GABA _A en los residuos S408/S409.	121
1.2.4. Efecto de la hiperamonemia y el GMPc extracelular sobre el contenido total de gephyrin en hipocampo.	122
1.2.5. Efecto la hiperamonemia y el GMPc extracelular sobre el contenido total y la expresión en membrana de transportadores GABA	123
1.2.6. Efecto la hiperamonemia y el GMPc extracelular sobre la expresión en membrana de transportadores de Cl ⁻	125
DISCUSIÓN.....	127
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	133
RESULTADOS.....	135
1. PAPEL DE LA NEUROINFLAMACIÓN EN LAS ALTERACIONES DE LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA EN HIPOCAMPO DE RATAS HIPERAMONÉMICAS	135
1.1. Efecto del bloqueo del receptor de la IL-1β sobre la neuroinflamación y la neurotransmisión GABAérgica	135
1.1.1. Efecto del bloqueo del receptor de la IL-1 sobre la activación de microglía y astrocitos	135
1.2. Efecto del bloqueo del receptor de la IL-1β sobre los niveles de GABA, GAD-65 y GAD-67	137
1.3. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA _A en hipocampo.....	138
1.4. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre la fosforilación de la subunidad β3 del receptor GABA _A en los residuos S408/S409	140
1.5. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre el contenido total gephyrin	140
1.6. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre el contenido y la expresión en membrana de transportadores GABA	141
1.7. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre la expresión en membrana de transportadores de Cl ⁻	142
1.8. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre el contenido total de IL-1β, CCL2 y BDNF	143
1.9. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre la fosforilación de Src, Akt, CREB y p38 .	144
2. EFECTO DEL BLOQUEO DEL RECEPTOR DE LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN Y LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA	146
2.1. Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre la activación de microglía y astrocitos	147

2.2.	Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre los niveles de GABA, GAD-65 y GAD-67	148
2.3.	Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA _A en hipocampo.....	149
2.4.	Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre la fosforilación de la subunidad β3 del receptor GABA _A en los residuos S408/S409	150
2.5.	Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre el contenido de gephyrin	151
2.6.	Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre el contenido total y la expresión en membrana de transportadores GABA.....	152
2.7.	Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre la expresión en membrana de transportadores de Cl ⁻	153
2.8.	Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre el contenido de IL-1β, CCL2 y BDNF	154
2.9.	Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre la fosforilación de Src, Akt, CREB y p38 ..	154
3.	EFFECTO DEL BLOQUEO DE TrkB, RECEPTOR DE BDNF, SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN Y LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA	157
3.1.	Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre la activación de microglía y astrocitos	157
3.2.	Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre los niveles de GABA, GAD-65 y GAD-67..	159
3.3.	Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA _A en hipocampo.....	159
3.4.	Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre la fosforilación de la subunidad β3 del receptor GABA _A en los residuos S408/S409	161
3.5.	Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre el contenido de gephyrin	161
3.6.	Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre el contenido total y la expresión en membrana de transportadores GABA.....	162
3.7.	Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre la expresión en membrana de transportadores de Cl ⁻	163
3.8.	Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre el contenido de IL-1β, CCL2 y BDNF	164
3.9.	Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre la fosforilación de Src, Akt, CREB y p38	165
4.	EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA PI3 KINASA SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN Y LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA	167
4.1.	Efecto de la inhibición de la PI3K sobre los niveles de GABA, GAD-65 y GAD-67	167
4.2.	Efecto de la inhibición de la PI3K sobre la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA _A en hipocampo.....	168
4.3.	Efecto de la inhibición de la PI3 kinasa sobre la fosforilación de la subunidad β3 del receptor GABA _A en los residuos S408/S409	169
4.4.	Efecto de la inhibición de la PI3 kinasa sobre el contenido de gephyrin.....	169
4.5.	Efecto de la inhibición de la PI3 kinasa sobre el contenido total y la expresión en membrana de transportadores de GABA.....	170
4.6.	Efecto de la inhibición de la PI3 kinasa sobre la expresión en membrana de transportadores de Cl ⁻	171
4.7.	Efecto de la inhibición de la PI3 kinasa sobre el contenido de IL-1β, CCL2 y BDNF	172
4.8.	Efecto de la inhibición de la PI3 kinasa sobre la fosforilación de Src, Akt, CREB y p38..	173
5.	EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA QUINASA Src SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN Y LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA	175
5.1.	Efecto de la inhibición de Src sobre los niveles de GABA, GAD-65 y GAD-67.....	175
5.2.	Efecto de la inhibición de Src sobre la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA _A en hipocampo.....	176
5.3.	La inhibición de Src revierte el aumento en la fosforilación de la subunidad β3 del receptor GABA _A en los residuos S408/S409 en ratas hiperamonemicas.....	177
5.4.	Efecto de la inhibición de Src sobre el contenido de gephyrin	177
5.5.	Efecto de la inhibición de Src sobre el contenido total y la expresión en membrana de transportadores de GABA.....	178
5.6.	Efecto de la inhibición de Src sobre la expresión en membrana de transportadores de Cl ⁻	179
5.7.	Efecto de la inhibición de Src sobre el contenido de IL-1β, CCL2 y BDNF	180
5.8.	Efecto de la inhibición de Src sobre la fosforilación de Src, Akt, CREB y p38	181
6.	EFFECTO DEL BLOQUEO DE CCR2 SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN	182
6.1.	Efecto del bloqueo del receptor CCR2 sobre la activación de microglía y astrocitos	183

ÍNDICE

DISCUSIÓN.....	185
1. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA INDUCCIÓN DE NEUROINFLAMACIÓN EN HIPOCAMPO DE RATAS HIPARAMONEMICAS.....	185
1.1. Papel del receptor S1PR2 en la modulación de la neuroinflamación en hipocampo de ratas hiperamonemicas.....	186
1.2. Papel de la IL-1 y de la activación de su receptor en la inducción de neuroinflamación en hipocampo de ratas hiperamonemicas.....	189
1.3. Efecto del bloqueo del receptor CCR2 sobre la activación de microglía y astrocitos.....	191
1.4. Papel del BDNF y de la activación de su receptor TrkB en la neuroinflamación en hipocampo de ratas hiperamonemicas.....	192
1.5. Papel de la PI3K en la modulación de la neuroinflamación en el hipocampo de ratas hiperamonemicas.....	194
1.6. Papel de Src en la modulación de la neuroinflamación en el hipocampo de ratas hiperamonemicas.....	195
2.1. Modulación del contenido extracelular de GABA y de las enzimas glutamato descarboxilasa (GAD65 Y GAD67).....	197
2.2. Modulación de la expresión en membrana de receptores GABA _A , transportadores de GABA y cotransportadores de Cl ⁻	198
2.2.1. Papel del receptor TrkB en las alteraciones en la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA _A , de transportadores de GABA y cotransportadores de Cl ⁻ en hipocampo de ratas hiperamonemicas.....	199
2.2.2. Papel del receptor de la IL-1 en las alteraciones en la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA _A , de transportadores de GABA y cotransportadores de Cl ⁻ en hipocampo de ratas hiperamonemicas.....	204
2.2.3. Papel del receptor S1PR2 en las alteraciones en la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA _A , de transportadores de GABA y cotransportadores de Cl ⁻ en hipocampo de ratas hiperamonemicas.....	209
2.2.4. Efecto de la inhibición de la PI3K mediante el tratamiento con wortmanina sobre la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA _A , de transportadores de GABA y cotransportadores de Cl ⁻	212
2.2.5. Efecto de la inhibición de Src mediante el tratamiento con PP2 sobre la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA _A , de transportadores de GABA y cotransportadores de Cl ⁻	214
CONCLUSIONS.....	219
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	223
ANEXO.....	259

ABREVIATURAS

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropiónico

BCA: Ácido bicinconínico

BCIP: Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

BDL: Ligadura del conducto biliar

BDNF: Factor Neurotrófico derivado del cerebro

BHE: Barrera hematoencefálica

BS3: Bis-sulfosuccinimidyl-suberate

BS3: Bis-sulfosuccinimidyl-suberate

BSA: Albumina de suero bovino

BSA: Albumina de suero bovino

CA (1, 2 y 3): Asta de Amón, capas 1, 2 y 3

CaMKII: Proteína quinasa II dependiente de calmodulina

CC12: ligando de quimioquinas 2

CCR2: receptor de CC12

CRE: Elemento de respuesta a cAMP

CREB: Proteína- 1,4,5trifosfato

DAB: diaminobenzidina

EEG: Electroencefalograma

EGTA: cido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N', N',N',N'-tetraacético

EH: Encefalopatía Hepática

EHM: Encefalopatía Hepática Mínima

EHPVO: Obstrucción de la vena porta extra-hepática

EPSP: Potencial excitatorio postsináptico

Erg3: proteína de respuesta temprana al crecimiento 3

GABA: Ácido Gamma-aminobutírico

GABA_A: Receptor de GABA tipo A

GAD: Ácido Glutámico Descarboxilasa

GAT: transportador de GABA

GAT-1: transportador de GABA 1

GAT-3: transportador de GABA 3

GC: Guanilato ciclasa

GDP: guanosin difosfato

ABREVIATURAS

- GFAP: proteína ácida fibrilar glial
- GLAST: transportador de glutamato
- Glu: Glutamato
- GluA1: Subunidad 1 del receptor AMPA
- GluA2: Subunidad 2 del receptor AMPA
- GluN1: Subunidad 1 del receptor NMDA
- GluN2A: Subunidad 2A del receptor NMDA
- GluN2B: Subunidad 2B del receptor NMDA
- GMP: Guanosín 3', 5'- monofosfato
- GMPc: Guanosín 3', 5'- monofosfato cíclico
- GTP: guanosin trifosfato
- GTP: Guanosín-5'-trifosfato
- HA: Hiperamonemia
- IBA-1: del inglés "*Ionized calcium binding adaptor molecule-1*"
- ICER: receptor temprano inducible de AMPc
- IL-17: Interleucina 17
- IL-18: Interleucina 18
- IL-1R: Receptor de interleucina 1
- IL-1Ra: Antagonista del receptor de IL-1
- IL-1 α : Interleucina 1 alfa
- IL-1 β : Interleucina 1 beta
- IL-6: Interleucina 6
- iNOS: óxido nítrico sintasa
- IPSC: corriente postsináptica inhibitoria
- IPSP: potencial postsináptico inhibitorio
- JAK: Janus quinasa
- KCC: cotransportador Na⁺ y Cl⁻
- KCC2: cotransportador K⁺-Cl⁻
- LPS: Lipopolisacárido bacteriano
- LTD: Depresión a largo plazo (del inglés "Long Term Depression")
- LTM: Memoria a largo plazo
- LTP: Potenciación a largo plazo (del inglés "Long Term Potentiation")

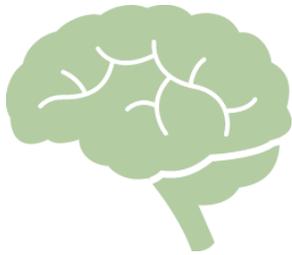
ABREVIATURAS

- MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno
- MMP: metaloproteinasas de matriz
- NF- κ B: Factor nuclear kappa B
- NF- κ B: Factor nuclear kappa B
- NGF: Factor de crecimiento nervioso
- NH₄⁺: Ión amonio
- NKCC: cotransportador Na⁺-K⁺-2Cl⁻
- NKCC1: cotransportador Na⁺-K⁺-2Cl⁻ de tipo 1
- NMDA: Ácido N-metil-D-aspartato
- NBT: del inglés “*nitroblue tetrazolium*”
- NO: Óxido nítrico
- PB: tampón fosfato
- PBS: tampón fosfato salino
- PCS: Anastomosis Porta-Cava
- PDE: fosfodiesterasa
- PFA: paraformaldehído
- PHES: del inglés “*psychometric hepatic encephalopathy score*”
- PI3K: fosfatidilinositol-3-quinasa
- PKA: proteína quinasa A
- PKC: proteína quinasa C
- PKG: serina/treonina quinasas dependientes de GMPc
- PLC- γ : fosfolipasa C γ
- PSE: Encefalopatía Porto-Sistémica
- PTP: Potenciación Postetánica
- S1P: esfingosina-1-fosfato
- S1PR(1, 2, 3, 4 y 5): receptor de la esfingosina-1-fosfato
- SEM: error estándar de la media
- SNC: Sistema Nervioso Central
- SPT: serina palmitoil-CoA transferasa
- STP: Plasticidad sináptica de corta duración (del inglés “Short Term Plasticity”)
- TEMED: Tetrametiletildiamina
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

ABREVIATURAS

TrkB: receptor quinasa B de tropomiosina

VGAT: transportador vesicular de GABA



INTRODUCCIÓN



1. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA. PAPEL DE LA HIPERAMONEMIA

1.1. Encefalopatía Hepática

La encefalopatía hepática (EH) es un síndrome neuropsiquiátrico complejo que cursa con alteraciones en la función y actividad cerebral como resultado de un fallo hepático, agudo o crónico. Está caracterizada por una alteración progresiva de las funciones cognitivas y motoras, así como de los ciclos de sueño-vigilia (Bustamante *et al.*, 1999; Weissenborn *et al.*, 2005 a; Weissenborn *et al.*, 2005 b; Felipo, 2013). Se ha visto que las diferentes formas de EH están producidas por diferentes mecanismos y, por tanto, cada una de ellas precisa de tratamientos diferentes (Felipo, 2013).

Encontramos tres tipos diferentes de EH clínica (Ferenci *et al.*, 2002):

- EH tipo A: es una EH aguda, aparece cuando se produce un fallo hepático con necrosis del hígado, lo que va a llevar a una rápida aparición de los síntomas. Las hepatitis virales agudas, las reacciones a fármacos y/o las intoxicaciones por paracetamol son las causas más habituales. Aunque en ocasiones puede ser revertida, en otras muchas puede llevar al coma o incluso a la muerte, ya que se produce un edema cerebral que lleva a un aumento de la presión intracraneal.
- EH tipo B: EH crónica, es porto-sistémica, no se produce una enfermedad hepatocelular. Encontramos derivaciones porto-sistémicas espontáneas, como la causada por la obstrucción de la vena porta extra-hepática (EHPVO). En niños se produce habitualmente por hipertensión portal (Yachha *et al.*, 1996). Estos pacientes cursan con flujo sanguíneo hepático reducido, altas concentraciones de amonio en sangre, la relación glutamina/creatinina aumentada y en ocasiones anastomosis porta-cava espontánea. Otra de las causas de EH de tipo B que se ha identificado, aunque es poco frecuente, es la ausencia congénita de la vena porta. Estos pacientes se caracterizan por presentar malformaciones que van a dar lugar a que la sangre de las venas mesentéricas drene directamente a la circulación sistémica (Grazioli *et al.*, 2000). Su diagnóstico comúnmente se da cuando son niños ya que la función hepática se encuentra dañada. No es hasta que comienzan a crecer y llegan a la edad adulta cuando se desarrolla tanto encefalopatía como daño hepático y renal (Wojcicki *et al.*, 2004).
- EH tipo C: es de tipo crónico, asociada a cirrosis hepática e hipertensión portal. Es el tipo más frecuente. Los pacientes desarrollan enfermedades crónicas del hígado, como por ejemplo cirrosis, lo que va a producir derivaciones porto-sistémicas, es decir, derivación

de la sangre portal a la circulación sistémica (Encefalopatía Porto-Sistémica, PSE). Existen algunos factores (hemorragia digestiva, alta ingesta de proteínas, estreñimiento, infección) desencadenantes de EH clínica. Estos episodios de EH pueden ser revertidos si se consigue eliminar el factor desencadenante.

La EH es un factor predictivo de mortalidad en los pacientes cirróticos. Se ha estimado que aproximadamente la mortalidad es de un 60-80% a los 3 años desde que ocurrió el primer episodio de encefalopatía clínica (Bustamante et al., 1999). Cabe mencionar que las encefalopatías hepáticas de tipo B y C no son siempre clínicamente evidentes. Si lo son se denomina encefalopatía hepática clínica y si no lo son encefalopatía hepática mínima.

Encontramos tres tipos de EH clínica en función del patrón temporal en el que se manifiesta la EH:

- EH ocasional: cuando como consecuencia de algún factor se producen uno o varios episodios de alteraciones neuropsiquiátricas. Una vez cesa no se suele poder detectar con test psicométricos y/o electroencefalograma (EEG).
- EH recurrente: se producen un gran número de episodios de alteraciones neuropsiquiátricas y pueden intercalarse con períodos de función neurológica aparentemente normal.
- EH persistente: en este caso las alteraciones neurológicas son evidentes y continuas, no suele haber una causa clara y la duración de los episodios es variable.

Además, de estos tres tipos de EH, existe una forma más leve y temprana de la enfermedad denominada encefalopatía hepática mínima (EHM). Los pacientes con EHM se caracterizan por no desarrollar signos evidentes de EH clínica; sin embargo, estos pacientes sí que pueden desarrollar diversos déficits cognitivos (percepción visuo-espacial, atención, concentración) y motores. No obstante, estos déficits no son detectables en un examen neurológico rutinario, pero si pueden evidenciarse al realizar test psicométricos o neurofisiológicos adecuados. Además, la EHM se caracteriza por disminuir la calidad de vida de los pacientes (Slowik et al., 2001), aumentar el riesgo de padecer accidentes laborales, domésticos y de tráfico y predisponer a sufrir EH clínica. Se estima que, aproximadamente, la EHM está presente en un 35-50% de los pacientes adultos con cirrosis (Mínguez *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2008).

Cabe señalar que de todos los niños con EHPVO a los que se les somete a una batería de test neuropsicológicos con el fin de medir la memoria, aprendizaje de cifras, etc., un 41% presentan

EHM (Yadav et al., 2010). Por su parte, en los pacientes cirróticos se ha visto que un 50% de los que presentan EHM acaban desarrollando EH clínica en 6 meses (Yen et al., 1990).

1.1.1. Alteraciones cognitivas en EH

Las alteraciones observadas en los pacientes con EH son muy variables y tienen importantes repercusiones en el día a día de los pacientes; desde déficits de atención, alteraciones en el procesamiento de información, cambios en la personalidad, dificultad para conducir (Schomerus et al., 1981; Bajaj et al., 2009; Felipo et al., 2013) hasta problemas para dormir, socializar o trabajar y realizar tareas domésticas (Groeneweg et al., 1998; Prasad et al., 2007). De hecho, un 50% de los pacientes con cirrosis hepática desarrollan alteraciones del sueño (somnolencia durante el día y calidad del sueño disminuida durante la noche) (Córdoba et al., 1998).

Encontramos 4 grados de EH clínica según las manifestaciones neuropsicológicas (Conn, 1979; Weissenborn et al., 2005a). Estos grados se clasifican según los criterios de West-Haven (siendo el uno el más leve y el cuarto el más severo):

- El grado I se caracteriza por falta de atención, esto se combina con estados de euforia, ansiedad y dificultad para realizar cálculos numéricos sencillos
- El grado II se caracteriza por presencia de estados de letargo, apatía, desorientación espacio-temporal, así como cambios evidentes en la personalidad
- En el grado III, aparecen episodios de somnolencia, confusión y semiestupor, sin embargo, sí que se detectan respuestas a estímulos.
- El grado IV y último, en el que el paciente se encuentra en coma y, por tanto, no se pueden realizar pruebas para evaluar la función cognitiva y motora.

Es importante mencionar que incluso en los pacientes que parecen no estar clínicamente afectados se detectan distintos déficits de atención mediante el uso de test psicométricos. Se ha demostrado que presentan disfunción en los tres subsistemas de atención: vigilia, orientación y funciones ejecutivas.

Actualmente no existe un consenso acerca de si existe deterioro en la memoria de los pacientes con EH (Weissenborn et al., 2003). Los test psicométricos usados para medir la memoria en pacientes con EH evalúan especialmente la memoria de trabajo y la memoria semántica (Weissenborn et al., 2005a). En los test en los que la atención juega un papel crucial es difícil saber si un error es fruto de alteraciones en la memoria o en la atención. Por ello, se están usando test que permiten medir la memoria a corto plazo, como por ejemplo el test de retención de dígitos,

en el que el paciente debe recordar el orden de los números tras leerlos o escucharlos, esto nos permite medir la memoria a corto plazo. El test de palabras de Luria también nos permite evaluar la memoria corto plazo (Christensen, 1984). Existen estudios que demuestran que en estos dos tipos de test los pacientes que presentan EH obtienen peores resultados que los individuos control (Weissenborn et al., 2005a). Además, se han observado también alteraciones en pacientes con EH en el test de memoria de fotografías o dibujos; este test nos permite evaluar la memoria a largo plazo. En él se muestran varias imágenes duplicadas y desordenadas y los pacientes tienen que recordar el lugar donde se encuentran las imágenes duplicadas para emparejarlas (Weissenborn et al., 2005b).

Entre las alteraciones cognitivas que desarrollan los pacientes con EH encontramos alteraciones en la percepción visuo-espacial que se manifiestan, por ejemplo, en la apraxia (trastorno neurológico en el que se produce la pérdida de la capacidad de llevar a cabo movimientos voluntarios, aun cuando se tiene la suficiente capacidad física para hacerlos). Además, se presentan déficits en el proceso de aprendizaje, especialmente a la hora de aprender nuevas tareas. De hecho, se ha demostrado que los pacientes con EH obtienen peores resultados en pruebas de inteligencia, aprendizaje y memoria, así como en test de percepción motora y espacial que los sujetos control (Puca et al., 1989). La etiología de la cirrosis no influye en los resultados obtenidos en estas pruebas (Rehnstrom et al., 1977). Existen otras habilidades que no se encuentran alteradas, como por ejemplo la capacidad verbal.

Además, los pacientes con encefalopatía hepática crónica suelen presentar alteraciones en la coordinación motora. Otras alteraciones motoras comunes son: la aquinesia, que es una reducción en el número de actos motores y afecta a algunos movimientos elaborados como la escritura, el lenguaje oral o la expresión facial (Ferenci et al., 2002); la bradiquinesia (es uno de los primeros síntomas que aparece), que es un enlentecimiento o reducción progresiva de la velocidad y amplitud de movimientos repetitivos, lo que afecta a múltiples aspectos motores de la vida diaria, como vestirse o comer, entre otros (Spahr et al., 1996, Jones y Weissenborn, 1997); asterixis que es el temblor más característico que presentan los pacientes con EH (“flapping tremor”) (Uribe et al., 1980; Jones y Weissenborn, 1997; Timmermann et al., 2002, 2005; Paul et al., 2004), sufren sacudidas repentinas e involuntarias de un músculo o grupo de músculos; rigidez, contractura permanente de diferentes músculos, lo que dificulta la movilidad (Jones y Weissenborn, 1997; Jover et al., 2003); y alteraciones de la postura (Burkhard et al., 2003; Mechtcheriakov et al., 2006).

Por todo lo expuesto anteriormente, es imprescindible el uso de test para evaluar el deterioro cognitivo en una fase temprana en pacientes cirróticos. Así, con el fin de diagnosticar la EHM se

ha seleccionado una batería de pruebas psicométricas, la batería PHES (psychometric hepatic encephalopathy score) (Weissenborn et al., 2001) que consta de 5 test psicométricos:

- Test de conexiones numéricas A: consiste en unir por orden los números del 1 al 25 en el menor tiempo posible. Se espera que use el camino más corto para conseguirlo. Este test mide el tiempo que el paciente tarda en ordenar los números.
- Test de conexión numérica B: se realiza después del test de conexiones numéricas A. En este caso hay una hoja con números del 1 al 13 y letras de la A a la L. El paciente tendrá que unir los números con las letras (la A con el 1, la B con el 2, etc.). En este test también se medirá el tiempo que el paciente tarda en llevar a cabo la tarea.
- Test de la clave de números: se le presenta una hoja con cuadrados al paciente. En la parte superior del cuadrado hay un número y en la inferior un símbolo. A cada número le corresponde un símbolo. Lo que el paciente tiene que conseguir, en otra hoja en la que aparecen los cuadrados únicamente con los números, es completarlo con el símbolo correspondiente, utilizando para ello el menor tiempo posible. En este test se cuantifica el número de cuadrados que el paciente es capaz de rellenar en un tiempo máximo de 90 segundos.
- Test de puntos seriados: el paciente tendrá 10 filas de círculos; en cada uno de estos círculos debe poner un punto en el centro con la mayor rapidez y precisión posible. Al acabar una fila tendrá que continuar en la siguiente y al finalizar se medirá el tiempo que ha tardado en realizar la tarea.
- Test de trazado de líneas: se presentan dos líneas paralelas con trazo irregular y el paciente debe trazar una línea continua entre ellas, sin cruzar ni llegar a tocar las líneas pintadas, ni tampoco levantar el bolígrafo o mover el papel. Al finalizar se medirán tanto los errores cometidos como el tiempo consumido.

Una vez realizados los diferentes test a los pacientes, los resultados tienen que ajustarse según el nivel de formación y la edad. Existen unas tablas de normalidad en sujetos control (www.redeh.org). Siempre que se obtenga un resultado igual o inferior a -4 se considerará que el paciente presenta EHM.

Todas las alteraciones en el procesamiento de información, coordinación motora, capacidad de concentración y atención, etc., tienen consecuencias muy relevantes en la vida de estos pacientes (Dhiman y Chawla, 2009), como ya se ha comentado anteriormente. Además, se ha podido demostrar que algunas de las alteraciones presentes en pacientes con EH pueden persistir aun si

se revierte el síndrome (Bajaj et al., 2010), como es el caso de la memoria de trabajo (Ahluwalia et al., 2014).

En los siguientes apartados se describen los mecanismos por los cuales se producen alteraciones tanto en la función cognitiva como motora en condiciones de EH crónica.

1.2. Acción sinérgica de hiperamonemia e inflamación en la EH

Comprender los mecanismos por los que se producen las alteraciones neurológicas en EH es la base para conseguir el desarrollo de tratamientos efectivos. La presencia de inflamación crónica en algunas enfermedades (artritis reumatoide, obesidad, diabetes, etc.) da lugar a alteraciones cognitivas y motoras. Muchos de los pacientes que presentan enfermedades inflamatorias crónicas, como artritis reumatoide, son tratados con antiinflamatorios, como con anti-TNF α . Se ha demostrado que este tratamiento mejora la función cognitiva en pacientes con artritis reumatoide que presentan deterioro cognitivo (Rafferty et al., 2012). En el caso de la EH la inflamación también está implicada en la aparición de la enfermedad. Actualmente, la hipótesis más aceptada es que la EH es inducida por la acción conjunta de hiperamonemia e inflamación (Montoliu et al., 2015). Se ha visto que tanto en pacientes como en modelos animales los niveles en sangre de TNF α se encuentran aumentados y que en modelos animales el tratamiento con anticuerpos anti TNF α no sólo consigue reducir la inflamación, sino que también mejora la neuroinflamación, la coordinación motora y las alteraciones cognitivas (Dadsetan et al., 2016a y 2016b).

En EH la hiperamonemia y la inflamación juegan un papel sinérgico (Felipo, 2013; Shawcross, et al., 2004 y 2007; Felipo et al., 2012a; Montoliu et al., 2009). El daño hepático va a inducir tanto hiperamonemia como inflamación periférica que, sinérgicamente, van a producir neuroinflamación. Finalmente, como consecuencia se van a producir alteraciones en la neurotransmisión y deterioro cognitivo y motor (Figura 1).

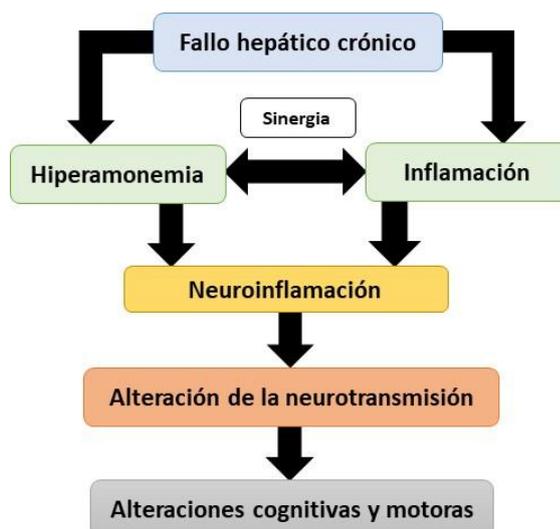
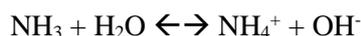


Figura 1. Sinergia entre hiperamonemia e inflamación. Mecanismos por los que se produce el deterioro cognitivo y motor en enfermedades hepáticas. *Imagen modificada de Montoliu et al. (2015).*

1.2.1. Toxicidad del amonio

El amonio, un compuesto derivado del metabolismo de los compuestos nitrogenados, se produce en todas las células del organismo como resultado de la degradación de aminoácidos, nucleótidos y otros compuestos nitrogenados. Si bien este compuesto es fundamental tanto en la síntesis de compuestos fundamentales para el organismo (por ejemplo, glutamato y glutamina), como en el metabolismo de sustancias nitrogenadas, si se alcanzan concentraciones elevadas de amonio en sangre y cerebro se producirán alteraciones funcionales en el SNC (Gerok y Haüssinger, 1984; Felipo y Butterworth, 2002). Como es de esperar, en condiciones fisiológicas, los niveles de amonio en sangre ($\approx 100 \mu\text{M}$ en humanos, $\approx 150 \mu\text{M}$ en rata) y cerebro están regulados por diferentes reacciones químicas que mantienen un equilibrio entre la formación y eliminación de amonio.

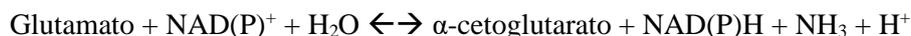
En solución acuosa el amoniaco (NH_3) se encuentra en equilibrio con el ion amonio (NH_4^+), de manera que a pH fisiológico la reacción va a favorecer la formación de NH_4^+ :



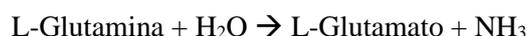
El ion NH_4^+ es incapaz de atravesar membranas celulares por sí sólo, necesita de transportadores (Amlal y Soleimani, 1997; Ramirez *et al.*, 1999; Marcaggi y Coles, 2001; Weiner, 2004). Sin embargo, el NH_3 si puede atravesar libremente las membranas celulares.

Las principales enzimas que catalizan la generación de amonio en mamíferos son las siguientes:

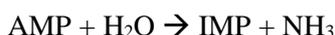
1. La **glutamato-deshidrogenasa** que predomina en hígado y en cerebro. Su principal función es catalizar la reacción química que transforma el glutamato en α -cetoglutarato:



2. La **glutaminasa** que tiene localización predominante en hígado, riñón, intestino y cerebro. En cerebro se sitúa principalmente en neuronas glutamatérgicas, concretamente en las terminaciones sinápticas, donde su principal función es la de sintetizar glutamato a partir de glutamina (ciclo glutamato-glutamina, Figura 3):



3. Las **enzimas del ciclo de los nucleótidos de purinas** se encuentran fundamentalmente en músculo y cerebro. En cerebro son uno de los principales productores de amonio (Schultz y Lowenstein, 1978):



En cuanto a la eliminación del amonio, en el caso de los seres humanos y el resto de mamíferos, es el ciclo de la urea el principal encargado (Figura 2). En este ciclo el amonio es incorporado en la urea y finalmente es eliminado en la orina. No obstante, en la mayoría de los órganos, entre ellos el cerebro y los músculos, no existe dicho ciclo completo, por lo que es la glutamina sintetasa la principal encargada de detoxificar el amonio.

En el caso del sistema nervioso central es la glutamina sintetasa, presente en astrocitos, el efector fundamental en la eliminación del amonio (Martinez-Hernandez et al., 1977; Norenberg y Martinez-Hernandez, 1979). Esta enzima utiliza el amonio y el glutamato para formar glutamina en la siguiente reacción química que requiere el consumo de ATP:



Tras esta reacción la glutamina pasará al torrente sanguíneo hasta llegar al hígado donde la glutaminasa será la encargada de escindir la y producir amonio que finalmente podrá ser eliminado por el ciclo de la urea.

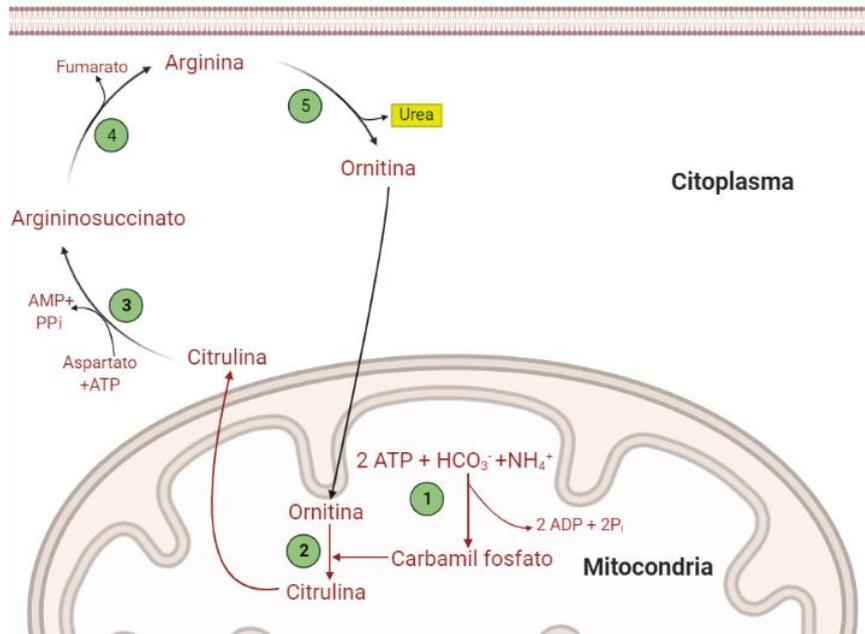


Figura 2. Ciclo de la urea en el hígado. En la mitocondria, el amonio se incorpora al carbamil fosfato mediante la acción de la carbamil fosfato-sintetasa (1). Después, mediante la acción ornitina-transcarbamilasa (2) pasa a formar citrulina por la incorporación de ornitina. Ya en el citoplasma la argininosuccinato-sintetasa (3) une la citrulina al aspartato generando argininosuccinato. Este argininosuccinato dará lugar a fumarato y arginina por medio de la acción de la argininosuccinasa (4). La arginina se escinde en ornitina y urea por la arginasa (5). La urea generada pasará a la sangre y finalmente será eliminada por la orina, mientras que la ornitina podrá comenzar de nuevo el ciclo.

En situaciones de daño hepático, se produce un incremento de los niveles de amonio tanto en sangre como en cerebro, ya que la detoxificación del amonio no puede ser llevada a cabo correctamente. Estos niveles elevados de amonio (hiperamionemia) van producir alteraciones en la transmisión sináptica y, en última instancia, alteraciones neurológicas. Dado que en solución acuosa tanto el tamaño como la carga iónica del NH_4^+ es parecida a la del ion potasio (K^+), algunos canales iónicos e incluso enzimas son capaces de usar el NH_4^+ en lugar del K^+ . Este es el caso por ejemplo de la ATPasa intercambiadora de Na^+/K^+ en neuronas (Moser, 1987). Esta enzima, al ser esencial en la despolarización y repolarización del potencial de membrana y, por ende, en la transmisión sináptica en general; juega un papel en los efectos patológicos a nivel cerebral de la hiperamionemia aguda, con concentraciones elevadas de amonio (Kosenko et al., 1994).

Por otro lado, el mecanismo clave por el que se consigue reciclar el neurotransmisor glutamato es el ciclo glutamato-glutamina entre astrocitos y neuronas (Figura 3). Este ciclo es crucial para mantener el correcto funcionamiento de la neurotransmisión glutamatérgica y en él, el amonio juega un rol fundamental. Si se produce un aumento de amonio, como ocurre en condiciones de hiperamionemia, este ciclo verá afectada su función.

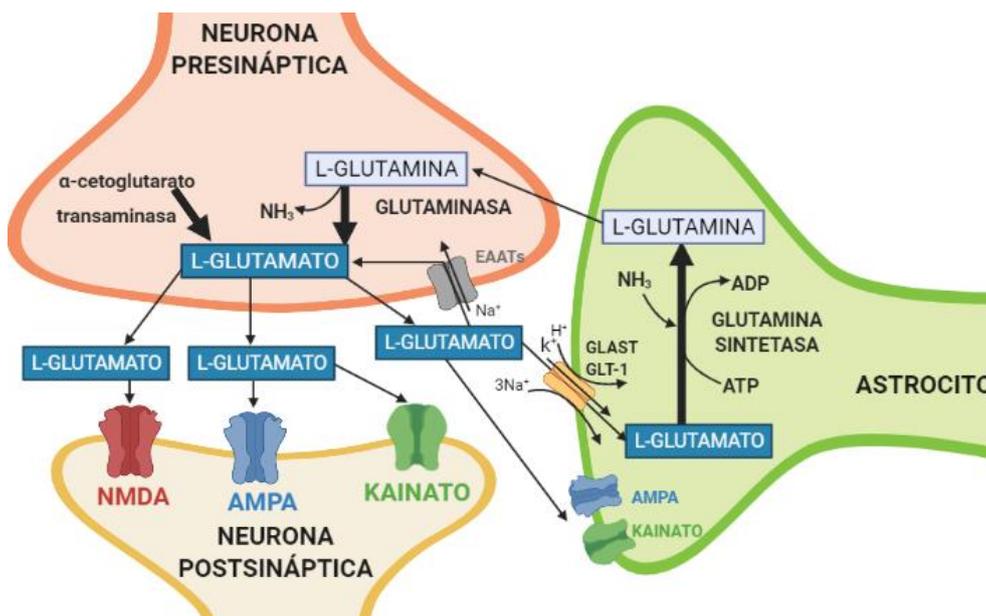


Figura 3. Ciclo glutamato-glutamina en sinapsis glutamatérgicas del cerebro. El glutamato es liberado a la hendidura sináptica por la neurona presináptica. Esto activará tanto a receptores AMPA como NMDA y de Kainato situados en la neurona postsináptica. El glutamato será recaptado por los transportadores situados bien en neuronas (EAATs) o principalmente en astrocitos (GLT-1 y GLAST). La glutamina-sintetasa será la encargada de incorporar el amonio al glutamato en astrocitos, produciendo glutamina que será liberada al medio extracelular donde será recaptada por las neuronas para ser transformada en glutamato e incorporado en vesículas sinápticas para ser liberadas. Otro mecanismo por el que las neuronas son capaces de sintetizar glutamato es en el ciclo de Krebs, a partir del α -cetoglutarato. *Imagen modificada a partir de Cabrera-Pastor (2014).*

1.2.2. Papel de la hiperamonemia en la encefalopatía hepática

Partiendo de la base de que la hiperamonemia es uno de los principales factores causantes de la EH y de que en pacientes cirróticos los factores causantes de EH se asocian con un aumento de los niveles de amonio en sangre, actualmente, muchos de los tratamientos tanto clínicos como experimentales de la EH están dirigidos a reducir los niveles de amonio. Esto puede conseguirse bien por la reducción de la ingesta de proteínas, o bien por el control de la flora intestinal productora de amonio y/o acidificación del intestino y el colón con el fin de mantener protonado el amonio y, por tanto, reducir su transporte al torrente sanguíneo.

En las deficiencias congénitas que afectan a enzimas del ciclo de la urea el funcionamiento del hígado es normal, pero se producen alteraciones en los procesos de detoxificación de amonio. Aunque no exista fallo hepático, los pacientes desarrollan encefalopatía con alteraciones similares a la observada en EH. Conforme aumentan los niveles de amonio y la duración de la hiperamonemia neonatal, de forma paralela, se produce un incremento de la gravedad de la enfermedad (Msall et al., 1984).

Además, se ha comprobado que la gravedad de los síntomas neurológicos de los pacientes cirróticos puede correlacionarse con la concentración de amonio que presentan (Clemmesen et al., 1999).

La neuropatología presente en la encefalopatía hepática comparte numerosos puntos en común con la observada a consecuencia de la exposición del cerebro a altos niveles de amonio:

- La exposición aguda a amonio y la EH aguda producen un aumento del volumen de los astrocitos, lo que provoca un edema cerebral. Esta complicación puede correlacionarse con los niveles de amonio alcanzados por los pacientes y suele producirse en pacientes con síndromes hiperamonémicos agudos, como por ejemplo aquellos con fallo hepático agudo (Clemmesen *et al.*, 1999).
- Tanto en EH crónica como ante una exposición crónica a amonio se producen los llamados Astrocitos de Alzheimer tipo II, con alteraciones tanto a nivel morfológico como funcional de este tipo celular. Estas alteraciones se observan en diferentes situaciones clínicas: en pacientes con fallo hepático crónico, en aquellos que desarrollan una hiperamonemia crónica como consecuencia de alguna enzimopatías congénitas en el ciclo de la urea (Michalak y Butterworth, 1997), en ratones y ratas con hiperamonemia inducida por inyección de ureasa (Gibson *et al.*, 1974) y en cultivos de astrocitos expuestos a amonio (Norenberg, 1987).

De hecho, la mayoría de las alteraciones neuroquímicas, metabólicas y neurológicas (cognitivas y motoras) características del fallo hepático pueden ser reproducidas en modelos animales de hiperamonemia crónica sin fallo hepático.

Todo lo expuesto anteriormente apoya el hecho de que la hiperamonemia está jugando un papel clave en el desarrollo de la EH. El otro factor clave en la etiología de la EH es la inflamación que junto con la hiperamonemia crónica inducen neuroinflamación. En el siguiente apartado se describirán las características de la respuesta neuroinflamatoria y el papel que juega este proceso en la EH tanto en pacientes como en modelos animales.

1.2.3. Neuroinflamación

La inflamación es la respuesta del sistema inmunitario ante un daño en el organismo, es decir, es un mecanismo de defensa cuyo objetivo es eliminar el daño. No obstante, en algunas enfermedades, que desencadenan un estado de inflamación crónica, no da lugar a una respuesta beneficiosa, sino que puede atacar a componentes del propio organismo (Furman et al., 2019). La barrera hematoencefálica (BHE) es una estructura formada por células del endotelio vascular

cuya principal función es la de proteger y aislar al cerebro de influencias externas, incluido el sistema inmunitario. De esta forma, cuando se produce una infección los mediadores inflamatorios, como por ejemplo las citocinas, no pueden atravesar la BHE y, por tanto, no van a producir daño a nivel cerebral. Sin embargo, el sistema inmunitario si puede enviar señales al cerebro para desencadenar una respuesta inflamatoria (Elwood et al., 2017).

Las células gliales (microglía, astrocitos y oligodendrocitos) son células del SN, cuya principal función es dar soporte estructural y metabólico a las neuronas y desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inmunitaria (Jäkel et al., 2017).

La microglía es considerada “el macrófago del SNC”, ya que constituye la primera línea de defensa del SNC, su activación constituye el primer paso para que se desarrolle una respuesta inmunitaria en el SNC. Durante el proceso de activación, la microglía se desplaza a los lugares en los que se ha producido el daño y sufre una serie de cambios morfológicos, partiendo de una morfología muy ramificada en estado de reposo, sufre un aumento en el volumen celular y un retroceso de sus procesos (disminuyen en número y aumentan de espesor), lo que da lugar al aspecto ameboide característico de la microglía activada (Figura 4). Además, durante la activación se activa la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria, cuyo resultado es la producción de citocinas y otros mediadores inflamatorios (moléculas de adhesión, radicales libres, etc.) (Dheen et al., 2007). Además, la microglía juega un papel clave en el control de las conexiones neuronales.

Los astrocitos constituyen otro componente fundamental en la respuesta inmunitaria en el SNC. Son las células más numerosas en el SNC y presentan características fisiológicas diferentes en función del área cerebral en la que se encuentran. Aunque tienen una morfología bastante heterogénea, en general tienen una apariencia estelar. Las funciones desarrolladas por los astrocitos son muy variadas, desde modulación del ambiente celular, captación y liberación de neurotransmisores, hasta el control del desarrollo de diferentes tipos celulares y contribución a la respuesta inflamatoria (Sofroniew et al., 2010). Al igual que sucede con la microglía, el proceso de activación de los astrocitos también es gradual. Ante diferentes amenazas se produce la activación astrogliar que también se caracteriza por cambios a nivel morfológico, hipertrofia de los procesos y el cuerpo celular (Figura 4), y por la secreción de mediadores inflamatorios como citocinas y quimiocinas como la interleucina 1 β (IL-1 β), la interleucina-6 o el factor de crecimiento parecido a la insulina 6 (IGF-6) (Tjalkens et al., 2017).

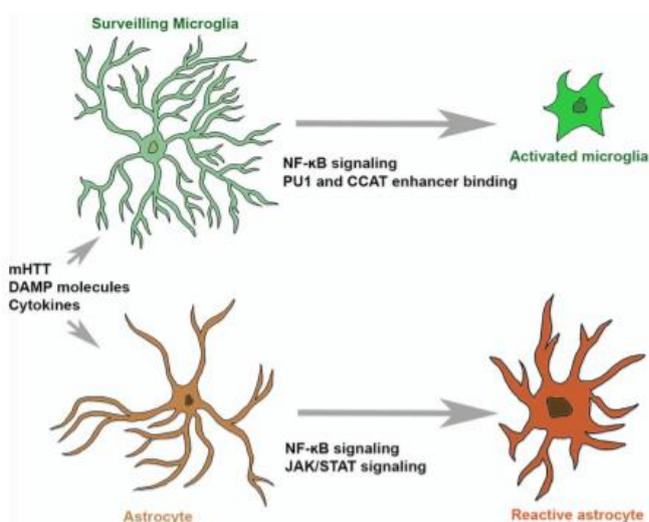


Figura 4. Activación de microglia y astrocitos. Diferentes moléculas pueden activar a la microglia y a los astrocitos, entre ellas las citocinas. Durante el proceso de activación ambos tipos celulares sufren una serie de cambios morfológicos. La microglia pasa de una morfología ramificada, característica del estado de reposo, a una morfología ameboides por el retroceso de los procesos y el aumento del volumen celular. Los astrocitos que presentan una morfología estelar en estado de reposo, cuando se activan tanto su cuerpo celular como sus procesos se hipertrofian. *Imagen obtenida a partir de Palpagama, T.H., et al., 2019.*

1.2.3.1. Neuroinflamación y Encefalopatía Hepática

La neuroinflamación tiene un papel protector. Ante una lesión cerebral se activa la respuesta neuroinflamatoria con activación de microglia y astrocitos con el fin de eliminar dicho daño. No obstante, en diferentes patologías del SNC se da una respuesta neuroinflamatoria aberrante, como ocurre en EHM en la que la neuroinflamación juega un papel central (Cabrera-Pastor et al., 2019). La neuroinflamación crónica va a producir alteraciones en la neurotransmisión y, por tanto, va a contribuir al deterioro cognitivo y motor. Se ha demostrado la presencia de neuroinflamación en diferentes modelos animales de EH y su contribución al deterioro cognitivo y motor presente en estos modelos animales. La mitad de los pacientes con EH presentan activación de microglia, la cual se piensa que inicialmente tiene un papel neuroprotector, pero al no poder frenar el desarrollo de la enfermedad, da lugar a un estado de neuroinflamación crónica (Dennis et al., 2014). También se ha descrito que la neuroinflamación y las alteraciones cognitivas y motoras pueden aparecer en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica, antes de que se llegue a un estado cirrótico, si los niveles de hiperamonemia e inflamación son suficientemente elevados (Balzano et al., 2018; Felipo et al., 2012a). Así, la neuroinflamación está jugando un papel central junto con la hiperamonemia en el desarrollo del deterioro cognitivo y motor presente en EH.

2. NEUROINFLAMACIÓN EN MODELOS ANIMALES DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

La utilización de modelos animales es fundamental no sólo para avanzar en el estudio y la comprensión de las causas de la EH, sino también para conseguir desarrollar y ensayar nuevas estrategias terapéuticas. Estos modelos tienen que reproducir las características de la EH que pueden observarse en pacientes. Los modelos animales de EH presentan tanto hiperamonemia como neuroinflamación y, además, reproducen muchas de las alteraciones cognitivas y motoras encontradas en pacientes.

2.1. Modelo de EH por anastomosis porta-cava (PCS, porta-caval shunt)

Es un modelo de tipo quirúrgico en el que se corta la vena porta, principal aporte sanguíneo del hígado, y se une a la vena cava. Se produce una disminución en la capacidad para metabolizar compuestos tóxicos, ya que la sangre procedente del intestino no va a pasar por el hígado. Entre las sustancias no detoxificadas más importantes se encuentra el amonio, cuyos niveles se ven aumentados tras la anastomosis porta-cava, desencadenando un estado de hiperamonemia. Este modelo se ha utilizado tanto en roedores como en conejos, perros y cerdos.

Las ratas PCS presentan ictericia e hipertensión portal (Kountouras et al., 1984), translocación bacteriana y disfunción del sistema inmune (Roughneen et al., 1986; Greve et al., 1990; Aronson et al., 1993; Jover et al., 2006), así como hiperamonemia y alteraciones en los ritmos circadianos (Bengtsson et al., 1986; Steindl et al., 1996) y del sueño (Hernandez-Viadel et al., 2003). Otras de las alteraciones presentes son a nivel motor, por ejemplo, hipoquinesia (Rodrigo et al., 2007b) y cognitivo, tanto la memoria como la capacidad de aprendizaje se ven disminuidos (Elizondo et al., 2007; Rodrigo y Felipe, 2007; Hernández-Rabaza et al., 2015; Dadsetan et al., 2016a). Entre las alteraciones en el aprendizaje se encuentra la disminución de la capacidad para aprender tareas en el laberinto en Y, como consecuencia de la alteración en cerebelo de la función de la vía glutamato-óxido nítrico (NO)-GMPc (Erceg et al., 2005b). Además, este modelo animal presenta neuroinflamación. Se ha observado un aumento en algunos marcadores de inflamación. Se ha visto que aumenta tanto la actividad de COX como la expresión de IL-6 en cerebro. El tratamiento crónico con ibuprofeno, un antiinflamatorio, disminuye la neuroinflamación y restaura la capacidad de aprender la tarea del laberinto en Y (Cauli et al., 2007). Esto se debe a la restauración de la función de la vía del glutamato-NO-GMPc en cerebelo in vivo. Estudios posteriores demostraron que, en las ratas PCS, los tratamientos que revierten la neuroinflamación (Hernández-Rabaza et al., 2015) y la inflamación periférica (Dadsetan et al., 2016 a, b) son capaces de revertir las alteraciones en el aprendizaje y la memoria espacial. Estos estudios indican

que la neuroinflamación juega un papel esencial en la inducción del deterioro cognitivo y motor en EH.

2.2. Modelo de EH por ligadura biliar (BDL, Bile duct-ligation)

Se trata también de un modelo quirúrgico de fallo hepático, en el que mediante ligaduras se obstruye el conducto biliar, impidiendo así el flujo de bilis al intestino. Las alteraciones más características de las ratas BDL son las siguientes: hiperamonemia (Rodrigo et al., 2005), ictericia e hipertensión portal (Kountouras et al., 1984), fibrosis que progresa a cirrosis, translocación bacteriana y disfunción del sistema inmune (Roughneen et al., 1986; Greve et al., 1990; Aronson et al., 1993; Jover et al., 2006), además de alteraciones cognitivas y motoras (De Flora et al., 1996; Marchi y Raiteri, 1996).

En este modelo animal también se desarrolla neuroinflamación que va a producir alteraciones cognitivas y motoras. Se ha observado, mediante inmunohistoquímica, que las ratas BDL muestran activación de la microglía, especialmente en cerebelo. Esta activación de la microglia va asociada a un aumento de los niveles de algunos factores inflamatorios (óxido nítrico sintasa inducible, IL-1 β , prostaglandina E2) y a la aparición de deterioro cognitivo e hipoquinesia. De forma similar al modelo anterior, en las ratas BDL el tratamiento crónico con ibuprofeno es capaz de reducir tanto la activación de la microglía como los marcadores inflamatorios y restaurar algunas de las funciones cognitivas y motoras (Rodrigo et al., 2010), confirmando el papel de la neuroinflamación en el deterioro neurológico en EH.

2.3. Modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático

Puesto que uno de los principales desencadenantes tanto del deterioro cognitivo como de las alteraciones motoras observadas en condiciones de EH crónica es la hiperamonemia, nuestro grupo desarrolló un modelo de hiperamonemia crónica “pura”, sin fallo hepático. Este modelo nos permite discernir que alteraciones son debidas exclusivamente a la hiperamonemia.

Este modelo, desarrollado a finales de los años 80 en nuestro laboratorio (Felipo et al., 1988b; Azorín et al., 1989) se basa en la administración de una dieta que contiene acetato amónico (25% p/p) a las ratas. Esto va a generar un estado de hiperamonemia crónica, caracterizada por niveles de amonio en sangre que son el doble que los de las ratas control.

Este modelo sin fallo hepático reproduce muchas de las alteraciones presentes en la encefalopatía hepática, lo que permite discernir qué alteraciones neurológicas son consecuencia de la hiperamonemia y cuales son resultado de otros factores asociados al fallo hepático. Una de las mayores ventajas del modelo de hiperamonemia es que permite mantener una condición de

hiperamonemia durante periodos largos de tiempo sin que la función hepática se vea alterada. Además, este modelo ha permitido la realización de estudios sobre la regulación del ciclo de la urea a largo plazo (Felipo et al., 1988a; Grau et al., 1992), las alteraciones de los niveles de tubulina en cerebro (Felipo et al., 1988b; Miñana et al., 1988a; 1988b) y los niveles de ATP y otros metabolitos en hígado y cerebro (Kosenko et al., 1994).

Este modelo animal se ha empleado para estudiar los mecanismos subyacentes a las alteraciones tanto cognitivas como motoras. Ha servido tanto para estudiar vías de transducción de señales in vivo (Hermenegildo et al., 1998), como para investigar cuales son los mecanismos que producen las alteraciones cognitivas (Aguilar et al., 2000; Rodrigo et al, 2010; Hernández-Rabaza et al, 2016a y 2016b) y motoras (Rodrigo et al, 2010; Hernández-Rabaza et al, 2016b) y evaluar la eficacia de algunos tratamientos para revertir estas alteraciones (Erceg et al., 2005a; 2005b; ; Cauli et al., 2007; Hernández-Rabaza et al, 2016a y 2016b)

Rodrigo et al. (2010) demostraron por primera vez utilizando este modelo que la neuroinflamación puede ser inducida por la presencia únicamente de hiperamonemia, sin que exista fallo hepático. Siguiendo esta línea, se ha demostrado que el tratamiento con fármacos que reducen la neuroinflamación permiten recuperar la función motora (Rodrigo et al, 2010; Hernández-Rabaza et al, 2016a) y cognitiva (Rodrigo et al, 2010; Hernández-Rabaza et al, 2016a y 2016b) de ratas hiperamonémicas. Estos estudios muestran que la neuroinflamación inducida por la hiperamonemia crónica es responsable del deterioro cognitivo y motor.

3. ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN COGNITIVA EN HIPERAMONEMIA Y ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

Se ha demostrado que diferentes modelos animales de EH presentan alteraciones en la función cognitiva y motora similares a los de pacientes con EH. El modelo BDL tiene hiperamonemia y alteraciones en la memoria de reconocimientos de objetos, mientras que el modelo de hipertensión portal presenta alteraciones tanto en la memoria de reconocimiento de objetos como en la memoria de localización de objetos (Leke et al., 2013).

Además, se han encontrado alteraciones en el aprendizaje espacial en el Morris Water Maze en diferentes modelos animales de EH: ratas de anastomosis porta-cava (Monfort et al., 2007; Méndez et al., 2008a), fallo hepático por tioacetamida (Méndez et al., 2008a; Singh y Trigun, 2014; Wu et al., 2016) y en hipertensión portal (Méndez et al., 2008a). Se ha descrito también que la hiperamonemia per se puede desencadenar alteraciones en el aprendizaje espacial, evaluado tanto con el laberinto radial como con el Morris Water Maze (Cabrera-Pastor et al., 2016a; Hernández-Rabaza et al., 2016a; Taoro-González et al., 2019b). Las alteraciones en la memoria

de trabajo han sido descritas también en la mayoría de modelos animales de EH: en el modelo de hipertensión portal (Méndez et al., 2008a), fallo hepático inducido por tioacetamida (Méndez et al., 2008a; Wu et al., 2016) y por anastomosis porta-cava (Hernández-Rabaza et al., 2015), así como en el modelo de hiperamonemia crónica (Cabrera-Pastor et al., 2016a; Hernández-Rabaza et al., 2016a; Taoro-González et al., 2019). Las alteraciones en el aprendizaje espacial y en la memoria de trabajo se han atribuido a alteraciones en el hipocampo, como en el caso del modelo de fallo hepático por tioacetamida (Méndez et al., 2008b) y en el modelo de hiperamonemia (Cabrera-Pastor et al., 2016a; Taoro-González et al., 2019). En el caso de ratas hiperamonémicas sin fallo hepático, el tratamiento con GMPc extracelular revierte las alteraciones en la memoria de referencia espacial, pero no las de la memoria de trabajo (Cabrera-Pastor et al., 2016a).

En el hipocampo la neuroinflamación parece estar mediando algunas de las alteraciones tanto en el aprendizaje y la memoria espacial como en el aprendizaje y la memoria que no presentan un componente espacial. Aquellos tratamientos que consiguen revertir la neuroinflamación, bien reduciendo la activación de microglía y astrocitos o bien disminuyendo la cantidad de citocinas proinflamatorias consiguen normalizar este tipo de alteraciones en el aprendizaje y la memoria (Taoro-González et al., 2019).

3.1. La neuroinflamación altera la neurotransmisión conduciendo a alteraciones cognitivas en hiperamonemia crónica y EHM.

La IL-1 β es una citocina proinflamatoria producida por muchos tipos celulares, la cual puede ejercer sus efectos de manera autocrina o paracrina. Esta citocina juega un papel fundamental en el desarrollo de la neuroinflamación en un gran número de enfermedades, como por ejemplo en Alzheimer, Esclerosis Múltiple (Hewett et al., 2012) o hiperamonemia y EH (Hernández-Rabaza et al., 2015, 2016; Cabrera-Pastor et al., 2016a; Taoro-González et al., 2018). Esta interleucina es inducible, es decir, se secreta cuando el sistema inmunitario detecta algún daño, y puede ser producida tanto por neuronas como por células gliales y endoteliales (Hewett et al., 2012). La IL-1 β ejerce su acción al unirse a su receptor, presente tanto en neuronas como en células gliales. Cuando esta interleucina se une a su receptor en células gliales va a activar a dichas células y a desencadenar un proceso inflamatorio con liberación de quimiocinas, prostaglandinas, citocinas, moléculas de adhesión, etc (Hewett et al., 2012). En el caso de las neuronas, la unión de la IL-1 β a su receptor va a desencadenar diferentes cascadas de señalización que van a producir cambios en la neurotransmisión conduciendo al deterioro cognitivo.

Las ratas con EH por PCS presentan niveles aumentados de IL-1 β y TNF- α , así como de la fosforilación y actividad de p38 en el hipocampo. Además, estas ratas PCS presentan un aumento de la expresión en membrana de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A y GluA2 del receptor

AMPA, mientras que se produce una reducción de la expresión en membrana de las subunidades GluA1 del receptor AMPA y GluN1 y GluN2A del receptor NMDA. Estas ratas PCS muestran una reducción de la memoria y de la capacidad de aprendizaje espacial en el laberinto radial y en el laberinto Morris. El tratamiento con sildenafil normaliza los niveles de IL-1 β y TNF- α , la fosforilación de p38, las alteraciones en la expresión en membrana de los receptores GABA_A, AMPA y NMDA y restablece el aprendizaje espacial (Hernández-Rabaza et al., 2015).

En el caso de ratas hiperamonémicas se produce activación de astrocitos y microglía en el hipocampo, lo que aumenta los niveles de IL-1 β e IL-6. Esto se asocia con la alteración de la expresión en membrana de los receptores AMPA, NMDA y GABA, lo que da lugar a la alteración de la neurotransmisión y al deterioro del aprendizaje espacial en el laberinto radial. El tratamiento con sulforafano reduce la activación de microglia y astrocitos. Esto reduce la neuroinflamación, normaliza la expresión en membrana de los receptores de AMPA, NMDA y GABA, y restablece el aprendizaje espacial (Hernández-Rabaza et al., 2016). Cabrera-Pastor et al., 2016a demostraron que la hiperamonemia además de aumentar los niveles de IL-1 β , también aumenta los de TNF- α , altera la expresión de membrana de las subunidades del receptor AMPA (aumento de GluA1 y reducción de GluA2) y que estas ratas presentan una alteración en la memoria de referencia. Estos cambios son revertidos por el GMPc extracelular, lo que demuestra que el GMPc extracelular modula la memoria de referencia espacial a través de la modulación de los niveles de TNF- α y de la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA. Taoro-González et al., 2018 demostraron que en hiperamonemia crónica el aumento de los niveles de IL-1 β y de la activación del receptor IL-1R va a dar lugar a una sobreactivación de Src y por ende un aumento en la fosforilación de GluN2B en el residuo de tirosina 1472, lo que va a incrementar la expresión en membrana de este receptor y la entrada de Ca²⁺ a través del mismo, lo que va a aumentar la expresión en membrana de GluA2 mediante la activación de la MAP quinasa p38, que va a reducir la fosforilación en el residuo Thr560 de la PKC ζ y, por tanto, su actividad, dando lugar a una reducción de la fosforilación en el residuo de serina 880 de GluA2 y a una mayor expresión en membrana. El aumento de la actividad de Src en las ratas hiperamonémicas también va a activar a la PKC δ , lo que aumenta la fosforilación de GluN2B en el residuo de serina 1303, reduciendo la expresión de membrana de la CaMKII y la fosforilación en el residuo de serina 831 de GluA1 y, como consecuencia, su expresión de membrana. De este modo, la hiperamonemia crónica aumenta los niveles de IL-1 β , lo que induce cambios en la expresión en membrana de diferentes subunidades de receptores AMPA y NMDA y, por tanto, alteraciones en la funcionalidad sináptica (Viviani et al., 2006; Taoro-González et al., 2018). Puesto que, como se explicará en el apartado 7, estos receptores van a modular las concentraciones intracelulares de calcio y son claves en la LTP y LTD, la IL-1 β tiene importantes efectos sobre los procesos de transmisión sináptica (Vereker et al., 2000; Kelly-Welch et al., 2003; Hoshino et al., 2017). Estas

alteraciones en la expresión en membrana de las subunidades de los receptores AMPA y NMDA, que son consecuencia de la neuroinflamación, son a su vez responsables del deterioro del aprendizaje y la memoria espacial en ratas con hiperamonemia y EH.

El bloqueo del receptor de la IL-1 in vivo, mediante el tratamiento con IL-1Ra con minibombas osmóticas, revierte la activación de la microglía en hipocampo, corteza perirrinal y corteza prefrontal, pero no en la corteza postrinal. Además, este bloqueo revierte la alteración de la expresión en membrana de subunidades GluN2A, GluA1 y GABA α 1 en hipocampo y restaura las alteraciones en la memoria de trabajo y de reconocimiento de objetos, es decir, aquellas que presentan un componente no espacial, pero no las alteraciones que tienen que ver con el espacio, la memoria y aprendizaje espacial y en el reconocimiento de localizaciones espaciales. Todo esto sugiere que la IL-1 β estaría implicada en el deterioro de la memoria no espacial inducida por la neuroinflamación, mientras que el deterioro de la memoria espacial sería independiente de la IL-1 β y estaría mediado por otros factores proinflamatorios (Taoro-González et al., 2019).

Uno de los objetivos de la presente tesis doctoral será estudiar mediante el bloqueo del receptor de la IL-1 ex vivo si el aumento de los niveles de la IL-1 β también alteran la neurotransmisión GABAérgica en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

4. EL HIPOCAMPO

En EH e hiperamonemia crónica se producen alteraciones de la función cognitiva y motora, muchas de las cuales se atribuyen a alteraciones en el hipocampo. La neuroinflamación produce alteraciones en la neurotransmisión, lo que da lugar a alteraciones tanto en el aprendizaje y la memoria espacial como en el aprendizaje y la memoria que no presentan un componente espacial. Concretamente, las alteraciones en el aprendizaje espacial y en la memoria de trabajo se han atribuido a alteraciones en el hipocampo (Cabrera-Pastor et al., 2016a; Taoro-González et al., 2019b), lo que demuestra el importante papel que está jugando esta área cerebral en la etiología de la EH. En la presente tesis doctoral todos los estudios se han llevado a cabo en el hipocampo de ratas hiperamonémicas, con el fin de elucidar los mecanismos moleculares que subyacen a las alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica y la neuroinflamación, así como evaluar la funcionalidad de los receptores AMPA, NMDA y GABA en esta área cerebral.

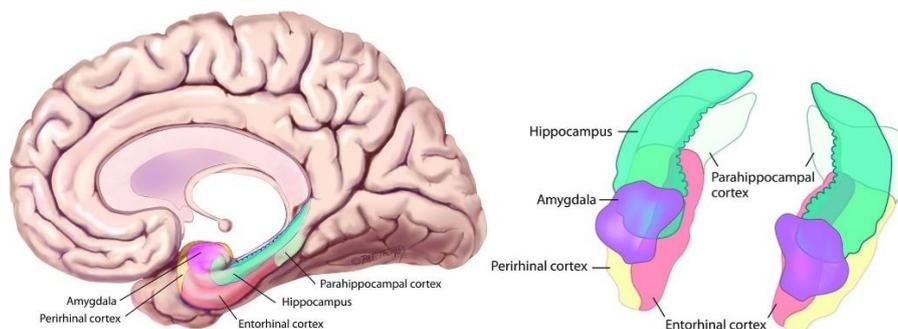


Figura 5. Anatomía del lóbulo temporal medial en humanos. Se representa el hipocampo, la corteza entorrinal, la corteza perirrinal, la corteza parahipocámpica y la amígdala. *Figura obtenida de Raslau, F.D. et al., 2015.*

El hipocampo es una estructura cortical, desarrollada desde el palio medio en todos los vertebrados. Está formado por millones de neuronas que se organizan de una forma muy característica, muchas de sus células se disponen en capas con disposición laminar. La formación hipocámpica presenta una estructura de tipo arquicorteza. En esta región cerebral podemos identificar diferentes subregiones: el giro dentado (GD, dentate gyrus), el hipocampo propiamente dicho, el subículo, presubículo y parasubículo (Andersen et al. 2007). Sin embargo, no existe un consenso acerca de la nomenclatura utilizada para definir las diferentes partes del hipocampo. Aun así, se suelen admitir tres subdivisiones: CA3, CA2 y CA1 (CA deriva de Cornu Ammonis). Todas estas partes son comunes a diferentes especies, como ratón, rata, mono y ser humano, aunque difieren en el tamaño y espesor de las capas celulares, así como en el número de subdivisiones (Figura 5).

4.1. Estructura y conectividad hipocámpica, el circuito trisináptico

Un aspecto clave de la conectividad hipocámpica es la unidireccionalidad, a diferencia de las áreas neocorticales donde la conectividad es recíproca. Cada componente de la formación del hipocampo se proyecta a su región vecina, pero generalmente no recibe una vía de retorno (Hjorth-Simonsen, 1973). Estos hallazgos fueron la base del llamado circuito trisináptico (Andersen et al. 2007).

El cortex entorrinal es considerado el primer nivel del circuito trisináptico hipocámpico. La entrada de la mayor parte de información neocortical llega a la formación hipocámpica a través de la corteza entorrinal. Concretamente, la vía más importante de entrada de información al hipocampo se produce a través de las células de la capa II que proyectan sus axones a las células del GD y CA3.

Así, en el hipocampo encontramos diferentes vías (Figura 6):

- Vía perforante: son los axones de las células de las capas superficiales de la corteza entorrinal que proyectan a las células granulares del giro dentado. Es una vía unidireccional.
- Vía de las fibras musgosas: las células granulares del GD dan lugar a axones que conectan con las células piramidales de CA3. Es también una vía unidireccional.
- Colaterales de Schaffer: reciben este nombre los axones de las células piramidales de CA3 que proyectan a la región CA1 del hipocampo, siendo la principal fuente de entrada de información a la región CA1. Es una vía puramente unidireccional.

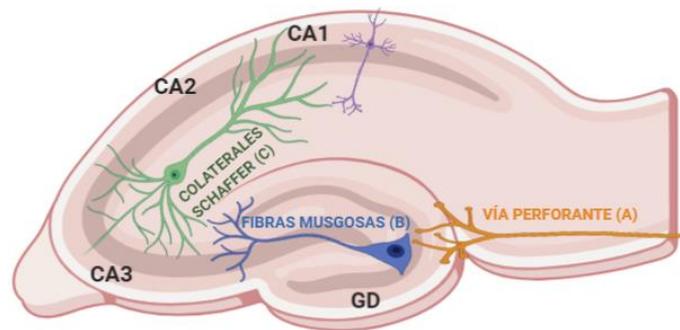


Figura 6. Principales vías del hipocampo. Principales conexiones que se dan entre diferentes regiones, circuito trisináptico. A. Vía perforante: axones excitatorios de la corteza entorrinal inervan células granulares. B. Fibras musgosas, axones de las células granulares del GD que inervan a las piramidales de CA3. C. Colaterales de Schaffer, axones de las células piramidales de CA3 que inervan a las células piramidales de CA1.

CA1 da lugar a dos proyecciones intrahipocámpicas: la primera es una proyección al complejo subicular, y la segunda termina en las capas profundas de la corteza entorrinal, cerrando así el bucle hipocámpico (Andersen et al., 2007).

Parte de esta tesis estudia la sinapsis establecida entre las neuronas piramidales de la región CA3 y las dendritas de neuronas piramidales de la región CA1 de hipocampo de rata, es decir, en las Colaterales de Schaffer.

Las proyecciones de las células piramidales de CA3 constituyen la principal fuente de entrada de información para las células piramidales de CA1 y son la principal fuente de excitación. El espesor característico los axones refleja las largas distancias que tienen que recorrer para inervar a células distales de CA1. Concretamente, estas proyecciones terminan sobre las dendritas en el *stratum oriens* y sobre las dendritas apicales en el *stratum radiatum*. En cuanto a los axones individuales de las neuronas piramidales de CA3 se caracterizan por presentar una extensa distribución, inervando a las neuronas de CA1 en gran parte del septotemporal hipocámpico; concretamente, llegan a inervar dos tercios de la extensión total.

El área proximal de CA3 (CA3 contigua a DG) proyecta preferentemente a niveles septales y distales, próximos al complejo subicular de CA1. Mientras que las células piramidales de la zona distal de CA3 envían sus axones a regiones temporales y proximales de CA1 (Ishizuka et al., 1990). Los axones de las neuronas distales de CA3 tienden a ser mucho más finos.

5. NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

El principal neurotransmisor excitatorio tanto en el hipocampo como en otras áreas del SNC de los mamíferos es el glutamato.

El glutamato activa los tres tipos principales de receptores que median la transmisión excitadora ionotrópica: los receptores AMPA (por ácido amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico), Kainato y los NMDA (N-metil-D-aspartato).

Como se comenta en el apartado 3 (Alteraciones en la función cognitiva en hiperamonemia y EH), alteraciones en los receptores AMPA y NMDA en hipocampo juegan un papel esencial en el deterioro cognitivo y motor en hiperamonemia y EH. En esta tesis vamos a estudiar como la hiperamonemia afecta la función de estos receptores en hipocampo.

Tras su liberación, el glutamato es recaptado por las neuronas y la glía por medio de transportadores. El glutamato captado por los astrocitos es transformado en glutamina por la glutamina sintetasa (Figura 3), lo que mantiene la concentración intracelular de glutamato baja, de tal forma que la absorción del glutamato sea energéticamente favorable. La captación del glutamato por los astrocitos es dependiente de gradiente electroquímico de Na^+ , se cotransportan tres iones Na^+ . Además, en este mismo proceso se cotransporta también un ión H^+ y un ión K^+ . De manera que el transporte del glutamato está modulado por gradientes electroquímicos. Gran parte del glutamato es recaptado por los astrocitos a través de transportadores específicos. En el hipocampo de los roedores el transportador más abundante es GLT-1 (también conocido como EAAT2), seguido por GLAST (EAAT1) y EAAC1 (EAAT3) (Danbolt, 2001; Andersen et al., 2007). En el hipocampo, GLT-1 y GLAST se expresan casi exclusivamente en astrocitos. Las neuronas expresan EAAC1, a un nivel relativamente bajo, por lo que probablemente su contribución en la recaptación de glutamato del medio extracelular es baja. La recaptación de glutamato tiene lugar también en las sinapsis inhibitorias, en las que el glutamato es descarboxilado para producir GABA en una reacción catalizada por la ácido glutámico descarboxilasa (GAD) (Mathews y Diamond, 2003; Andersen et al., 2007).

En los astrocitos el glutamato es convertido en glutamina por la glutamina sintasa, que se localiza exclusivamente en células gliales (Martinez-Hernandez et al., 1977). Esta glutamina formada por los astrocitos puede liberarse al medio extracelular y ser captada por las neuronas mediante

transportadores, donde puede ser convertida de nuevo en glutamato e incorporarse en vesículas sinápticas para ser liberado de nuevo, cerrando así el ciclo (Figura 3, ciclo glutamato-glutamina).

5.1. Receptores AMPA

Los receptores AMPA (AMPA) son los principales encargados de mediar la neurotransmisión excitatoria rápida en el SNC. Están formados por combinaciones de cuatro subunidades (GluA 1-4), codificadas por diferentes genes. Estas subunidades se combinan para formar homo- o heterodímeros, los cuales van a permitir la entrada de sodio (y en algunos casos de calcio) y la salida de potasio cuando se produce la unión del glutamato al receptor. El número y la composición de las subunidades de estos receptores determinan la eficiencia y la dinámica de la señalización sináptica mediada por los AMPAR. Las diferentes composiciones de subunidades confieren a estos receptores distintas propiedades biofísicas y moleculares. La subunidad GluA2 se encuentra presente en la mayor parte de receptores AMPA. Los receptores que contienen GluA2, que predominan en las neuronas, son impermeables al Ca^{2+} debido a la edición constitutiva Q/R (glutamina/arginina) de la subunidad de GluA2 (Isaac et al., 2007). Por el contrario, los receptores que no contienen GluA2, presentan una doble rectificación, tienen mayor conductividad y son permeables al Ca^{2+} (Geiger et al. 1995; Cull-Candy et al. 2006). Estos receptores permeables a Ca^{2+} desempeñan funciones muy concretas relacionadas con la señalización mediada por calcio como segundo mensajero. Son imprescindibles para desencadenar la fase inicial de la LTP en hipocampo (como se verá en el apartado 7) pero no para mantenerla.

La composición de subunidades de estos receptores varía entre las diferentes regiones del cerebro y en diferentes tipos de neuronas (Cull-Candy et al., 2006) y cambian a lo largo del desarrollo (Kumar et al., 2002), durante el proceso de plasticidad sináptica (Collingridge et al. 2004) y en estados patológicos como por ejemplo la epilepsia (Loddenkemper et al. 2014).

5.2. Receptores NMDA

Los receptores NMDA son heterotetrámeros compuestos por 4 subunidades. Todos ellos contienen dos subunidades GluN1, en combinación con dos subunidades de GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C y GluN2D) o una subunidad de GluN2 y una GluN3 (GluN3A y GluN3B) (Ulbrich e Isacoff 2008). La activación de los receptores NMDA requiere tanto de la unión del glutamato a la subunidad GluN2, como de dos moléculas de glicina, que actúa como coagonista, uniéndose a las subunidades GluN1 y/o GluN3 (Traynelis et al., 2010). La activación de los receptores NMDA compuestos por subunidades GluN1/GluN2 necesita dos moléculas de glicina como coagonista y dos moléculas de glutamato. Además, los receptores de tipo NMDA exhiben

otras propiedades singulares que los distinguen de otros tipos de receptores ionotrópicos dependientes de ligando:

- El canal del receptor NMDA se bloquea por Mg^{2+} , de forma dependiente de voltaje, por lo que la activación del receptor NMDA también es dependiente de voltaje
- Son altamente permeables al Ca^{2+} .
- Estos receptores muestran una cinética lenta e inusual.
- Son muy sensibles al microambiente extracelular, ya que poseen múltiples sitios de unión para pequeñas moléculas que modulan su activación.

Estas propiedades varían en función de la composición en subunidades del receptor, de forma que las propiedades biofísicas y farmacológicas, así como las rutas de señalización que activan estos receptores, pueden ser diferentes según la composición en subunidades de receptor.

A lo largo del desarrollo y en función del área cerebral se producen cambios en la presencia de las subunidades GluN2 y GluN3, lo que va a determinar las propiedades de estos receptores NMDA, así como el papel que juegan en los procesos de plasticidad sináptica (Cull-Candy et al., 2001). En el proceso de LTP en hipocampo es imprescindible la subunidad GluN2A, mientras que la subunidad GluN2B se ha relacionado más con el fenómeno de LTD (Fan et al., 2014). Los receptores NMDA son esenciales para procesos de plasticidad sináptica por su alta permeabilidad, además de al sodio, al calcio, que va a actuar como segundo mensajero activando vías de transmisión de señales claves para, entre otros procesos, fenómenos de LTP y LTD.

Los subtipos de receptores NMDA pueden variar en función no sólo de los tipos neuronales (Monyer et al., 1994), sino también de la localización subcelular (localización sináptica o extrasináptica) (Papouin et al., 2012). Los receptores NMDA presinápticos pueden modular la eficacia sináptica (Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008). Varios subtipos de receptores NMDA pueden coexistir en neuronas individuales (Shinohara et al., 2008). Los receptores NMDA también están presentes en otros tipos celulares como astrocitos y oligodendrocitos, teniendo en estos una composición en subunidades bastante inusual, ya que contienen subunidades como GluN3 y GluN2C (Karadottir et al., 2005).

En esta tesis se han evaluado las alteraciones en la funcionalidad de la neurotransmisión glutamatérgica tanto de los receptores AMPA como NMDA mediante el estudio de potenciales evocados en rodajas ex vivo de hipocampo de ratas hiperamonémicas.

6. NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitorio por excelencia del sistema nervioso tanto de invertebrados como de vertebrados y se sintetiza a partir del glutamato por descarboxilación por el enzima Glutamato Descarboxilasa (GAD). Existen dos tipos: GAD-65 y GAD-67. Tras la liberación al medio extracelular, el GABA es recaptado tanto por las neuronas como por las células gliales. La GABA transaminasa cataliza la reacción entre GABA y α -acetoglutarato para formar glutamato y semialdehído succínico que se oxida hasta succinato que entra en el ciclo del ácido cítrico para producir energía. La encapsulación de GABA en vesículas sinápticas es facilitada por el transportador vesicular VGAT, que también puede mediar el transporte de glicina vesicular. Una vez que el GABA difunde fuera de la hendidura sináptica es recaptado por los transportadores GAT (existen 4: GAT1-4) (Andersen et al., 2007). Estos transportadores se encuentran tanto en astrocitos como en interneuronas y en neuronas principales. Sin embargo, los diversos transportadores GABA muestran diferencias en cuanto a localización y especificidad del sustrato; por ejemplo, GAT1 es abundante en neuronas y es relativamente insensible a la β -alanina en comparación con el transportador GAT3, que se localiza principalmente en astrocitos. Es importante remarcar que la captación del GABA, al igual que otros neurotransmisores, es electrogénica, es decir, el aminoácido se transporta junto con dos iones Na^+ (y posiblemente un ión Cl^-) (Cammack et al., 1994).

Se piensa que aproximadamente un tercio del total de neuronas del SNC son GABAérgicas. La mayoría son interneuronas y, por tanto, modulan la excitabilidad de circuitos locales dentro de una determinada región cerebral (Vithlani et al., 2011).

Los receptores GABA se dividen en receptores ionotrópicos (GABA_A) y metabotrópicos (GABA_B). Los receptores GABA_C son receptores ionotrópicos con un perfil farmacológico inusual y podría decirse que son una variante de los receptores GABA_A (Barnard et al., 1998; Bormann, 2000). Dado que se piensa que no desempeñan un papel importante en el hipocampo, me centraré únicamente en los receptores GABA_A y GABA_B .

6.1. Receptores GABA_A

Los receptores GABA_A son de tipo ionotrópico y pertenecen a la superfamilia de canales iónicos formados por proteína heteropentamérica activada por ligando de tipo lazo de cisteína, al igual que los receptores de glutamato y de glicina. Existen 19 genes, englobados en 8 subclases en base a la homología de sus secuencias (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , π , θ y ρ 1-3), que van a codificar las diferentes subunidades del receptor GABA_A (Olsen y Sieghart, 2008). Las combinaciones de subunidades de los receptores GABA_A más comunes son: $\alpha 1\beta 2/3\gamma 2$, $\alpha 3\beta 3\gamma 2$, $\alpha 2\beta 3\gamma 2$, siendo β el

sitio de reconocimiento para el agonista (Ymer et al., 1989; Whiting, 2003). Cabe señalar, que en una única célula pueden ser ensamblados una gran cantidad de receptores GABA_A, de hecho, se ha visto que en una célula puede tener hasta ocho subunidades diferentes. Sin embargo, la isoforma más común en estadios adultos está constituida por las subunidades α_1 , β_2 y γ_2 (Figura 7). La composición de los receptores GABA_A no va a depender únicamente del momento del desarrollo, sino que además va a variar en función del área cerebral. En el caso del hipocampo las subunidades del receptor GABA_A más expresadas son las siguientes: α_1 , α_2 , α_4 , α_5 , γ_2 , β_1 , β_2 , β_3 , δ y ρ_3 (Lee et al., 2014). Además, la localización y expresión de las diferentes subunidades va a depender también de la región hipocampal y se ha llegado a relacionar alteraciones en la expresión de algunas de las subunidades GABA_A en determinadas patologías con déficits cognitivos y motores (Tabla 1). Un aspecto a tener en cuenta es que la localización de los receptores GABA_A depende en algunos casos de la composición de subunidades; así, por ejemplo, aquellos receptores GABA_A que expresan la subunidad γ_2 son tanto sinápticos como extrasinápticos mientras que los que expresan la subunidad δ son exclusivamente extrasinápticos (Siegel y Steinmann, 2012). Las subunidades α determinan en gran medida la localización y la función de los receptores GABA_A. Los receptores que contienen la subunidad α_5 van a mediar la inhibición tónica de las células piramidales de CA3 y CA1. Por su ubicación en la base de las espinas y en las dendritas, los receptores GABA_A que contienen la subunidad α_5 están en una posición privilegiada para modular la entrada excitatoria que surge en las espinas a través de los receptores NMDA (Glykys et al., 2008). La alteración en la expresión de esta subunidad se ha asociado con alteraciones funcionales en la plasticidad sináptica y con déficits en la memoria y aprendizaje espacial dependiente del hipocampo en un modelo animal de ansiedad (Magnin et al., 2019). La subunidad γ_2 se expresa a lo largo de todo el hipocampo, en el caso del GD sobre todo en las células granulares y en CA1 principalmente en las *basket cells* y en las células piramidales y granulares. En las dendritas de las interneuronas GABAérgicas la subunidad γ_2 suele co-localizar con las subunidades α_1 , β_2 y β_3 . La subunidad α_1 se expresa tanto en CA1, CA2, CA3 como en el GD y se localiza sinápticamente tanto en los somas como en las dendritas. También se localiza extrasinápticamente. La subunidad δ del receptor GABA_A se expresa especialmente en hipocampo, donde va a jugar un papel fundamental en la inhibición tónica en el giro dentado. En el giro dentado se expresa sobre todo en las dendritas del *stratum moleculare*.

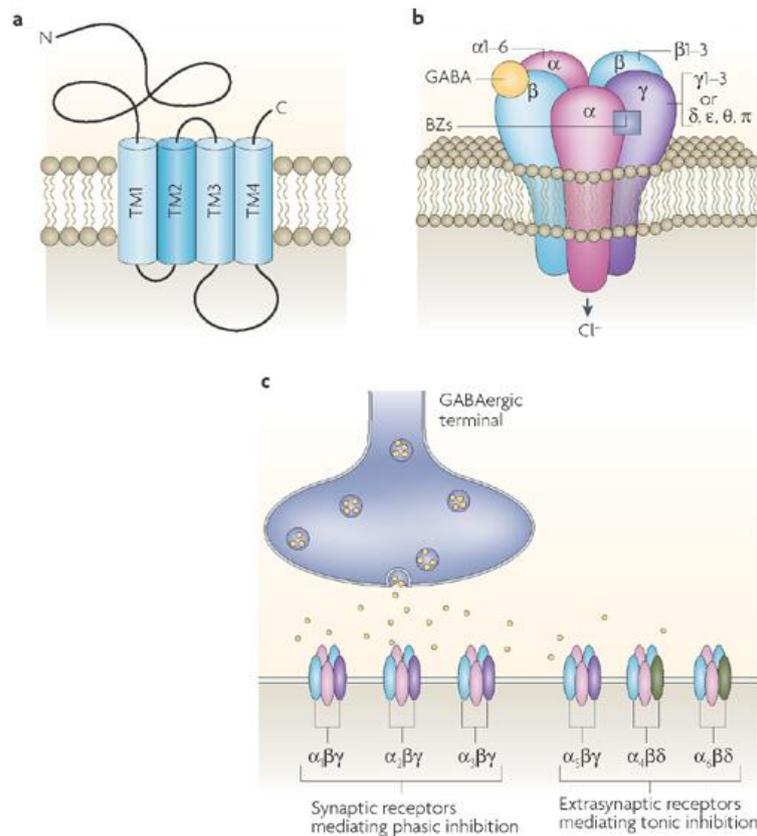


Figura 7. Estructura y localización de los receptores GABA_A según su composición. (a) Se componen de cuatro dominios hidrofóbicas transmembrana, siendo TM2 el que forma el canal. El GABA y la mayoría de inhibidores se une al extremo N terminal transmembrana. La mayoría de modificaciones postraduccionales que afectan a la funcionalidad del receptor, como las fosforilaciones, se realizan entre los dominios TM3 y TM4. (b) Los receptores GABA_A están constituidos por 5 subunidades. Existen 8 subunidades diferentes: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ, ε, π, θ y ρ, siendo la composición más común 2α, 2β y 1γ. La unión del GABA se produce entre las subunidades α y β, lo que produce la apertura del canal. (c) La localización de los receptores GABA_A varía en función de la composición de los mismos: los que contienen α(1-3), β y γ presentan localización sináptica, mientras que los que su composición es α(5, 4, 6), β, γ y/o δ se localizan extrasinápticamente. *Figura extraída Jacob et al., 2008.*

La activación del receptor GABA_A conduce a la entrada de Cl⁻ en la célula, lo que va a producir una hiperpolarización postsináptica debida a que normalmente en animales adultos el potencial de equilibrio del ión Cl⁻ es negativo con respecto al potencial de membrana en reposo, es decir, la concentración de Cl⁻ es mayor en el medio extracelular que en el interior de las neuronas. Los receptores GABA_A son canales selectivos para los iones Cl⁻, con cierta permeabilidad para aniones de bicarbonato, aunque en menor medida (Purves et al., 2014). Mientras que los neurotransmisores excitadores, como el glutamato, aumentan la conductancia catiónica y despolarizan la membrana, los neurotransmisores inhibitorios como el GABA_A aumentan la conductancia de los aniones lo que produce una hiperpolarización de la membrana.

Tabla 1. Localización celular y subcelular de los principales receptores GABA_A expresados en el hipocampo.

Subunidad	Composición del receptor	Nivel de expresión a nivel del SNC	Localización subcelular en el hipocampo
$\alpha 1$	$\alpha 1 \beta 2 \gamma 2$	60% de los receptores GABA _A	Principalmente sinápticamente: dendritas y somas Extrasinápticamente en todos los tipos neuronales
$\alpha 2$	$\alpha 2 \beta 3 \gamma 2$	15-20% de los receptores GABA _A y de las sinapsis	Células principales del hipocampo, sobre todo durante el desarrollo. Sinápticamente principalmente. También localización perisomática y en el segmento inicial del axón de las células piramidales.
$\alpha 4$	$\alpha 4 \beta 2,3 \delta$ Sólo en hipocampo	Menos de un 5% de los receptores GABA _A y de las sinapsis	Dendritas de las células granulares del giro dentado con localización extrasináptica. Perikaria de las interneuronas.
$\alpha 5$	$\alpha 5 \beta 3 \gamma 2$	Menos de un 5% de los receptores GABA _A y de las sinapsis.	Se expresa en todo el hipocampo extrasinápticamente.

Los antagonistas más conocidos de los receptores GABA_A son la Bicuculina (un alacoide), y la picrotoxina y la gabazina (SR95531), que son convulsionantes. El GABA y el muscinol son los agonistas más importantes de estos receptores. Estos antagonistas nos permiten inhibir selectivamente la neurotransmisión GABAérgica mediada por receptores GABA_A. En la presente tesis doctoral se utilizará la picrotoxina para estudiar la actividad de estos receptores mediante el estudio de potenciales evocados con el Multielectrode Array en rodajas de hipocampo con el fin de elucidar las alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica en hiperamonemia, y estudiar el efecto del tratamiento ex vivo con GMPc extracelular sobre dichas alteraciones.

6.1.1. Cotransportadores de cloro

Los cotransportadores del anión Cl^- van a jugar un papel fundamental en la regulación de la neurotransmisión GABAérgica. Estos cotransportadores son una familia de glucoproteínas que se localizan en la membrana celular y que se clasifican en diferentes grupos funcionales:

- NCC: un único tipo de cotransportador que transporta Na^+ y Cl^-
- NKCC1-NKCC2: dos subtipos que van a cotransportar Na^+ - K^+ - 2Cl^-
- KCC 1-4: cotransportan K^+ y Cl^- .

En el caso de las células del SNC juegan un papel fundamental NKCC1, que favorece la entrada de cloro en el interior celular, y KCC2 que, por el contrario, favorece la salida de cloro (Blaesse et al., 2009). Estos dos cotransportadores son los que hemos analizado en esta tesis.

El sentido del flujo de cloruro cuando se activan los receptores GABA_A va a depender del gradiente que se establezca entre el medio intra y extracelular, el cual no siempre se encuentra a favor de la entrada de cloro en la neurona. Si el gradiente de iones Cl^- disminuye o se invierte debido, por ejemplo, a la regulación al alta del Cl^- intracelular por los transportadores de iones de cloruro, la apertura de los receptores GABA_A puede causar un flujo de estos aniones desde el interior de la neurona hasta el medio extracelular, lo que lleva a la despolarización de la membrana y por lo tanto a la excitación. Este fenómeno se ha observado en determinadas regiones del sistema nervioso, en las que la activación del receptor GABA_A puede producir una despolarización, así como en algunas situaciones patológicas, como por ejemplo en el dolor neuropático. Asimismo, durante el desarrollo temprano también se ha visto que la neurotransmisión GABAérgica en algunos casos confiere excitación (Deidda et al., 2014), las neuronas inmaduras expresan el cotransportador NKCC1, que utilizando el gradiente de Na^+ produce un influjo de Cl^- , lo que aumenta el Cl^- intracelular, de modo que la activación de los receptores GABA induce una despolarización (Blaesse et al., 2009). Por el contrario, cuando las neuronas maduran, expresan KCC2 en la membrana celular (también KCC3), lo que va a producir la salida del ión Cl^- y una disminución de los niveles intracelulares de Cl^- por lo que la activación del receptor GABA producirá una hiperpolarización de la membrana. En estas condiciones, cuando el receptor GABA_A es activado, el ión cloro fluye hacia el interior celular produciendo la clásica hiperpolarización postsináptica (Blaesse et al., 2009).

6.1.2. Respuestas sinápticas inducidas por la activación de los receptores

GABA_A

En general, los receptores GABA_A van a mediar respuestas sinápticas rápidas. Estas respuestas pueden ser de dos tipos:

1. Fásica o sináptica: la activación de los receptores GABA_A de baja afinidad produce un potencial postsináptico inhibitorio rápido, de latencia corta y de corta duración (pocos milisegundos). Cabe señalar que este tipo de receptores solo se activan ante concentraciones elevadas de GABA y se activan de manera transitoria (Cherubini, 2011). Este tipo de respuesta se debe principalmente la activación de receptores que contienen las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ asociadas a la subunidad ubicua $\gamma 2$ ($\alpha 1\beta 2/3\gamma 2$, $\alpha 2\beta 2/3\gamma 2$ y $\alpha 3\beta 2/3\gamma 2$). En el hipocampo las interneuronas suelen expresar la siguiente combinación: $\alpha 1\beta \gamma 2$ (Farrant y Nusser, 2005; Brickley y Mody, 2012).
2. Tónica o extrasináptica: en este caso se produce la activación de receptores GABA_A de alta afinidad, es decir, se activan por concentraciones bajas de GABA, y no se produce una desensibilización. El efecto espaciotemporal es menos preciso. Este tipo de respuesta es crucial para la regulación de la excitabilidad en diversos circuitos neuronales (Farrant y Nusser, 2005). Los receptores implicados en la inhibición tónica, generalmente, expresan las siguientes subunidades $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ y δ ($\alpha 6\beta x\delta$, $\alpha 4\beta x\delta$ y $\alpha 5\beta x\gamma 2$), en el caso de las células piramidales de CA1 del hipocampo es muy común el receptor $\alpha 5\beta \gamma 2$ (Brickley y Mody, 2012). La presencia de la subunidad δ permite la activación del receptor por concentraciones bajas de GABA (Glykys y Mody, 2007)

En esta tesis analizaremos como afecta la hiperamonemia crónica la función de los receptores GABA_A utilizando una matriz de multiples electrodos y el posible papel de las alteraciones en la expresión en membrana de algunas subunidades del receptor GABA_A.

7. PLASTICIDAD SINÁPTICA

En este apartado se describen los principales mecanismos de plasticidad sináptica, la cual constituye la base del aprendizaje y la memoria, en los que juegan un papel clave los receptores AMPA, NMDA y GABA, cuya funcionalidad en el modelo de hiperamonemia crónica se estudia en la presente tesis doctoral.

Se conoce como plasticidad sináptica o neuroplasticidad a la habilidad del sistema nervioso para cambiar su morfología y/o actividad ante estímulos intrínsecos o extrínsecos. Se manifiesta como cambios en la forma en la que las neuronas interactúan entre sí, siendo su principal finalidad la

de debilitar o reforzar determinadas conexiones neuronales. Fue Santiago Ramón y Cajal el primero en introducir el concepto de la plasticidad del SN. Cajal postulaba que la actividad mental origina un enriquecimiento de la conectividad neuronal y, además, promueve el crecimiento de los procesos neuronales, dendritas y axones (Ramón y Cajal, 1894). Más tarde, en los años 40, Donald Hebb postuló que si la neurona pre-sináptica activa persistentemente y repetitivamente a la neurona post-sináptica, se fortalece su comunicación y que este proceso es la base del almacenamiento de recuerdos (“Neurons that fire together, wire together”). Todo esto dio pie a que los neurocientíficos intentasen demostrar experimentalmente tal fenómeno, especialmente como la plasticidad sináptica podría explicar el condicionamiento clásico pavloviano.

En 1963 se demostró que la estimulación repetida de las células pre-sinápticas de la vía perforante hipocampal produce aumentos duraderos en las respuestas post-sinápticas en las neuronas del giro dentado en conejos. Un año más tarde, Kandel demostró cómo el aprendizaje asociativo en *Aplysia*, específicamente el reflejo de huida, puede relacionarse con mecanismos de plasticidad sináptica (Kandel y Tauc, 1964).

En la actualidad, está comúnmente aceptado que los mecanismos subyacentes a la plasticidad sináptica, constituyen las bases moleculares y celulares de la memoria y el aprendizaje. En otras palabras, cualquier tipo de experiencia (pensamiento, sentimiento, sensaciones o incluso movimientos del cuerpo), tiene su origen en la activación simultánea de una determinada red neuronal. Esta red de neuronas se refuerza y consigue una consolidación en el tiempo cada vez que estas experiencias se repiten (Amtul y Rahman, 2015).

Cabe mencionar que existen una gran variedad de mecanismos de plasticidad sináptica, los cuales pueden tener lugar en diferentes áreas cerebrales, aunque el hipocampo es el área cerebral en la que más se han estudiado estos procesos. A lo largo de esta tesis cuando haga referencia a procesos de plasticidad sináptica siempre me estaré refiriendo al hipocampo, ya que es la región cerebral en la que se centra este trabajo.

Las sinapsis glutamatérgicas juegan un papel fundamental en el proceso de plasticidad sináptica, especialmente los receptores AMPA y NMDA, como se verá más en detalle en los siguientes apartados. Al unirse el glutamato a los receptores AMPA, éstos se activan durante milisegundos, lo que lleva a la entrada de sodio en la neurona post-sináptica y si el potencial excitador post-sináptico (EPSP) generado es capaz de sobrepasar el umbral, tendrá lugar un potencial de acción que terminará transmitiendo el impulso eléctrico a la siguiente neurona (Henley and Wilkinson, 2013; Purves et al., 2014). Por su parte, los receptores NMDA actúan más tarde en el tiempo y su funcionamiento es mucho más complejo. Para que un receptor NMDA se active no sólo se necesita la liberación de glutamato por parte de la neurona pre-sináptica y la consiguiente unión

del glutamato al receptor NMDA, sino también una despolarización de la neurona post-sináptica que permita la liberación del magnesio que se encuentra bloqueando al receptor en estado de reposo. Para que se produzca esta despolarización de la neurona postsináptica es necesario que antes se activen los receptores AMPA. Esto explica que la activación de los receptores NMDA sea más tardía que la de los receptores AMPA. Sin embargo, aunque los receptores NMDA se activan más tarde, por lo general, permanecen más tiempo abiertos que los receptores AMPA. La activación de los receptores NMDA permitirá la entrada de calcio en la célula, lo que llevará a la activación de diferentes cascadas de señalización imprescindibles para la plasticidad sináptica, en las que el calcio actúa como segundo mensajero (VanDongen, 2009).

Encontramos dos tipos de plasticidad neuronal en función de su duración temporal: plasticidad de corta duración y plasticidad de larga duración.

Los receptores glutamatérgicos, en especial los receptores AMPA y NMDA, como se ha comentado anteriormente son imprescindibles para los procesos de plasticidad sináptica y, por tanto, son también fundamentales para los diferentes tipos de memoria y aprendizaje. Por esta razón se ha atribuido clásicamente el fenómeno de LTP a las sinapsis excitatorias glutamatérgicas, razón por la cual la aportación de la neurotransmisión GABAérgica ha sido poco estudiada. Esta neurotransmisión GABAérgica va a garantizar un correcto equilibrio entre la excitación e inhibición de los diferentes circuitos neuronales, estando implicada en la regulación de procesos como el aprendizaje y la memoria (Bradford, 1995; Gale, 1992; Federico y MacVicar, 1996; Cossart et al., 2005; Fritschy, 2008).

7.1. Plasticidad sináptica de corta duración

La plasticidad de corta duración (STP, Short Term Plasticity) pueden generar potenciación o depresión y su rango de actuación puede variar desde milisegundos hasta minutos. Además, una misma neurona pueden expresar diferentes tipos de STP (Blackman et al., 2013).

El principal mecanismo de la STP se basa en la liberación de neurotransmisor en diferentes escalas de tiempo, así como mecanismos postsinápticos basados en la sensibilización de los receptores postsinápticos y/o de las rutas de señalización metabotrópicas (Dittman et al., 2000; Fortune y Rose, 2001; Fuhrmann et al., 2002; Zucker et al., 2002).

Encontramos tres categorías principales de STP (Regehr, 2012):

1. Depresión: tiene lugar cuando en una sinapsis el segundo de dos estímulos estrechamente espaciados en el tiempo evoca una respuesta mucho más pequeña que la generada por el primero. Como estamos hablando de STP esta reducción de la fuerza sináptica durará

desde cientos de milisegundos hasta unos pocos segundos (Figura 8A). Si la activación presináptica se produce de manera sostenida puede dar lugar a una depresión más profunda que se recupera más lentamente (Figura 8B).

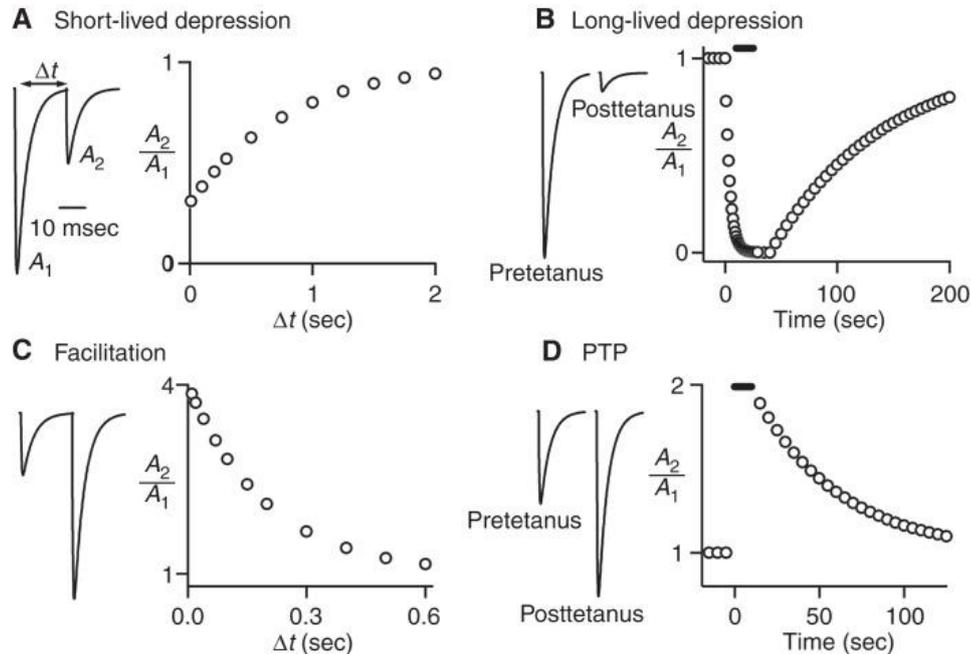


Figura 8. Formas de Plasticidad Sináptica de Corta duración. A) La depresión de corta duración se observa en algunas sinapsis cuando el axón presináptico se estimula dos veces con una diferencia temporal entre estímulos Δt . B) En algunas sinapsis la estimulación de baja frecuencia da lugar a una respuesta sináptica estable, pero la estimulación de alta frecuencia sostenida da lugar a una depresión que persiste durante decenas de segundos incluso cuando se reanuda la estimulación de baja frecuencia. C) En algunas sinapsis se observa una facilitación ante impulsos emparejados que dura cientos de milisegundos. (D) En algunas sinapsis se observa un aumento o potenciación posttetánica de las respuestas sinápticas que dura decenas de segundos o minutos después de la estimulación tetánica. Imagen extraída de Regehr, 2012.

2. Facilitación: el segundo de dos estímulos estrechamente espaciados evoca una respuesta mayor que el primero, siempre y cuando los estímulos tengan lugar con una separación temporal de cientos de milisegundos a segundos entre sí (Figura 8C). Esto hace que se libere más neurotransmisor por cada potencial de acción sucesivo, lo que va a producir que el potencial postsináptico (EPP) aumente progresivamente. La facilitación sináptica es el resultado de la elevación prolongada de los niveles de calcio presinápticos tras la actividad sináptica. Aunque la entrada de Ca^{2+} en el terminal presináptico se produce en uno o dos milisegundos después de un potencial de acción, los mecanismos que devuelven el calcio a los niveles de reposo son mucho más lentos. Así pues, cuando los potenciales de acción se producen muy cerca en el tiempo, el calcio se acumula dentro del terminal y permite que se libere más neurotransmisor ante un potencial de acción presináptico posterior.

3. Potenciación: si se producen potenciales de acción a alta frecuencia (tétanos) se producirá una elevación aún más prolongada de los niveles de calcio presináptico, lo que provocará una mejora sináptica: potenciación posttetánica (PTP). Para estas formas de plasticidad cada estímulo del tren de estímulos produce un pequeño aumento, pero los efectos acumulativos de muchos estímulos pueden llevar a un aumento en la respuesta de varias veces en comparación con la respuesta inicial (Figura 8D). La PTP se retrasa en su inicio y típicamente persiste durante algunos minutos después de que el tren de estímulos termina. La diferencia de duración permite distinguir la PTP de la facilitación sináptica.

En la mayoría de las sinapsis del SNC, estas formas de STP tienen un origen presináptico. La facilitación y la potenciación surgen como consecuencia de la elevación de los niveles de calcio presinápticos durante la actividad repetitiva, lo que produce un aumento de la probabilidad de fusión de vesículas sinápticas. Mientras, la depresión a corto plazo se atribuye a varios mecanismos, entre ellos el agotamiento de las vesículas sinápticas, la inactivación de los sitios de liberación de estas vesículas, la reducción de la afluencia de calcio debido a la inactivación de canales de calcio o la inhibición del canal de calcio debido a las bajas concentraciones del mismo (Zucker et al., 2002; Fioravante et al., 2011).

Las sinapsis de los diferentes circuitos neuronales pueden expresar diferentes combinaciones de estos procesos de STP, los cuales van a modular la fuerza y la eficacia sináptica, actuando como un filtro dinámico para la transmisión de frecuencias o patrones de estimulación concretos (Dittman et al., 2000; Klyachko et al., 2006). Sin embargo, es difícil conocer la contribución de cada uno de los mecanismos de STP; en los últimos años, esta limitación técnica se ha visto parcialmente resuelta por el desarrollo de amplios modelos computacionales (Kandaswamy et al., 2010). El fenómeno mejor estudiado con estos modelos computacionales ha sido la facilitación sináptica, la cual puede evaluarse fácilmente con modelos sinápticos, mediante un par de estímulos estrechamente espaciados, lo que se conoce como un protocolo de impulsos emparejados. En algunas sinapsis, la facilitación se ha subdividido en un componente rápido que dura decenas de milisegundos y un componente relativamente más lento que dura aproximadamente cien milisegundos en condiciones fisiológicas. Se cree que la facilitación depende de la elevación de los niveles de calcio residual presináptico que puede ser resultado de varios mecanismos: la saturación de los tampones de calcio presinápticos (Neher, 1998), el aumento de las corrientes de calcio presináptico (Catterall y Few, 2008) y posiblemente los cambios en la sensibilidad del sensor de calcio (Atluri et al., 1996; Tang et al., 2000) que, sin embargo, todavía no se ha identificado.

7.1.1. Plasticidad sináptica de corta duración en el hipocampo

Los circuitos hipocampales han sido uno de los sistema modelo en los que estudiar las funciones de facilitación, así como otros componentes de la STP. Diferentes estudios han demostrado que las sinapsis excitatorias del hipocampo, específicamente, las de las células de las regiones CA3 y CA1 producen descargas de picos de alta frecuencia cuando un animal pasa por lugares específicos del entorno (place-fields), proporcionando información sobre la posición del animal (Klyachko et al., 2006). Durante la navegación espacial, las place cells del hipocampo alternan períodos bastante largos de prácticamente no actividad (cuando el animal no está en el campo de lugar de dicha célula) y períodos más cortos de disparo rápido que ocurren cuando el animal se encuentra en un lugar determinado. Este patrón general de disparo es típico de todas las células de lugar del hipocampo. Este rápido cambio de la fuerza sináptica, que se produce en decenas de milisegundos, es esencial para la adecuada sintonización de la respuesta sináptica en las sinapsis de CA3-CA1 y es esencial para reconocer y amplificar los patrones de actividad de place-fields. Es posible que alteraciones en este proceso contribuyan al deterioro del aprendizaje y la memoria espacial en hiperamonemia.

Por su parte, las colaterales de Schaffer, además de excitar a las células piramidales de CA1, pueden activar las interneuronas inhibitorias, las cuales van a mediar la inhibición de las mismas células piramidales de CA1 (Buzsáki, 1984). De este modo las sinapsis inhibitorias se activan unos milisegundos después de que llegue la señal excitatoria. Esto significa que los trenes de estímulos de CA3 no sólo activan las sinapsis excitatorias de CA1, sino que también activan a las interneuronas para activar rápidamente las sinapsis inhibitorias en la misma célula piramidal.

Así pues, la facilitación surge como un importante contribuyente a diversos tipos de procesamiento de información sináptica y puede mediar algunas de las complejas funciones cognitivas en las redes neocorticales.

7.2. Plasticidad de larga duración

Dentro de las distintas formas de plasticidad sináptica una de las más estudiadas es la plasticidad asociativa o Hebbiana, dado que es clave para el aprendizaje asociativo. En 1973, Bliss y Lømo, demostraron el fenómeno de “potenciación sináptica a largo plazo” (LTP, del inglés Long-Term Potentiation). Vieron que ante una estimulación tetánica de las fibras presinápticas de la vía perforante se produce un aumento duradero y estable de la respuesta sináptica originada en las células granulares. La LTP constituye la primera evidencia electrofisiológica de que si se modifican los patrones pre y postsinápticos de activación se van a producir cambios a largo plazo

en la eficiencia sináptica. El hipocampo ha sido la región cerebral en la que más se ha estudiado el proceso de LTP.

Los fenómenos de potenciación (LTP, long-term potentiation) y depresión de larga duración (LTD, long-term depression) de la transmisión sináptica permiten a las neuronas responder a diferentes situaciones internas y externas y se manifiestan como cambios en la fuerza sináptica que perduran en el tiempo y pueden tener un origen presináptico y/o postsináptico (Turrigiano, 2008).

7.2.1. Plasticidad de larga duración: neurotransmisión glutamatérgica

Existen tres hipótesis clásicas acerca de los mecanismos que llevan a la plasticidad de larga duración, siendo todos ellos no excluyentes:

- Inserción y/o internalización de receptores AMPA en la membrana de la neurona postsináptica (Huganir y Nicoll, 2013).
- Cambios en la liberación de neurotransmisor por parte de la neurona presináptica (Malinow y Tsien, 1990).
- Modificaciones en la fosforilación de receptores AMPA (Lee et al, 2000).

El mecanismo de plasticidad de larga duración se ha utilizado a lo largo de los últimos años como base para explicar una gran variedad de procesos fisiológicos, como los procesos de cambios sinápticos durante el desarrollo, respuestas a lesiones, respuestas a entrenamiento sensorial y aprendizaje, así como en procesos de generación de memoria. En la figura 9 se detallan los principales mecanismos de plasticidad sináptica.

7.2.2. Plasticidad de larga duración: neurotransmisión GABAérgica

En el caso de la plasticidad sináptica inhibitoria, la liberación de GABA y la saturación de los receptores GABA_A va a dar lugar a cambios en la eficacia sináptica inhibitoria, debido principalmente a cambios en la cantidad de receptores, bien por difusión lateral de los receptores extrasinápticos, disminución de la internalización de receptores de la membrana, modificaciones postraduccionales como la fosforilación o bien por el transporte e inserción de nuevos receptores GABA_A en la membrana. (Bogdanov et al., 2006; Jacob et al., 2008).

En esta tesis vamos a estudiar cómo afecta la hiperamonemia a la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica en hipocampo y algunos mecanismos por los que se altera esta

última. Partimos de la hipótesis de que la alteración de la neurotransmisión es consecuencia de la neuroinflamación y de que esta contribuye a cambios en la señalización por esfingolípidos.

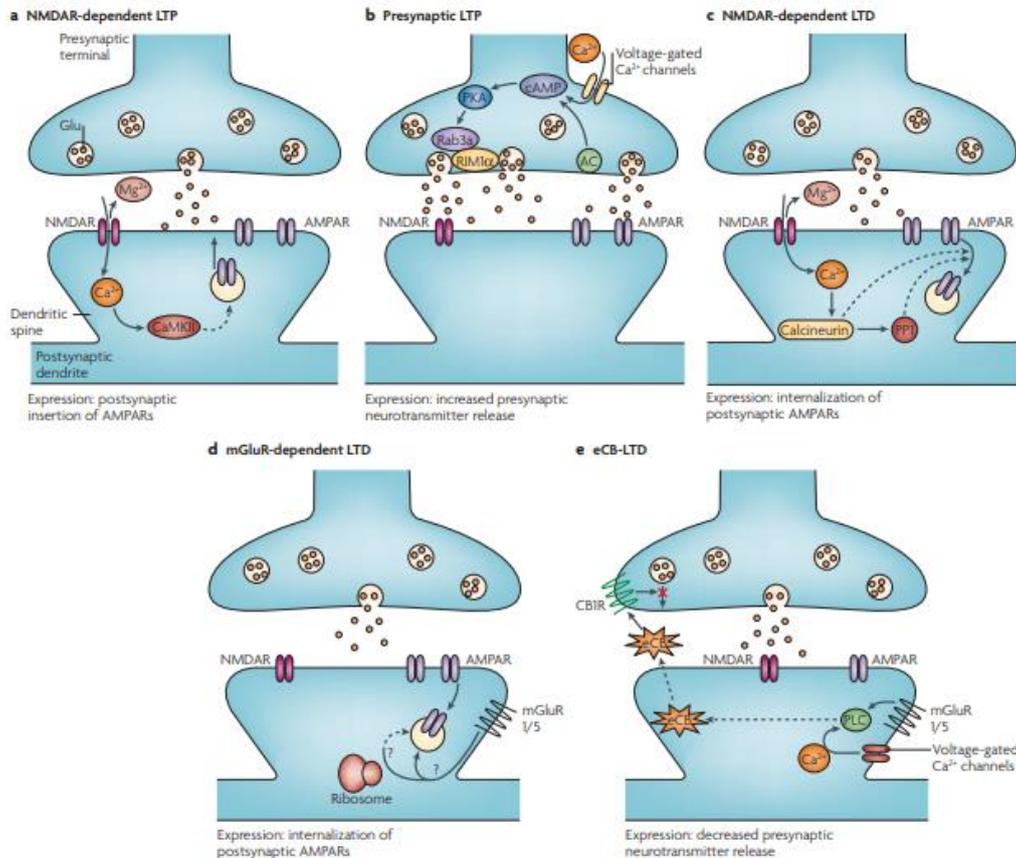


Figura 9. Principales mecanismos de LTP y LTD. (a) La activación de los receptores NMDA y de la proteína quinasa II dependiente del complejo Calcio/Calmodulina (CaMKII) es clave en la inducción de LTP dependiente de este tipo de receptores postsinápticos. Cuando se libera el bloqueo por Mg^{2+} dependiente de voltaje de los receptores de NMDA y, por ende, se desbloquea el receptor, la sinapsis detecta la coincidencia de la liberación presináptica de glutamato y la despolarización postsináptica. El principal mecanismo de la LTP es la inserción de receptores AMPA en la membrana postsináptica, influenciada por modificaciones postraduccionales. (b) Se ha definido una forma de LTP presináptica en diferentes regiones cerebrales. En hipocampo en la sinapsis establecida entre las fibras musgosas y la región CA3 y en el cerebelo en la sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje. Se produce la entrada de Ca^{2+} en la neurona presináptica, que activara a la adenilato ciclasa (AC), ante la actividad sináptica repetitiva. La AC va a aumentar los niveles de AMPc, que activara a la proteína quinasa A (PKA). Esto modificará las funciones de Rab3a y RIM1 α lo que va a producir un aumento en la liberación de glutamato. (c) La LTD dependiente de receptores NMDA se induce tras la entrada de calcio a través de los receptores de tipo NMDA postsinápticos, lo que incrementa la actividad de la fosfatasa Calcineurina y la proteína fosfatasa 1 (PP1). Esto va a dar lugar a un proceso de internalización de receptores AMPA postsinápticos. (d) La activación del receptor metabotrópico de glutamato mGluR1/5 postsináptico desencadena la internalización de los receptores AMPA postsinápticos, un proceso que en determinadas ocasiones requiere de la síntesis de proteínas. (e) Representa la forma de LTD más recientemente descubierta, y que se ha observado en muchas regiones del cerebro. La activación del receptor mGluR1/5, conduce a la activación de la fosfolipasa C (PLC) y/o a un aumento del Ca^{2+} intracelular, lo que lleva a la síntesis del endocanabinoide (eCB) en la neurona postsináptica. El eCB se libera posteriormente de la neurona postsináptica y viaja de forma retrograda para unirse a los receptores de los cannabinoides tipo 1 presinápticos (CB1R).

La activación prolongada de los CB1R deprime la liberación de neurotransmisores. Imagen extraída de Kauer y Malenka, 2007

En el siguiente apartado se tratará el papel que desempeñan los esfingolípidos en la neuroinflamación y en la modulación de la neurotransmisión; especialmente, la esfingosina-1-fosfato.

8. PAPEL DE LOS ESFINGOLÍPIDOS EN LA NEUROINFLAMACIÓN Y EN LA MODULACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN

Los esfingolípidos son lípidos complejos que derivan de la esfingosina, un aminoalcohol insaturado de 18 carbonos. Resultan de la unión de diferentes sustituyentes al grupo alcohol. Se encuentran en las membranas celulares tanto animales como vegetales y son especialmente abundantes en el SNC. La esfingosina, la esfingosina-1-fosfato (S1P) o la esfingomielina son algunos de los metabolitos intermedios del metabolismo de los esfingolípidos (Merrill et al., 2011). Los esfingolípidos actúan como moléculas de señalización regulando multitud de procesos celulares: proliferación, supervivencia, inflamación y tráfico de células del sistema inmunitario, etc. (Lee et al., 2020). En este caso nos centraremos en el papel de la esfingosina-1-fosfato en la modulación de la neuroinflamación y de la neurotransmisión.

En los últimos años, numerosos estudios han destacado el papel de los esfingolípidos en la regulación de la neuroinflamación, mediando procesos de muerte celular (Di Pardo y Maglione, 2018), la activación de células gliales (Assi et al., 2013) y la expresión y producción de mediadores inflamatorios (Maceyka et al., 2014). En algunas enfermedades neuroinflamatorias se observan alteraciones de los esfingolípidos, que implican un aumento de la cantidad de ceramida y una disminución de la esfingosina quinasa (Maceyka et al., 2014). Estas tendencias se observan en una fase temprana del desarrollo de la enfermedad y se ha propuesto que los esfingolípidos podrían ser dianas terapéuticas y marcadores diagnósticos para diferentes enfermedades neuroinflamatorias.

Existen dos vías principales de producción de esfingolípidos (Obinata et al., 2019):

1. Síntesis de novo por la acción de dos enzimas: la serina palmitoil-CoA transferasa (SPT) y la ceramida sintasa (CerS). Se produce la condensación de serina y palmitoil-CoA para producir 3-ceto-dihidroesfingosina por la acción de la serina palmitoiltransferasa, seguida de varias reacciones enzimáticas para producir ceramida. La ceramida se metaboliza posteriormente para generar esfingolípidos complejos como la esfingomielina y los glicoesfingolípidos, principales fosfolípidos de las membranas celulares.

2. Mediante la degradación de la esfingomielina de la membrana por las esfingomielinasas. La ceramida resultante puede ser hidrolizada por la ceramidasa a esfingosina, a partir de la cual se produce S1P por la acción de las esfingosina quinasa 1 y 2. Normalmente, las concentraciones intracelulares de S1P se mantienen bajas por la acción de la S1P fosfatasa o de la S1P liasa. La S1P liasa degrada de forma irreversible la S1P a fosfoetanolamina y hexadecenal, que sirve como paso final de la degradación de las especies de esfingolípidos

8.1. Esfingosina-1-fosfato

La S1P desempeña un papel destacado en la señalización celular para mantener la homeostasis del organismo y modular la inflamación. Puede actuar como segundo mensajero intracelular o como ligando extracelular para sus 5 receptores acoplados a proteínas G S1P1-S1P5 (Fischer et al., 2011). Puede actuar tanto de forma autocrina como paracrina o endocrina. En el caso del SNC se expresan todos los receptores menos el S1PR4, siendo el receptor más estudiado hasta el momento el S1PR1 por su potencial como diana terapéutica.

Las células del SNC, incluidas la microglía, las neuronas y los astrocitos, regulan los niveles de S1P a través de la esfingosina quinasa SphK1 y expresan en gran medida los S1PR. Las investigaciones sobre el impacto del metabolismo y la señalización de S1P en la neuroinflamación se han realizado principalmente en las células gliales (Grassi et al., 2019). Se ha descrito un papel de la S1P en la proliferación celular, la migración y los cambios en la morfología de los astrocitos y la microglía y se ha sugerido un papel crucial de la S1P en condiciones neuroinflamatorias (Assi et al., 2013; Karunakaran et al., 2017). La activación celular por LPS estimula la señalización SphK1-S1P, aumentando la expresión de SphK1 y la generación de S1P. Esto, a su vez, provoca un aumento de la proliferación celular, así como de la síntesis de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-17) y moléculas neurotóxicas. El tratamiento con S1P induce una respuesta proinflamatoria, mientras que la supresión de SphK1 reduce dicha respuesta, lo que sugiere que la producción de estos mediadores proinflamatorios depende directamente de la síntesis de S1P en las células gliales (Maceyka et al., 2014; Spiegel et al., 2011). También se ha demostrado que la supresión de SphK o del receptor de S1P reduce la proliferación de células gliales (Wu et al., 2008). El tratamiento con FTY720, un antagonista del receptor S1PR1, de astrocitos humanos tratados a su vez con TNF- α , reduce la secreción de la proteína quimiotáctica de monocitos-1, lo que demuestra que el bloqueo de S1PR1 reduce la respuesta proinflamatoria de los astrocitos (Rothhammer et al., 2017). Estos estudios indican que la S1P producida por SphK1 desempeña un papel crucial en la regulación de la respuesta proinflamatoria de las células gliales y es clave en la etiología de patologías con un componente neuroinflamatorio.

En el caso de la EH, se ha demostrado que el tratamiento con FTY20 en ratas BDL consigue revertir gran parte de las alteraciones electrofisiológicas presentes en el hipocampo de este modelo animal, restaurar en gran medida la LTP y la memoria (Shabani et al., 2019). Además, se ha descrito que, en pacientes con enfermedad hepática crónica, los niveles séricos de S1P disminuyen drásticamente con los estadios avanzados de la enfermedad hepática y son un factor predictivo de mortalidad. Dado que la S1P es un potente regulador de la integridad endotelial y de la respuesta inmunitaria, los niveles bajos de S1P pueden influir significativamente en el fallo multiorgánico (Mücke et al., 2020). En ratas BDL el tratamiento con JTE013, un antagonista del receptor S1PR2, reduce tanto la fibrosis como la inflamación, inhibiendo la vía ERK1/2 y AKT que, a su vez, activa NFκB (González-Fernández et al., 2017). Estos estudios sugieren un papel de la S1P en la patogénesis de la EH.

La inhibición de S1PR2 con JTE013 en condiciones de isquemia produce una disminución tanto en el número como en la activación de la microglía (Sapkota et al., 2019). Esto mismo también ocurre en condiciones de isquemia cuando se bloquean los receptores S1PR1 y S1PR3 (Gaire et al., 2018a; Gaire et al., 2018b). Además, la S1P a través del S1PR2 puede modular la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1β e IL-18) en arteroesclerosis. Se ha comprobado que el tratamiento con JTE013 revierte el aumento de los niveles de IL-1β e IL-18 en plasma (Skoura et al., 2011).

Puesto que la S1P parece estar jugando un papel clave en la respuesta neuroinflamatoria a través del receptor S1PR2, la presente tesis doctoral tratará de elucidar su papel en las alteraciones observadas en hiperamonemia bloqueando S1PR2 con JTE013 en el hipocampo de ratas con hiperamonemia crónica. También analizaremos las vías implicadas en sus efectos sobre la neuroinflamación y la neurotransmisión.

En el siguiente apartado se tratará el papel del BDNF, una neurotrofina, que juega un importante papel en la neuroinflamación y la neurotransmisión y que, en el hipocampo, es una molécula clave en procesos como el aprendizaje y la memoria, por lo que la consideramos una buena candidata a mediar las alteraciones en la neurotransmisión en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

9. NEUROTROFINAS: BDNF

Las neurotrofinas son factores de crecimiento, sintetizados en el SNC tanto por neuronas como por células gliales. Encontramos tres tipos: el factor de crecimiento nervioso (NGF, de sus siglas en inglés nerve growth factor), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, de sus siglas en inglés brain-derived neurotrophic factor) y las neurotrofinas 1, 3 y 4 (NT-1, NT-3 y NT-4,

respectivamente). Las neurotrofinas son importantes reguladores de la supervivencia, el desarrollo y de la función y plasticidad neuronal. Estas neurotrofinas median sus efectos a través de receptores tirosina quinasa. Existen tres tipos de receptores sobre los que actúan las neurotrofinas: TrkA que es específico de NGF, TrkB al cual se unen BDNF y NT-4, y TrkC específico de NT-3 (Huang y Reichardt, 2001). La unión de estas neurotrofinas a los receptores Trk da lugar a la fosforilación de residuos de tirosina en los dominios citoplásmicos, lo que va a activar el receptor. Mientras, la fosforilación de otros residuos de tirosina va a promover la señalización intracelular mediante el acoplamiento de proteínas adaptadoras que contienen motivos de unión a fosfotirosina o src-homología-2 (Pawson y Nash, 2000) (Figura 10). Estas proteínas adaptadoras acoplan los receptores Trk a cascadas de señalización intracelular: Ras/ERK, la vía de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI-3-quinasa)/Akt-quinasa, y la fosfolipasa C (PLC)- γ 1 (Reichardt y Fariñas, 1997; Kaplan y Miller 2000).

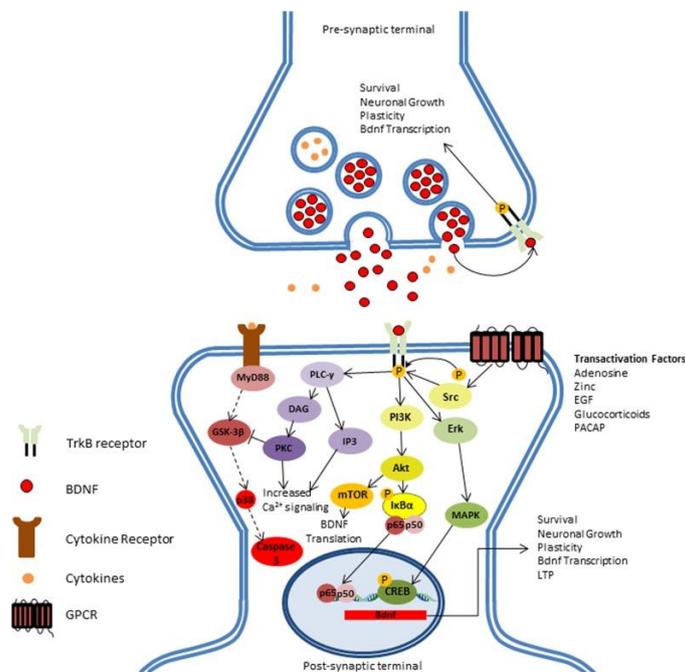


Figura 10. Vías de transducción de señales mediadas por el receptor Trk. La unión del BDNF al receptor TrkB conduce al reclutamiento de proteínas que interactúan con residuos específicos de fosfotirosina en los dominios citoplasmáticos del receptor. Estas interacciones conducen a la activación de vías de señalización: fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3k) y fosfolipasa C (PLC)- γ , lo que modula la activación de la expresión génica, la supervivencia neuronal, la plasticidad neuronal y el crecimiento de las neuritas. *Imagen extraída de Huang, et al., 2001.*

9.1. Papel del BDNF en la modulación de la neuroinflamación

En el cerebro, el BDNF participa en la plasticidad y la supervivencia neuronal, la formación de nuevas sinapsis, la ramificación dendrítica, así como en la modulación de diferentes sistemas de neurotransmisión (Edelmann et al., 2014; Panja et al., 2014). Muchas patologías cerebrales

provocan una reducción de los niveles de proteína BDNF tanto en el cerebro como en el suero de los pacientes (Lima Giacobbo et al., 2019). La expresión del gen BDNF está regulada por una amplia gama de estímulos endógenos y exógenos (por ejemplo, estrés, actividad física, lesión cerebral, dieta). El BDNF se traduce como una pro-neurotrofina (pro-BDNF) que puede ser escindida en BDNF en el citoplasma por endoproteasas o en la matriz extracelular por plasmina o metaloproteinasas de matriz (MMP). Tanto el BDNF maduro como el pro-BDNF pueden ser secretados y unirse al receptor de neurotrofina p75 de baja afinidad (p75NTR), lo que provoca la activación de la cascada de apoptosis (Lima Giacobbo et al., 2019).

El BDNF juega un papel central en procesos neuroinflamatorios. Uno de los principales factores de activación inflamatoria es el factor nuclear-kappa B (NF- κ B), un factor de transcripción que induce la expresión de varios genes proinflamatorios (Marini et al., 2004). La unión del BDNF al receptor TrkB puede activar varias cascadas de señalización, incluyendo la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), y la vía de la fosfolipasa C γ (PLC- γ). Estas cascadas de señalización inducen un aumento del Ca²⁺, la activación de factores de transcripción como NF- κ B y la expresión de genes de novo como el propio gen BDNF. La unión de BDNF a TrkB activa también a la quinasa dependiente de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3K), Akt e I κ B α , lo que induce la transcripción del mRNA del BDNF (Figura 10). El BDNF estimula la señalización PLC- γ /PKC y la activación de las quinasas IKK α e IKK β . Estas quinasas fosforilan la proteína inhibidora de NF- κ B, I κ B α , dando lugar a la unión de ubiquitina y posterior degradación de I κ B α en las proteasomas, lo que induce la liberación del NF- κ B y su traslocación al núcleo donde se une al ADN e induce la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria (Mattson et al., 2006). Además, el BDNF puede modular la regulación génica activando otros factores de transcripción como CREB. La modulación génica por BDNF induce la supervivencia neuronal, el crecimiento, la LTP, la expresión de novo del BDNF y de genes relacionados con la respuesta inflamatoria.

Así, el papel del BDNF en la neuroinflamación está relacionado con su capacidad para inducir la transcripción génica. Sin embargo, los mecanismos de regulación aún no están claros. En EH se ha descrito que las ratas con hepatectomía parcial presentan una reducción en los niveles de BDNF en hipocampo y que el tratamiento con nicotina aumenta los niveles de BDNF, lo que mejora aprendizaje y la memoria espacial. También se ha detectado una disminución en los niveles de BDNF en el modelo de ligadura biliar lo que va a favorecer la aparición de alteraciones cognitivas (Dhanda et al., 2018).

9.2. Papel del BDNF en la modulación de la neurotransmisión

GABAérgica

Además, el BDNF también puede modular la neurotransmisión y la plasticidad sináptica. Puede modular tanto la neurotransmisión GABAérgica como la glutamatérgica. El BDNF produciría un aumento en la liberación de neurotransmisores a nivel presináptico. Concretamente, aumentaría la transmisión glutamatérgica y reduciría la neurotransmisión GABAérgica en el SNC (Zafra et al., 1991; Kim et al., 2017 a y b). El BDNF podría estar efectuando esta modulación de la neurotransmisión a través de TrkB o p75NTR.

En este trabajo nos centraremos en los efectos sobre la neurotransmisión GABAérgica. En el caso de la modulación de la neurotransmisión GABAérgica se ha demostrado que la activación de la PLC- γ por BDNF aumenta las concentraciones intracelulares de inositol trifosfato, IP3, que a su vez aumenta la concentración intracelular de Ca^{2+} (Yamada et al., 1991). El BDNF altera la función de los receptores GABA en hipocampo a través del aumento de Ca^{2+} , lo que lleva a una reducción de las IPSCs (corrientes postsinápticas inhibitorias) (Tanaka et al., 1997). La señalización BDNF-TrkB también afecta a la expresión y la funcionalidad de los transportadores GABA. Se ha demostrado que el BDNF aumenta tanto la expresión en membrana como el tiempo que permanece en membrana GAT-1, lo que da lugar a un aumento de la tasa de eliminación de GABA del medio extracelular y, por tanto, a una disminución de la concentración del GABA extracelular (Vaz et al., 2011). Estas alteraciones parecen estar causadas por la regulación al alza del GAT-1 neuronal. En las neuronas de hipocampo, el BDNF provoca una reducción de la inmunorreactividad de las subunidades $\alpha 2$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\gamma 2$ del receptor GABA_A en cultivos de neuronas, lo que es indicativo de una reducción de su expresión en membrana (Brünig et al., 2001). Además, el BDNF reduce las corrientes postsinápticas inhibitorias de GABA y, regula al alza la expresión de la subunidad $\alpha 4$ del receptor GABA_A mediante la estimulación de Egr-3 como consecuencia de la activación de la vía PKC (Roberts et al., 2006). Se ha demostrado que el BDNF regula selectivamente la transcripción de receptores GABA_A a través de la activación de la vía de la Janus quinasa (JAK) y el activador de la transcripción (STAT). El tratamiento con BDNF de neuronas hipocámpales estimula la fosforilación de STAT3, lo que induce un aumento de la expresión del represor temprano inducible de AMPc (ICER) y disminuye la transcripción de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A (Lund et al., 2008). El BDNF aumenta la expresión de la subunidad $\alpha 4$ del receptor GABA_A , pero disminuye la expresión en membrana de la subunidad $\alpha 1$ en hipocampo, lo que sugiere que el BDNF regula diferencialmente la expresión de los receptores GABA_A extrasinápticos y sinápticos (Roberts et al., 2006). Además, el BDNF también puede modular a los cotransportadores de Cl^- , que van a modular a su vez (como se explica en el apartado 6.1.1.) la neurotransmisión GABAérgica (Wardle y Poo, 2003). En algunas patologías

como en el dolor crónico, la señalización BDNF/TrkB da lugar a una disminución de la expresión de KCC2, lo que conduce a la hiperexcitabilidad (Kong et al., 2014; Tao et al., 2015). Por lo tanto, el BDNF podría alterar diversos mecanismos intracelulares que podrían modular la neurotransmisión GABAérgica. De este modo, el efecto del BDNF sobre la transmisión GABAérgica no se limita a los mecanismos de regulación directa, sino que también incluye mecanismos indirectos.

En la figura 11 se resumen los mecanismos por los que el aumento y/o la disminución de los niveles de BDNF pueden modular la neurotransmisión GABAérgica.

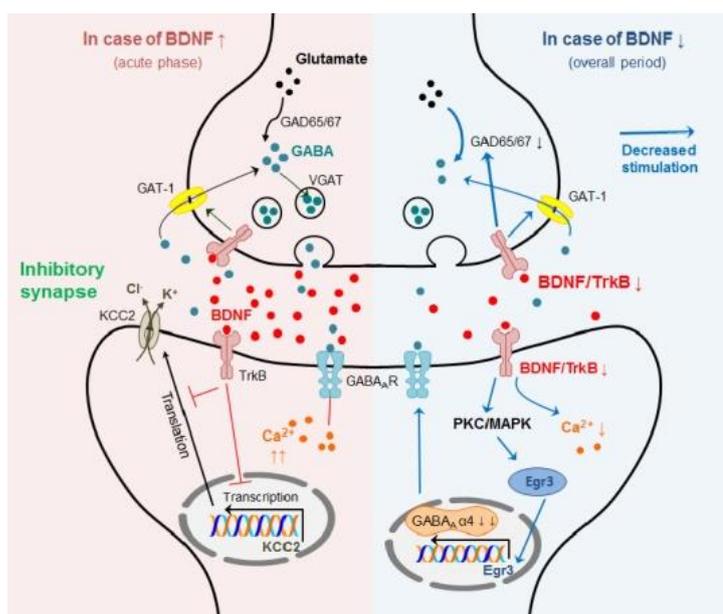


Figura 11. Mecanismos por los que el BDNF puede modular la neurotransmisión GABAérgica. En las sinapsis inhibitorias, tanto el aumento como la disminución de los niveles de BDNF contribuyen a la transmisión GABAérgica anormal a través de la alteración de la liberación de GABA y el transporte de GABA por GAT-1, así como por alteraciones en la regulación la transcripción de los receptores GABA_A y el co-transportador de Na⁺-K⁺-2Cl⁻, KCC2. El BDNF puede alterar el equilibrio entre la neurotransmisión excitatoria/inhibitoria (ver texto). *Imagen extraida de Kim et al., 2017 b.*

A continuación, se explicará el papel de la citocina CCL2 en la modulación de la neuroinflamación y la neurotransmisión.

10. PAPEL DEL CCL2 EN LA MODULACIÓN DE LA NEUROINFLAMACIÓN Y LA NEUROTRANSMISIÓN

Las citocinas son pequeñas proteínas de baja masa molecular (8-14 kDa) que median importantes efectos en la comunicación celular. Las citocinas pueden actuar de manera autocrina, paracrina o endocrina. Hay citocinas proinflamatorias y citocinas antiinflamatorias. Algunas citocinas/quimiocinas están implicadas no sólo en el inicio sino también en la persistencia del

dolor patológico al activar directamente las neuronas sensoriales nociceptivas. Las quimiocinas median sus efectos biológicos a través de la interacción con receptores acoplados a proteínas G que van a activar diferentes vías de señalización (Zhang y An, 2007).

En este caso nos centraremos en el CCL2 (C-C Motif Chemokine Ligand 2), un mediador de la inflamación y de la función inmunitaria. El CCL2 y su principal receptor (CCR2) se expresan en diferentes tipos celulares del SNC: astrocitos, células endoteliales, microglía y neuronas, lo que es indicativo de su importancia en el SNC. Está implicado en el desarrollo de respuestas inflamatorias e inmunitarias y, de hecho, muchas veces el CCL2 se considera un indicador de la progresión del proceso inflamatorio (Madrigal et al., 2014).

El CCL2 está implicado en multitud de enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas, como por ejemplo Alzheimer (Ishizuka et al. 1997) o isquemia cerebral (Kim et al. 1995). La unión del CCL2 a su receptor CCR2 lleva a la activación de la microglía. En el caso de la EH, los niveles de CCL2 se encuentran aumentados en ratones con EH, lo que produce la activación de la microglía y alteraciones cognitivas y motoras (McMillin et al., 2014). Sin embargo, un estudio anterior (Hinojosa et al., 2011) demostraba que el CCL2 no era capaz de inducir la activación microglial, ni por sí mismo ni en combinación con LPS, y tampoco podía inducir la muerte celular de las neuronas cocultivadas con microglía, lo que sugiere que pueden ser necesarios otros factores. Zhang et al., 2017 demostraron en ratas inyectadas con tioacetamina (otro modelo de EH) que los niveles elevados de CCL2 promueven la activación de la microglía y que el bloqueo del receptor CCR2 inhibe la activación microglial. También demostraron que el tratamiento con TNF- α in vitro induce la liberación de CCL2 por las neuronas y la expresión de los marcadores M1 proinflamatorios de la microglia (iNOS, COX2, IL-6 e IL-1 β).

Además, la activación de CCR2 también va a dar lugar a un aumento en la expresión de mediadores inflamatorios como el propio CCL2, la IL-1 β o TNF α . El receptor CCR2 está asociado a la proteína G de la clase $G_{\alpha i}$. La unión al segmento N-terminal de CCL2 a CCR2 desencadena la disociación del GDP y la sustitución de GDP por GTP intracelular, se disocian el complejo $G_{\alpha i}$ -GTP del receptor y el heterodímero $G\beta\gamma$. En consecuencia, $G_{\alpha i}$ inhibe la adenilato ciclasa y $G\beta\gamma$ activa la fosfolipasa C para producir diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). Estos acontecimientos conducen a la liberación de calcio intracelular y a la activación de cascadas de señalización que incluyen la PKC, la CaMKII, la PI3K, Akt y ERK, que modulan distintas vías de transducción produciendo diferentes efectos biológicos (Bose y Cho, 2013).

En la presente tesis doctoral se ha estudiado el papel del CCL2 y la activación de su receptor en la neuroinflamación en hipocampo en ratas con hiperamonemia crónica.

11. GMP cíclico (GMPc)

El guanosín monofosfato cíclico (GMP cíclico o GMPc) modula diferentes funciones fisiológicas, entre ellas, la vasodilatación, la fototransducción en la retina, la homeostasis del calcio y diversos aspectos de la neurotransmisión. El GMPc ejerce estos efectos mediante la modulación de canales iónicos, la activación de proteínas quinasas dependientes de GMPc y la modulación de fosfodiesterasas (PDEs). El GMPc es sintetizado por la guanilato-ciclase (GC), una enzima, que tiene una forma de membrana y otra soluble. Parte del GMPc sintetizado se libera al medio extracelular a través de transportadores. Las fosfodiesterasas (PDE) son las encargadas de degradar el GMPc (Domek-Lopacinska y Strosznajder, 2005). Los niveles de GMPc se regulan mediante la acción opuestas de la GC, que sintetiza el GMPc a partir del GTP, y de las PDEs, que convierten el GMPc en 5'-GMP, poniendo fin a su actividad. El óxido nítrico (NO) se une a la guanilato ciclase soluble y aumenta enormemente su actividad catalítica, incrementando así la conversión de GTP a GMPc. El otro mecanismo de síntesis del GMPc es por la guanilato ciclase particulada típicamente activada a través de la unión de péptidos natriuréticos (ANP, BNP o CNP) a los receptores natriuréticos con actividad guanilato ciclase particulada (pGC) (Francis et al., 2010). El GMPc intracelular induce sus efectos a través de diferentes vías:

1. La activación de serina/treonina quinasas dependientes de GMPc (PKG). Existen dos subclases: PKGI y PKGII, que difieren tanto en la distribución tisular como en los sitios de fosforilación.
2. El GMPc también activa la proteína quinasa A (PKA), aunque es un activador más débil que el AMPc.
3. La modulación de canales iónicos.
4. La modulación de fosfodiesterasas que, a su vez, van a modular los niveles de AMPc y GMPc

Además, el GMPc extracelular también ejerce efectos biológicos. El GMPc extracelular no es capaz de atravesar la membrana celular, por lo que tiene que existir alguna proteína o receptor de membrana modulada por el GMPc extracelular que induzca sus efectos intracelulares. No obstante, no se sabe con exactitud que diana estaría mediando los efectos del GMPc extracelular. Bukanova et al. (2014) demostraron que el GMPc extracelular modula el receptor de glicina, un receptor inhibitorio que consta de un canal de cloruro, capaz de generar potenciales inhibidores en las neuronas post-sinápticas. En las neuronas piramidales del hipocampo el GMPc extracelular acelera la desensitización de los receptores de glicina, lo que lleva a un retorno al potencial post-sináptico basal más rápido, reduciendo por tanto la activación del receptor de glicina. La

modulación del receptor de glicina en cerebelo por GMPc extracelular regula bifásicamente el aprendizaje en el laberinto en Y, modulando la vía NMDA-NO-GMPc (Cabrera-Pastor et al., 2016b). Otro candidato plausible a ser diana del GMPc extracelular es el antiporter de sodio/protones en astrocitos; este antiporter es inhibido por el GMPc en cultivos de astrocitos, lo que lleva a una acidificación del medio intracelular. El pH modula diferentes funciones en astrocitos, entre ellas la comunicación con las neuronas y la neuroinflamación (Touyz et al., 1997).

11.1. Papel del GMPc en la plasticidad sináptica

El GMPc desempeña un papel fundamental en la plasticidad sináptica y en la formación y recuperación de la memoria. Aunque ejerce funciones en diferentes áreas cerebrales, aquí nos centraremos sobre todo en el hipocampo, ya que es la región cerebral en la que se han llevado a cabo los estudios de la presente tesis doctoral. En las sinapsis hipocámpales, la aplicación de un tétano para inducir LTP conduce a la activación de los receptor NMDA postsinápticos, lo que aumenta el calcio intracelular, que al unirse a la cadmodulina activa la NO-sintasa y la síntesis de NO y su liberación en la hendidura sináptica. Este NO se transporta a la neurona presináptica, donde activa la guanilato ciclasa (GC) soluble, aumentando la producción de GMPc. Los niveles elevados de GMPc activan a la PKG y ésta activa a la fosfodiesterasa 5 (PDE5) para inducir la degradación de GMPc. Además, todo este proceso es necesario para la correcta inducción y mantenimiento de la LTP y cualquier alteración en el mismo implica alteraciones en la LTP (Monfort et al., 2002a, 2002b y 2005) (Figura 12).

Se piensa también que el GMPc podría actuar como un efector presináptico. Los tres principales mensajeros retrógrados que parecen jugar un papel fundamental en la LTP son: el ácido araquidónico, el óxido nítrico y el monóxido de carbono (Williams et al., 1989; Stevens y Wang, 1993; Zhuo et al., 1993). Estos dos últimos factores activan la guanilato ciclasa soluble que produce GMPc (Snider et al., 1984; Garthwaite et al., 1988; Verma et al., 1993). Los inhibidores de la guanilato ciclasa o de la proteína quinasa dependiente del GMPc bloquean la inducción de la LTP (Zhuo et al. 1994; Blitzer et al. 1995; Boulton et al. 1995; Monfort et al., 2002b) y los análogos permeables de GMPc pueden desencadenar la LTP si se aplican al mismo tiempo que la activación de las fibras presinápticas (Haley et al. 1992; Zhuo et al. 1994). En consonancia con esa idea, los análogos del GMPc pueden producir una potenciación duradera dependiente de actividad sináptica en presencia de AP5, un antagonista de los receptores de NMDA (Zhuo et al., 1994), o de L-NAME, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (Haley et al., 1992). De este modo, el GMPc parece estar jugando un papel fundamental en el proceso de LTP y en la facilitación de formación y recuperación de memorias (Monfort et al., 2002b; Kleppisch y Feil, 2009).

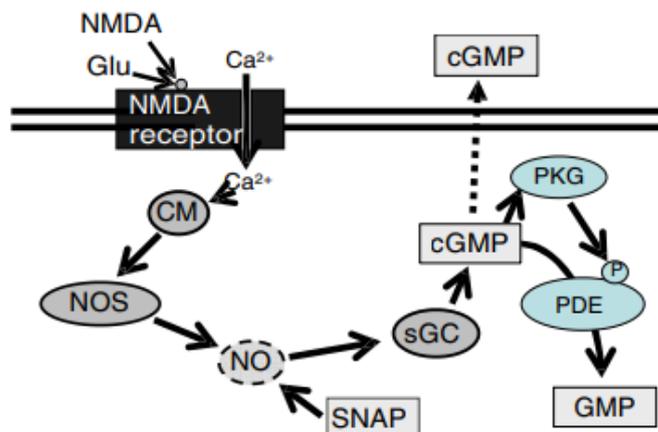


Figura 12. Vía glutamato-NO-GMPc-PKG-PDE5. La activación de los receptores NMDA conduce a un aumento del calcio en la neurona postsináptica. El calcio se une a la calmodulina (CM) y activa la óxido nítrico sintasa (NOS), aumentando el óxido nítrico (NO), que activa la guanilato ciclasa soluble (GC), aumentando así el GMPc. Este nucleótido activa la proteína quinasa dependiente del GMPc (PKG) que fosforila y activa la fosfodiesterasa 5 (PDE) que degrada el GMPc. (PDE). La activación de esta vía glutamato-óxido nítrico-GMPc-PKG-PDE5 es necesaria para la correcta inducción y mantenimiento de la LTP. *Imagen extraída de Montoliu et al., 2010.*

En modelos animales de EH la función de la vía receptor NMDA-NO-GMPc está disminuida, lo que va a producir alteraciones en los procesos de plasticidad sináptica y en el aprendizaje. Monfort et al., (2007), demostraron que en ratas con EH por PCS hay una alteración de la neurotransmisión glutamatérgica y de la potenciación a largo plazo en hipocampo, lo que contribuye a los déficits cognitivos. Las alteraciones en la amplitud y en el mantenimiento de la LTP en el hipocampo de estas ratas PCS se producen por la reducción de la activación de los receptores AMPA y NMDA; por alteraciones en la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA, y las subunidades GluN1, GluN2A y GluN2B de los receptores NMDA. Estos animales presentaban una reducción en los niveles de GMPc en hipocampo y una disminución de la capacidad de aprendizaje en la tarea del laberinto acuático de Morris. La LTP también está alterada en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. En ratas control la aplicación de una estimulación tetánica induce un rápido aumento de GMPc, seguido por una disminución sostenida de los niveles de GMPc por la activación PKG, que activa a la PDE5 que degrada el GMPc (Figura 12). En el caso de los cortes de hipocampo de ratas con hiperamonemia crónica el aumento del GMPc se produce normalmente cuando tiene lugar una estimulación tetánica, pero el resto del proceso, incluida la posterior degradación del GMPc, no se produce adecuadamente debido a una activación menor de la PKG y de la PDE5 (Monfort et al., 2010). De este modo, el GMPc-PKG juega un papel clave en el deterioro de la LTP en hiperamonemia y esta alteración contribuiría a las alteraciones de la función cognitiva tanto en modelos animales como pacientes con encefalopatía hepática.

Además, durante fases más tardías de la LTP, el GMPc también puede desencadenar la síntesis proteica *de novo*. Concretamente, la señalización GMPc/PKG provoca la liberación de calcio lo que va a llevar a la fosforilación de CREB, en paralelo a la fosforilación del CREB inducida por la señalización AMPc/PKA, y esto, a su vez, va a inducir la expresión de genes relacionados con la consolidación a largo plazo de la memoria y el aprendizaje mediante la síntesis de proteínas sinápticas y el consiguiente cambio estructural a nivel sináptico (Lu et al., 1999; Lu et al., 2002; Chen et al., 2003; Bon y Garthwaite, 2003; Rutten et al., 2007; Bollen et al., 2014).

11.2. Papel del GMPc en hiperamonemia y en la encefalopatía hepática.

Estudios previos del grupo demuestran que el GMPc juega un papel importante en la modulación de la neuroinflamación y la neurotransmisión en EH. Se han detectado alteraciones en los niveles de GMPc y GC en pacientes cirróticos, tanto en linfocitos como en el plasma. La activación de la GC también está alterada en cerebelo y corteza cerebral de pacientes con EH (Corbalan et al., 2002). Estas alteraciones pueden correlacionarse con el grado de EH analizado con test psicométricos. La función de la vía NMDA-NO-GMPc está alterada en modelos animales de hiperamonemia y EH y si se restaura mediante el tratamiento con antiinflamatorios o inhibidores de la degradación de GMPc las alteraciones en algunos tipos de memoria y aprendizaje se revierten, lo que demuestra que el GMPc juega un papel fundamental en las alteraciones en la memoria y el aprendizaje (Cabrera-Pastor et al., 2018). En ratas PCS el tratamiento con sildenafil, un inhibidor de la fosfodiesterasa 5, que degrada el GMPc, aumenta los niveles de GMPc y reduce los niveles de IL-1 β y la neuroinflamación en hipocampo y restaura el aprendizaje espacial (Hernández-Rabaza et al., 2015).

Cauli et al., (2009) demostraron que las ratas con hiperamonemia crónica presentan una mayor activación de la neurotransmisión GABAérgica, la cual va a interferir con la vía glutamato NO-GMPc en cerebelo (Fedele et al., 2000; Cauli et al., 2009) dando lugar a una reducción del GMPc extracelular. El tratamiento crónico con un antagonista del receptor GABA_A, la bicuculina, es capaz de restaurar la vía glutamato-NO-GMPc, aumentando los niveles extracelulares de GMPc en cerebelo y mejorando el aprendizaje en el laberinto en Y. Este estudio apoya que el aumento de la activación de los receptores GABA_A contribuye a la reducción de la vía del glutamato-NO-GMPc y de la concentración extracelular de GMPc, mientras que la inhibición del receptor GABA_A puede restaurar la función de esta vía y mejorar la capacidad de aprendizaje en hiperamonemia (Cauli et al., 2009).

Los niveles de GMPc extracelular están disminuidos en cerebelo e hipocampo de ratas con hiperamonemia y EH y el aumento del GMPc extracelular hasta niveles normales revierte algunas de las alteraciones en la neuroinflamación, cognitivas y motoras observadas en modelos animales

con hiperamonemia crónica (Cabrera-Pastor et al., 2016a). Erceg et al. (2005b) demostraron que, si se restauran los niveles de GMPc, mediante la administración intracerebral de zaprinast, un inhibidor de la fosfodiesterasa 5 (PDE5), en ratas hiperamonémicas o con EH por PCS se consigue normalizar el aprendizaje en el laberinto en Y. El mismo efecto se obtiene si se aumentan los niveles de GMPc extracelular mediante la administración continua intracerebral de GMPc con bombas miniosmóticas implantadas en el ventrículo cerebral. Un estudio posterior demostró que en ratas hiperamonémicas, el tratamiento con GMPc extracelular intracerebral es capaz de revertir las alteraciones en el aprendizaje espacial y que esto está asociado a la disminución de la neuroinflamación, de los niveles de TNF- α y a la reversión de la activación de microglía y astrocitos en hipocampo (Cabrera-Pastor et al., 2016a). Además, el aumento del GMPc extracelular en el cerebelo de ratas hiperamonémicas también normaliza los niveles de IL-1 β y la activación de la microglía, indicando que el GMPc extracelular es capaz de reducir la neuroinflamación (Cabrera-Pastor et al., 2018).

Además, la neuroinflamación, que produce un aumento de los niveles de IL-1 β , en hiperamonemia va a producir alteraciones en la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA y de GluN2B de los NMDA, como se ha comentado en el apartado 3.1. Taoro-González et al., 2018 demostraron que el tratamiento de rodajas de hipocampo ex vivo con GMPc extracelular normaliza la expresión en membrana de GluA2 y de GluA1. Estos efectos del GMPc extracelular se deben a una reducción de los niveles de IL-1 β en el hipocampo de las ratas hiperamonémicas, lo que va a reducir la sobreactivación del receptor de la IL-1 β y, en consecuencia, de Src y de las vías NR2B-p38-PKC ϵ -fosforilación de GluA2 en Ser880 y NR2B-CaMKII-fosforilación de GluA1 en Ser831. Siguiendo esta línea, también demostraron que tanto el bloqueo del receptor de la IL-1, como la inhibición de Src con PP2 ex vivo en el hipocampo de ratas hiperamonémicas, revierten el aumento de la expresión en membrana de GluN2B y GluA2 y la disminución de la expresión en membrana de GluA1 (Taoro-González et al., 2018). Esto indica que el aumento de GMPc extracelular revierte la alteración en la neuroinflamación y la neurotransmisión en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

En la presente tesis doctoral se estudiará el efecto del tratamiento con GMPc extracelular sobre la función de receptores AMPA, NMDA y GABA en el hipocampo de ratas hiperamonémicas mediante el uso del Multielectrode Array; así como los posibles mecanismos implicados en las alteraciones de la neurotransmisión GABAérgica.

12. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE RECEPTORES DE GLUTAMATO Y GABAA CON MATRIZ DE MÚLTIPLES ELECTRODOS

Las matrices de múltiples electrodos (Multielectrodos Array, MEA) han permitido en los últimos años el estudio de las dinámicas de redes neuronales, bien en cultivos celulares, en tejidos organotípicos o en rodajas ex vivo de diferentes regiones cerebrales. Estos dispositivos cuentan con un gran número de electrodos que pueden usarse bien como electrodos de estimulación o como electrodos de registro. Este sistema nos permite registrar extracelularmente la actividad eléctrica de redes neuronales durante períodos de tiempo variables. Una de las principales ventajas de esta técnica es que nos permite abordar estudios de la funcionalidad sináptica de miles de neuronas, a diferencia de los registros de una sola célula, como por ejemplo el Patch Clamp, lo que permite analizar mejor los mecanismos que subyacen a las funciones y disfunciones cerebrales a nivel de redes neuronales y conectividad. Además, podemos estudiar la contribución de determinados sistemas de neurotransmisión aislados a determinados circuitos neuronales. Por ejemplo, en nuestro caso hemos estudiado aisladamente potenciales evocados asociados a los receptores AMPA, NMDA y GABA_A, como se explicará en el apartado de Material y Métodos. Hemos llevado a cabo estudios de potenciales evocados en rodajas de hipocampo de ratas hiperamonémicas, con el fin de analizar las alteraciones en la funcionalidad de la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica que van a ser la causa de las alteraciones cognitivas y motoras observadas previamente en este modelo animal. También se ha estudiado el efecto del tratamiento con GMPc extracelular sobre la función de estos receptores con el fin de entender más en detalle cómo revierte algunas de las alteraciones en la neurotransmisión en hipocampo que explicarían porque el GMPc extracelular restaura la función cognitiva en hiperamonemia crónica.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Partiendo de las ideas comentadas en la introducción de que la hiperamonemia es un factor clave en el desarrollo de la EH y de que el modelo animal de hiperamonemia crónica presenta neuroinflamación, alteraciones en distintos sistemas de neurotransmisión y, como consecuencia, alteraciones cognitivas y motoras, planteamos las siguientes hipótesis:

1. La expresión en membrana de los receptores ionotrópicos de glutamato y GABA_A es crucial para regular su función y los procesos de plasticidad sináptica subyacentes a la memoria y el aprendizaje. La hiperamonemia crónica altera la expresión en membrana de subunidades de receptores de glutamato (AMPA y NMDA) y GABA_A e hipotetizamos que, por tanto, su función estará alterada.
2. En hipocampo de ratas hiperamonémicas el tratamiento con GMPc extracelular normaliza la expresión en membrana de algunas subunidades de receptores de glutamato. Hipotetizamos que, al normalizar su expresión en membrana, el GMPc extracelular debe restaurar la función de los receptores NMDA, AMPA y, probablemente, de los GABA_A en ratas hiperamonémicas.
3. A las alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica en hipocampo de ratas hiperamonémicas pueden contribuir diferentes factores, incluyendo alteraciones en la expresión en membrana de transportadores de GABA, en la concentración de GABA extracelular y en la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A y/o de cotransportadores de Cl⁻.
4. La IL-1 β juega un papel clave en la neuroinflamación y en la alteración de la neurotransmisión glutamatérgica y el aprendizaje no espacial en hipocampo de ratas hiperamonémicas. Hipotetizamos que el aumento de IL-1 β contribuye a alterar la neurotransmisión GABAérgica en hipocampo de ratas hiperamonémicas alterando la expresión en membrana de diferentes subunidades del receptor GABA_A y/o de transportadores de GABA y/o de Cl⁻.
5. La esfingosina-1-fosfato, a través de la activación de su receptor, S1PR2, induce neuroinflamación y promueve la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β en diferentes patologías. Hipotetizamos que en hipocampo de ratas hiperamonémicas un aumento de la activación del receptor S1PR2, contribuye a la neuroinflamación y en consecuencia a la alteración de la expresión en membrana de receptores GABA_A y/o de transportadores de GABA o de Cl⁻.
6. La hiperamonemia crónica induce neuroinflamación, con activación de microglía. La quimiocina CCL2, a través de la activación de su receptor CCR2 en microglía, es clave en

la activación de este tipo celular. Hipotetizamos que CCl₂ podría estar aumentada en ratas hiperamonémicas y que el antagonista de CCR2 (RS504393), disminuiría la activación de la microglía.

7. El BDNF a través de la activación de su receptor TrkB modula la neuroinflamación, la expresión en membrana de receptores GABA_A y la neurotransmisión GABAérgica. Hipotetizamos que el contenido de BDNF podría estar alterado en hiperamonemia y contribuir al desarrollo de la neuroinflamación y a las alteraciones en la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A y de transportadores de GABA o de Cl⁻ y que el antagonista del receptor TrkB (ANA-12) podría revertir algunas de estas alteraciones.

Tomando como base las hipótesis anteriores, los objetivos generales de esta tesis doctoral son los siguientes:

1. Estudiar en cortes frescos de hipocampo si la hiperamonemia crónica altera la función de los receptores AMPA, NMDA y GABA_A.
2. Evaluar el efecto de la adición de GMPc extracelular sobre la función de estos receptores en hipocampo de ratas control e hiperamonémicas.
3. Analizar si la hiperamonemia crónica altera la expresión en membrana de receptores y transportadores de GABA y/o de cotransportadores de cloruro en hipocampo. Analizar el papel de la neuroinflamación en estas alteraciones y los mecanismos implicados
4. Estudiar el efecto del GMPc extracelular sobre las alteraciones y los mecanismos moleculares analizados en el objetivo 3.

Con el fin de abordar estos objetivos principales, se han definido los siguientes objetivos concretos que se abordan utilizando rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas:

1. Estudiar si la hiperamonemia crónica altera los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs, excitatory postsynaptic potentials) producidos por la activación de receptores de glutamato (AMPA y NMDA) y/o los potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSPs, inhibitory postsynaptic potentials) producidos por la activación receptores GABA_A analizando los siguientes parámetros que definen la respuesta sináptica: amplitud, área sobre la curva, área bajo la curva, área de desensitización y facilitación sináptica.
2. Evaluar el efecto del GMPc extracelular sobre los EPSPs de los receptores AMPA, NMDA y los IPSPs de receptores GABA_A analizando los parámetros de respuesta sináptica indicados en el objetivo 1.
3. Analizar el efecto de la hiperamonemia sobre la expresión en membrana de transportadores de GABA y la concentración de GABA extracelular, la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A y/o de cotransportadores de Cl⁻ y los mecanismos moleculares por los que las altera.
4. Evaluar el papel de la IL-1 β en la inducción de neuroinflamación y en las alteraciones de la neurotransmisión GABAérgica en hipocampo de ratas hiperamonémicas e identificar los mecanismos implicados. Analizar el efecto del bloqueo del receptor de la IL-1 β con su antagonista endógeno IL-1Ra sobre:

- 4.1. La neuroinflamación: activación de microglía y astrocitos y niveles de IL-1 β , CCL2 y BDNF.
 - 4.2. La expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A (α 1, α 2, α 5, γ 2, β 3 y δ), de transportadores de GABA (GAT-1 y GAT-3) y de cotransportadores de cloruro (KCC2 y NKCC1).
5. Evaluar el papel del receptor S1PR2 en la inducción de neuroinflamación y en las alteraciones de la neurotransmisión GABAérgica en hipocampo de ratas hiperamonémicas e identificar los mecanismos implicados. Analizar los efectos del bloqueo del receptor S1PR2 ex vivo con su antagonista (JTE013) sobre:
 - 4.1. La neuroinflamación: activación de microglía y astrocitos y niveles de IL-1 β , CCL2 y BDNF.
 - 4.2. La expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A (α 1, α 2, α 5, γ 2, β 3 y δ), de transportadores de GABA (GAT-1 y GAT-3) y de cotransportadores de cloruro (KCC2 y NKCC1).
6. Evaluar el papel del BDNF en la inducción de neuroinflamación y en las alteraciones de la neurotransmisión GABAérgica en hipocampo de ratas hiperamonémicas e identificar los mecanismos implicados. Analizar los efectos del tratamiento ex vivo con ANA-12 (un antagonista del receptor TrkB) sobre:
 - 6.1. La neuroinflamación: activación de microglía y astrocitos y niveles de IL-1 β , CCL2 y BDNF.
 - 6.2. La expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A (α 1, α 2, α 5, γ 2), de transportadores de GABA (GAT-1 y GAT-3) y de cotransportadores de cloruro (KCC2 y NKCC1).
7. Evaluar el papel de CCL2 en la inducción de neuroinflamación en hipocampo de ratas hiperamonémicas e identificar los mecanismos implicados. Analizar el efecto del tratamiento ex vivo con RS504393 (antagonista del receptor CCR2) sobre la activación de microglía y astrocitos.
8. Estudiar si el GMPc extracelular revierte las alteraciones inducidas por la hiperamonemia en la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A (α 1, α 2, α 5, γ 2, β 3 y δ), de transportadores de GABA (GAT-1 y GAT-3) y de cotransportadores de cloruro (KCC2 y NKCC1) y analizar los mecanismos implicados.



MATERIAL Y MÉTODOS

1. MODELO ANIMAL DE HIPERAMONEMIA SIN DAÑO HEPÁTICO

En el presente trabajo se ha utilizado el modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático, que fue desarrollado por nuestro laboratorio (Taoro-Gonzalez et al., 2018). Concretamente se han empleado ratas macho (*Rattus norvegicus*) de la cepa wistar, a las que se les induce una condición de hiperamonemia mediante la administración de dieta rica en amonio (25% de acetato amónico) durante 4-5 semanas. Mientras, a los animales control se les administra piensos convencionales. En el caso de las ratas hiperamonémicas se consiguen unos aumentos de los niveles de amonio respecto a animales control en cerebro, hígado y músculo del 41, 37 y 50%, respectivamente. Mientras, los niveles en sangre se duplican y tanto los niveles de urea en sangre como la eliminación de urea son el doble que en ratas control.

Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética y Bienestar en Experimentación Animal, Centro de Investigación Príncipe Felipe-Conselleria de Agricultura, Generalitat Valenciana, y se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva del Consejo de Comunidades Europeas (86/609/EEC).

2. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE RODAJAS DE HIPOCAMPO: EXPERIMENTOS EX VIVO

Parte de los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral han sido adquiridos mediante experimentos ex vivo en rodajas frescas de hipocampo. La razón por la que se ha usado este modelo es que, pese a no trabajar con modelos in vivo y, por tanto, tener sus limitaciones, se asemeja mucho más a las condiciones reales que otros modelos como por ejemplo cultivos celulares. Con este modelo mantenemos la estructura de tejido, las interacciones entre diferentes tipos celulares y, de esta manera, se logran mantener los circuitos neuronales.

Se decapitaron ratas control y ratas hiperamonémicas, tras 4 semanas de dieta rica en amonio. A continuación, se extrajo el cerebro rápidamente y se colocó en placas Petri colocadas en hielo. Se separan ambos hemisferios cerebrales y se extrajeron ambos hipocampos con la ayuda de espátulas. Una vez obtenidos ambos hipocampos se sumergieron en tampón Krebs enfriado (en mM: NaCl 119, KCl 2.5, KH₂PO₄ 1, NaHCO₃ 26.2, CaCl₂ 2.5 y glucosa 11) y se burbujearon con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂), con el fin de mantener el tejido oxigenado y fresco y así disminuir los procesos necróticos. Para la obtención de las rodajas de hipocampo de 400µm se utilizó un chopper manual. Una vez obtenidas las rodajas se colocaron en pocillos de un incubador termostataado (Figura 13). En primer lugar, se estabilizan, para que vuelvan al metabolismo

característico de condiciones fisiológicas. Para ello, se perfunden durante 20-30 minutos con Krebs oxigenado a 37°C. Tras la estabilización, se perfunde con el tratamiento correspondiente. Estos tratamientos variaron en función de los mecanismos moleculares objeto de estudio y todos ellos fueron disueltos en Krebs. Los tratamientos utilizados fueron los siguientes: el inhibidor del receptor de la IL-1 β (IL-1Ra) a una concentración de 100 ng/ml (R&D Systems cat# 1545-RA-025, Minneapolis, USA); el inhibidor de Src (PP2) a una concentración de 10 μ M (Sigma cat# P0042, Darmstadt, Germany); GMPc a 40 nM (Sigma cat# G6129, Darmstadt, Germany); el inhibidor del receptor de la esfingosina-1-fosfato (JTE013) a una concentración de 20 μ M (Tocris/Bio-Techne cat#2392, Minneapolis, MN); el inhibidor de fosfoinositido 3-quinasa (PI3K) a 2 μ M (Sigma cat#12-338, Darmstadt, Germany); el inhibidor del receptor TrkB 50 μ M (ANA-12) a (Tocris/Bio-Techne cat#4781, Minneapolis, MN); y el inhibidor del receptor CCR2 (RS504393) a 50 μ M (Tocris/Bio-Techne cat#2517, Minneapolis, MN). Todos estos tratamientos fueron perfundidos durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se extrajeron las rodajas del incubador y se procesaron debidamente bien para inmunohistoquímica, inmunoblot o HPLC.

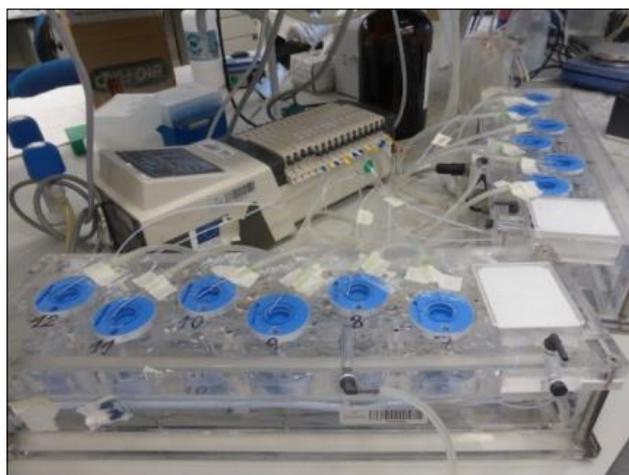


Figura 13. Incubador. Las rodajas de hipocampo se colocaron en los pocillos del incubador para perfundirlas con los diferentes tratamientos. Estos pocillos están conectados a bombas de perfusión y a un sistema de vacío, lo que permite que se vaya renovando el líquido del pocillo bien con Krebs o con Krebs y tratamientos, los cuales están continuamente oxigenados con carbógeno. Además, consta de controladores de temperatura que permite mantener constante la temperatura de los pocillos, en este caso a 37°C.

2.1. Procesamiento de rodajas de hipocampo para western blot

Las muestras destinadas para western blot se procesaron de manera diferente en función del estudio a realizar: analizar el contenido total de proteínas y su fosforilación o la expresión en membrana de receptores y transportadores.

2.1.1. Análisis del contenido de proteína y fosforilación de residuos

De las rodajas obtenidas, algunas fueron seleccionadas para realizar estudios bien del contenido total de proteínas en la muestra o bien para estudios de determinados residuos de fosforilación en proteínas concretas. En este caso, las rodajas de hipocampo, una vez han recibido el correspondiente tratamiento en el incubador, se transfieren rápidamente a tubos que contenían 200 μ l de tampón de fosforilación (Tris-HCl 66mM pH 7.4, SDS 1%, EGTA 1 mM, glicerol 10%, leupeptina 0.2 mg/ml, NaF 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM), mantenidos siempre en hielo, y, finalmente, se sonicaron durante 20 segundos. Una vez hecho esto, para medir la concentración de proteína en cada una de las muestras, se tomó una alícuota de 3 μ l, siguiendo los pasos que se explican más abajo (apartado 2.1.3). Finalmente, las muestras se almacenaron a -20°C para su posterior análisis mediante inmunoblot. En el caso de los estudios de fosforilación se procuró siempre llevar a cabo el western dentro de la semana siguiente para preservar en la medida de lo posible al máximo el estado de fosforilación de las proteínas.

2.1.2. Análisis de la expresión en membrana de proteínas

En el caso de las muestras destinadas a estudios de expresión en membrana de diferentes proteínas, cada muestra siempre se usó por duplicado. Una de las muestras se trató con BS3 (Pierce cat# 21580, Rockford, IL, USA), mientras que la otra no. El BS3 es un *cross-linker* impermeable a la membrana celular que se une a los residuos de lisina extracelulares de las proteínas. Una de las réplicas de cada muestra, tras su correspondiente tratamiento en el incubador, se transfirió a un tubo al que previamente se habían añadido 200 μ l de Krebs (-) y la otra réplica a otro tubo que contenía 200 μ l de Krebs con BS3 2 mM (+). Ambos tipos de muestra se incubaron en agitación durante 30 minutos a 4°C . Después, para parar la reacción del BS3, es decir, neutralizar el BS3 no unido a las proteínas de membrana, se añadieron 200 μ l de glicina 100 mM disuelto en Krebs y se incubó durante 10 minutos también a 4°C en agitación. A continuación, las muestras se transfirieron a tubos con 200 μ l con tampón de fosforilación y se sonicaron durante 20-30 segundos. Se tomó una alícuota de 3 μ l para medir la concentración de proteína (explicado en el apartado 2.1.4.) y, una vez hecho esto, las muestras se almacenaron a -20°C para utilizarlas posteriormente para su análisis posterior por inmunoblot.

2.1.3. Determinación de la concentración de proteína de muestras para inmunoblot.

Tanto en el caso de las muestras destinadas a estudios de contenido total y fosforilación de proteínas como aquellas usadas para el estudio de la expresión en membrana de proteínas, se determinó su concentración proteica total por medio de método colorimétrico del ácido

bicinconírico (BCA Protein Assay Kit cat# 23225, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en una placa de 96 pocillos. Se hizo una curva de calibrado con concentraciones de proteínas conocidas de albúmina de suero bovino (BSA), con puntos dobles, y se cargaron las muestras por duplicado. La placa se incubó a temperatura ambiente durante una hora y se midió la absorbancia a 570 nm con un espectrofotómetro. Se relativizaron los valores de absorbancia de las muestras respecto a los de la curva patrón, con concentraciones de proteína conocidas, con el fin de cargar la misma cantidad de proteína total de todas en las muestras en los western blot y, así, poder comparar el contenido de la proteína de interés de cada una de las muestras.

2.2. Procesamiento de rodajas de hipocampo para la cuantificación de GABA

Los cortes de hipocampo destinados para el análisis de la concentración de GABA se homogenizaron en 100 µl de H₂O mediante sonicación y se añadieron 10 µl de Ácido trifluoroacético (TFA) a 50 µl de homogenado en campana, para precipitar las proteínas. Tras mezclar las muestras mediante un vórtex se centrifugó a 4°C, durante 15 min a 20.000 g. Se recogió el sobrenadante y se transfirió a otro tubo para medir la concentración de GABA posteriormente por HPLC-MS. Mientras, al pellet se añadieron 100 µl de NaOH para medir la concentración de proteína por el método colorimétrico del BCA, como se explica en el apartado 2.1.3.

2.3. Procesamiento de rodajas de hipocampo para inmunohistoquímica.

En el caso de los cortes de hipocampo destinados para inmunohistoquímica, tras el tratamiento correspondiente, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PB 0.1 M durante 24 horas y se guardaron en una solución de PB 0.1 M con azida sódica al 0.01% a 4°C. Después se procesaron las muestras mediante un procesador automático de tejidos Leica HistoCore PEARL (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania), en el que se somete al tejido a un proceso de deshidratación el cual consta de los siguientes pasos: 1 h con etanol al 70%, 1 h con etanol al 96%, 1h con etanol al 100%, 1 h con etanol 100%, 1 h con etanol 100%, 1 h con xileno, 1 h con xileno, 1 horas con xileno, 1 h con parafina a 62 °C, 2 h con parafina. A continuación, las muestras se incluyeron en bloques de parafina y se realizaron cortes de 5 µm de grosor con un micrótopo.

3. INMUNOBLOT

El análisis del contenido de proteínas de las muestras procedentes de los experimentos ex vivo se llevó a cabo por western blot. En el caso de las muestras destinadas al estudio de expresión en membrana de determinadas proteínas, muestras tratadas con o sin el crosslinker BS3, se cargaron

en geles de mayor tamaño, ya que el número de muestras es mayor, al tener cada una de las muestras por duplicado (con o sin BS3). La única diferencia entre los westerns blots de mayor (20x18 cm) y menor tamaño (10x8 cm) son los tiempos de determinados pasos del protocolo, las cantidades de reactivos y el número de muestras que nos permiten cargar.

El primer paso del protocolo consiste en la preparación de los geles de poliacrilamida, los cuales nos permiten separar las proteínas según su masa molecular. Estos geles constan de dos fases, las cuales se diferencian por la concentración de acrilamida: el *stacking* o parte superior [25% Tris 0.5 M + 0.4% SDS con pH=6.8 ajustado con HCl, 13% mezcla Acrilamida/Bisacrilamida (Panreac), 1% APS (Merck-Millipore) y 0.2% TEMED (Sigma)]; y el *separating* o parte inferior [25% Tris 1.5M + 0.4% SDS con pH=8.8 ajustado con HCl, 8-15% mezcla Acrilamida/Bisacrilamida, 0.33% APS y 0.07% TEMED). El *stacking* nos permite la concentración de las muestras en una banda estrecha antes de llegar al *separating* que va a permitir la separación de las proteínas según su masa molecular. Puesto que en el *separating* la concentración de acrilamida va a determinar la porosidad del gel, el porcentaje de acrilamida del *separating* se determinó según la masa molecular de las proteínas a analizar. Geles con un mayor porcentaje de acrilamida nos permiten analizar proteínas de menor masa molecular mientras que los geles con menos porcentaje de acrilamida nos permiten estudiar proteínas con mayor masa molecular.

En cuanto a la preparación de las muestras, se tomaron alícuotas de 50-100 µg de las muestras (el volumen de cada muestra se determinó en función de la concentración de la misma obtenida por el método colorimétrico del BCA), las cuales se diluyeron en tampón de carga (65% Tris-HCl 0.5 M a pH=6.8, 21% glicerol, 4% dodecilsulfato sódico (SDS), 10% 2-mercaptoetanol, 0.02% bromofenol) en relación 1:1 y se hirvieron durante 5 minutos a 100 °C en un termoblock. Una vez cargadas las muestras los geles se introdujeron en cubetas con tampón running (Tris Base 25 mM, SDS 3.5 mM, Glicina 0.2 M) y se realizó la electroforesis a 25 mA por gel en el caso de los pequeños durante 1 hora y media aproximadamente y a 10 mA por gel durante 15-20 horas en el caso de los geles de mayor tamaño.

El siguiente paso del protocolo es la transferencia de las proteínas, ya separadas en el gel, a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Para ello se coloca el gel y la membrana en los casets de la cubeta de transferencia, previamente llenada con tampón de transferencia (Tris Base 25 mM, Glicina 0.19 M, 20% metanol), y se aplica una corriente de 250 mA durante 2 h en el caso de los geles pequeños y durante 5 h, también a 250 mA, en el caso de geles grandes. Una vez realizada la transferencia de las proteínas del gel a la membrana, se prosiguió con el bloqueo de las membranas, para impedir que durante la incubación del anticuerpo primario se generen uniones inespecíficas. En el caso de las membranas pequeñas para el bloqueo se utilizó BSA al

5% en TBS-Tween (NaCl 150 mM, Tris Base 50 mM, 0.1%, Tween-20 pH 7.5), mientras que en el caso de las membranas grandes se usó leche en polvo al 5% en TBS-Tween. En ambos casos el bloqueo se realizó durante 45 minutos. Tras el bloqueo, las membranas se lavaron cinco veces con TBS-Tween durante 10 min.

El tercer paso del protocolo es la incubación con el anticuerpo primario. Se usó uno u otro en función de la proteína que queríamos analizar (Tabla 2). En todos los casos el anticuerpo primario se diluyó en BSA al 5% en TBS-Tween y se incubaron las membranas durante toda una noche a 4°C.

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para inmunoblot.

Anticuerpo primario	Concentración	Casa comercial y referencia
NKCC1	1:500	IOWA UNIV (t4-s)
KCC2	1:500	MILLIPORE (07-432)
GAT-1	1:500	ABCAM (AB426)
GAT-3	1:500	ABCAM (AB431)
GABA α 1	1:1000	ABCAM (ab8341-50)
GABA α 2	1:1000	BIOSS (BS-12061R)
GABA α 5	1:1000	GENETEX (GTX31004)
GABA γ 2	1:500	ABCAM (AB87328)
GABA β 3	1:500	ABCAM (AB98968)
GABA δ	1:500	PHOSPHOSOLUTION (868-GDN)
pSer408/409-GABA β 3	1:500	PHOSPHO SOLUTIONS (P1551-940)
Gephyrin	1:1000	Abcam (ab181382)
GAD65	1:1000	SIGMA (G-1166)
GAD67	1:1000	Abcam (ab26116)
BDNF	1:1000	INVITROGEN (OSB00017W)
CCl2	1:1000	PROTEINTECH (66272-1-Ig)
IL-1 β	1:500	R&D SYSTEMS (AF-501-NA)
pSer133-CREB	1:1000	UPSTATE (06-519)
pSer473-AKT	1:1000	ABCAM (ab66138)
p-P38	1:1000	CELL SIGNALLING (9211)
pTyr418-Src	1:1000	Abcam (ab40660)
Actina	1:4000	Abcam (ab6276-100)
GAPDH	1:4000	MILLIPORE MAB374

Tras la incubación con el anticuerpo primario, se lavaron las membranas cinco veces con TBS-Tween durante 10 min para proseguir con la incubación de las membranas con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario está conjugado con la fosfatasa alcalina (enzima de revelado). Los anticuerpos secundarios utilizados se detallan en la Tabla 3. Una vez transcurrida la hora de incubación con el anticuerpo secundario las membranas se lavaron otras 4 veces durante 10 min con TBS-Tween y se realizó un quinto y último lavado de 10 minutos con tampón sustrato (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris Base 100 mM pH=9.5), que es el tampón que se utiliza para el revelado. Por último, se revelaron las membranas utilizando el método colorimétrico para la enzima fosfatasa alcalina: 0.66% de NBT (4-Nitro blue tetrazolium chloride) y 0.34% de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine) en tampón sustrato. El tiempo de revelado varió en función de las proteínas. Sin embargo, en todos los casos se detuvo la reacción antes de la saturación, transfiriendo las membranas a agua destilada y finalmente a papel de filtro para su secado.

Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados para inmunoblot.

Anticuerpo secundario	Concentración	Casa comercial y referencia
Anti-IgG de conejo-fosfatasa alcalina	1:4000	Sigma (A8025)
Anti-IgG de ratón-fosfatasa alcalina	1:4000	Sigma (A3562)
Anti-IgG de cabra-fosfatasa alcalina	1:4000	Sigma (A7650)

Una vez secas, las membranas se escanearon utilizando el escáner Hewlett Packard Scanjet 5300C. Para la cuantificación posterior de las bandas se utilizó el programa AlphaImager 2200 (AlphaEaseFC 2200 for Windows, Cambridge, UK).

En el caso de las membranas pequeñas, en el caso de los análisis de contenido total y fosforilación de proteínas, se utilizó la actina como control de carga, excepto en aquellas proteínas que tienen el mismo peso molecular que la actina. En estos casos se usó GAPDH. En ambos casos se relativizó la cantidad de proteína respecto a la actina. Los valores de cuantificación se expresaron como porcentaje respecto al grupo control basal.

En el caso de las membranas grandes, estudios de expresión en membrana de proteínas, como se explicó anteriormente, se corrieron siempre las muestras por duplicado, una sin BS3 (-) y otra con BS3 (+). De este modo, para cada una de las muestras se obtuvo una banda (-) sin BS3, que representa el contenido total de la proteína, y otra una banda (+) con BS3, que representa exclusivamente el contenido citosólico de la proteína, el BS3 se une a las proteínas de membrana formando agregados de alto peso molecular que permanecen en el pocillo, lo que impide su

migración a lo largo del gel de electroforesis. Por ello, al cuantificar se restó la intensidad de la banda citosólica (+), tratada con BS3, a la de la banda de contenido total de proteína (-), sin BS3, y se estimó así la expresión en membrana de proteínas de interés para cada muestra. Como en el caso de las membranas pequeñas, los valores se expresaron siempre como porcentaje respecto al control basal.

4. INMUNOHISTOQUÍMICA

A partir de los bloques en los que se incluyeron las rodajas de hipocampo, se obtuvieron cortes de 5 μm con un micrótomo. Una vez obtenidos los cortes el primer paso es someterlos a un proceso de desparafinación, incubándolos en una estufa a 60°C durante 1 hora. Una vez desparafinados se sometieron a un proceso de hidratación con el teñidor Leica ST5010 Autostainer XL (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania), utilizando un protocolo que consta de los siguientes pasos: 2 lavados de 10 min con xileno, 1 lavado de 5 min con etanol al 100%, 2 lavados de 5 minutos con etanol al 96 % y un lavado de 5 min con etanol al 70%. Una vez hecho esto se prosiguió con la recuperación antigénica, con el fin de desenmascarar los epítomos que serán reconocidos por el anticuerpo primario ya que, previamente, durante la inclusión en parafina se han formado enlaces covalentes con los antígenos, lo que dificulta la unión del anticuerpo primario. Para ello, se incuban los cortes sumergidos en una solución High (citrato sódico 10mM, Tween 20 al 0.05%, pH=6.0) o Low (Tris base 10mM, EDTA 1 mM, Tween 20 al 0.05%, pH=9.0) a 90-95°C durante 30 minutos, el uso de una solución u otro varía en función del antígeno de interés.

Tras la recuperación antigénica, los cortes se lavaron 3 veces en PB 0.1 M durante 5 minutos, después se procedió al bloqueo de la actividad de las peroxidasas endógenas por medio de la incubación con H₂O₂ al 3% durante 15 minutos. A continuación, se bloqueó con el suero de la especie donde estaba producido el secundario durante 1 hora, con el fin de eliminar uniones inespecíficas.

El siguiente paso fue incubar los cortes con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PB 0.1 M para eliminar el anticuerpo primario sobrante, que no se ha adherido a los antígenos de interés, se volvió a bloquear durante 1 hora con el suero de la especie donde está producido el secundario y a continuación se realiza la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado durante 1 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrida la hora de incubación con el anticuerpo secundario se realizaron 3 lavados con PTA (tampón fosfato salino (PBS) 0.1 M con BSA al 0.1% y 0.1 % Triton-X100) para permeabilizarlos. Después, se llevó a cabo una incubación durante 45 minutos con el complejo ABC VECTASTAIN® ABC HRP (Peroxidase, Standard) (PK-4000, Vector Laboratories) a

temperatura ambiente. El siguiente paso que se realizó fue el revelado. Una vez realizados los lavados, los cortes se incubaron con el kit DAB Substrate Kit (ab64238, Abcam), ya que los anticuerpos secundarios que se utilizaron estaban conjugados a la peroxidasa de rábano (HRP), que reacciona al añadir el sustrato colorimétrico diaminobenzidina (DAB) en presencia de H₂O₂, dando lugar a un precipitado marrón. Después, se procedió a la tinción de los núcleos celulares con hematoxilina de Mayer's (DAKO), la cual se incubó durante aproximadamente 5 min. Tras la tinción con hematoxilina los cortes se transfirieron a una cubeta con agua. Finalmente, se procedió a la deshidratación con el teñidor Leica ST5010 Autostainer XL (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania) según el siguiente protocolo: 1 lavado de 30 s con etanol al 96 %, 3 lavados de 1 minuto con etanol al 100 % y 1 lavado de 2 minutos con xileno. Una vez deshidratadas las muestras, los porta objetos se montaron con el montador automático CV5030 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania). Una vez montados los porta objetos se dejaron secar durante toda la noche, para ser escaneados posteriormente con el escáner Aperio Versa (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania). Una vez obtenidos los escaneos se tomaron fotos a 40X con el software ImageScope64 para su posterior cuantificación.

Los anticuerpos primarios y secundarios, su dilución y la especie de producción de los mismos se detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Anticuerpos primarios, secundarios y método de recuperación antigénica empleados para inmunohistoquímica

Recuperación antigénica	Anticuerpo	Concentración. Casa comercial	Anticuerpo secundario	Especie secundario	Concentración. Casa comercial
HIGH	Iba1	1:300 Wako (019-19741)	Anti-IgG de conejo-HRP	Cabra	1:400 Vector Laboratories (BA-1000)
HIGH	GFAP	1:400 Sigma (G-3893)	Anti-IgG de ratón-HRP	Cabra	1:400 Vector Laboratories (BA-9200)

4.1. Análisis de la activación de microglía. Tinción de Iba1.

Para analizar la activación de la microglía, se cuantificó el área y el perímetro de las células marcadas con el anticuerpo contra Iba1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), una proteína que en el cerebro únicamente se expresa en la microglía. Como se comentó en la introducción, la microglía activada se caracteriza por presentar una forma ameboide, a diferencia de la microglía en estado de reposo que presenta una morfología más ramificada. El proceso de activación de la microglía lleva a una disminución tanto del área como del perímetro de la

microglía y, por tanto, a la disminución tanto del área como en el perímetro de la microglía se considera una medida de su activación.

De cada animal se tomaron un total de 10 fotos a 40 aumentos con el software ImageScope x64. El área/perímetro de las células marcadas con Iba1 se cuantificó mediante el software IpWin 32. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 8.0.1. a partir del promedio del área y el perímetro de la microglía de cada grupo experimental. Los datos se relativizaron respecto al control basal.

4.2. Análisis de la activación de astrocitos. Tinción de GFAP.

La activación de astrocitos se analizó por medio de la tinción de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que es una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular, en particular de células gliales como los astrocitos, por lo que se utiliza comúnmente como un marcador de astrocitos. El proceso de activación astrocitaria se caracteriza por un aumento del número de procesos, lo que da lugar a la morfología estelar característica de los astrocitos activados, lo que produce un aumento en el área y el perímetro de este tipo celular.

De cada animal se tomaron 10 fotos a 40 aumentos con el software ImageScope x64. Las imágenes fueron analizadas mediante el software ImageJ: se convirtieron a 8 bits y se aplicó la función Autolocal Threshold para determinar el porcentaje de área teñida con GFAP de cada imagen. Las imágenes se revisaron de forma manual para asegurar que el programa detectaba correctamente la marca de GFAP. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 8.0.1. con los datos obtenidos del porcentaje de área teñida. Todos los valores se relativizaron respecto al control basal.

5. CONCENTRACIÓN DE GABA POR HPLC-MS

La concentración de GABA y glutamato se midió por cromatografía líquida-espectrometría de masas (HPLC-MS). El sistema consta de un HPLC (High Performance Liquid Chromatography) de EXION con una columna Luna Omega Polar C18 (OOD-4760-AN) 100*2.1 mm 3 μ m (100 A) de Phenomenex. La fase móvil consiste en un gradiente de dos fases: 0.1% de ácido fórmico en agua (A) y 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B), como a continuación se indica: 20% A 0–1.5 min, 80% A a 1.7 min, 80% A 3 min; 20% A 3.1 min y 20% A 4.5 min, con un flujo de 0,4 ml/min; la temperatura de la columna se mantiene a 30 °C y el volumen de inyección es de 40 μ L. El HPLC se acopla a un sistema de detección por espectrometría de masas que consiste en un triple

cuadrupolo QTRAP 4500 (AB Sciex, Ontario, Canadá) equipado con una fuente de iones de ionización por electropulverización (ESI) en modo ionización positiva. Las condiciones fueron: potencial de entrada 10, gas cortina 20, potencial de desagrupación 46 V, Energía de colisión 15 eV, GAS1 40 y GAS2 30, 600 °C y 4500 V en modo monitorización de reacción múltiple (MRM) con la siguiente transición para la cuantificación de GABA $104\ m/z > 87\ m/z$ (potencial de desagrupación 46 V, energía de colisión 15 eV).

Una curva estándar de GABA (μM): 500, 100, 50, 10, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.01 preparada como las muestras, con TFA, se utilizó para calcular la concentración de estos aminoácidos en las muestras utilizando el software Analyst, versión 1.6.3. de SCIEX.

Una vez obtenida la concentración de GABA se calculó la relación de la concentración de GABA entre la concentración de proteína. Los valores obtenidos se relativizaron respecto al grupo control basal y se expresaron siempre en porcentaje. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 8.0.1.

6. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN EXTRACELULAR DE GABA POR MICRODIÁLISIS IN VIVO EN HIPOCAMPO

La técnica de microdiálisis se basa en la implantación de una sonda cuyo extremo consta de una membrana de diálisis semipermeable, a través de la cual se produce intercambio de sustancias, entre el líquido extracelular y la membrana, la cual contiene líquido cefalorraquídeo artificial como medio de perfusión. De esta manera, los neurotransmisores y otros metabolitos difunden hacia el interior de la membrana a favor de gradiente de concentración y se recoge a través del fluido de perfusión para su posterior análisis.

Ratas control e hiperamonémicas se anestesiaron con isoflurano (5% en 100% de oxígeno para inducir la anestesia y 2% para mantenerla). Se colocó la cabeza del animal en un sistema de estereotaxia para implantar la guía de microdiálisis (MD- 2251, Omega-ring Intracerebral Guide Cannula and Stylet, 6/pkg. BASi®) en el hipocampo. A continuación, se realizó una incisión sagital de aproximadamente 2,5 cm para dejar la superficie del cráneo al descubierto y con ayuda de una espátula, suavemente, se raspó para quitar el tejido conectivo, lo que permite una buena adhesión del cemento dental a la superficie del cráneo. A continuación, se marcaron las coordenadas de introducción de la guía en el hipocampo: -2,8 mm anteroposterior, 1,7 mm medio lateral y 3 mm dorsoventral respecto al bregma (Paxinos y Watson, 2007). Se realizaron dos

perforaciones (1 mm de diámetro) para insertar dos tornillos de sujeción al cráneo y un agujero (1 mm de diámetro) que permitió el acceso vertical de la guía al cráneo. La guía se sujetó al cráneo mediante los tornillos y cemento dental. Después se suturó la piel y se devolvieron las ratas individualmente a sus jaulas, donde permanecieron 1 semana, hasta el momento de realizar la microdialísis cerebral.

Se perfundió continuamente a través de la sonda líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) a un flujo de 3 μ L/minuto mediante una bomba de microperfusión (BAS, Analytical Systems, Inc, USA). La composición del LCA era NaCl 145 mM, KCl 3.0 mM, CaCl₂ 2.26 mM, tamponado a pH 7.4 con tampón fosfato 2 mM y se filtró con filtros Millipore de 0.45 μ m de diámetro de poro (Hermenegildo et al., 1998).

Una vez transcurridas 2 horas, las muestras se recogieron cada 30 minutos, conteniendo cada una 90 μ L de dializado. Las muestras se conservaron en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta el momento de ser analizadas por HPLC.

La separación cromatográfica de GABA se realizó en un sistema de HPLC con una columna de sílice HILIC de Waters Atlantis (3,0 micrómetros id, 100 mm x 2,1 mm). La fase móvil estaba compuesta de ácido fórmico al 0,1% en agua (A) y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo (B) usando el siguiente programa de gradiente: 90% A 0-1.5 min, 15% A a 1.7 min, 15% A 3 min; 90% A 3.1 min y 90% A 4.5 min. El caudal fue de 0,4 ml/min; la temperatura de la columna era 30 °C y el volumen de inyección de 30 μ L. Un QTRAP 4500 de ABSCIEX® equipado con una fuente de iones ESI fue operado en modo de iones positivos. Se utilizaron las siguientes condiciones: potencial de entrada 10, gas de cortina 20, potencial de eliminación de 46 V, energía de colisión 15 eV, GAS1 40 y GAS2 30, 600 °C y 4500 V en modo MRM con la transición de 104 m/z > 87 m/z para cuantificar el GABA extracelular.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el GraphPad Software, Inc. versión 7.0. En primer lugar se evaluó la normalidad y las varianzas de los datos. En los casos en los que los datos fueran normales y las varianzas iguales se realizó un análisis de la varianza de una o dos vías (ANOVA) seguido de un test post-hoc. En aquellos casos en los que los datos no siguieron una distribución normal, se aplicaron test no paramétricos. Los resultados se expresaron como media \pm SEM (error estándar de la media).

8. REGISTROS DE CURVAS DE INPUT-OUTPUT A NIVEL POSTSINÁPTICO POR MULTIELECTRODE ARRAY (MEA)

8.1. Preparación de rodajas frescas de hipocampo para registro en MEA

Se decapitaron ratas control y ratas hiperamonémicas, tras 4 semanas de dieta rica en amonio y se extrajo el cerebro rápidamente para sumergirlo en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) mantenido en hielo (en mM): NaCl 125, KCl 3,5, NaH₂PO₄·H₂O, glucosa 10 NaHCO₃, CaCl₂·H₂O 2,4 y MgCl₂·H₂O 1,3 saturado con 95% de O₂ y 5% de CO₂. A continuación, se obtuvieron cortes transversales de hipocampo de 350 μm utilizando un vibratomo (Leica VT 1000S), siempre manteniendo el cerebro en ACSF en frío y continuamente oxigenado. Los cortes se mantuvieron durante 30 minutos en un vaso colocado en un baño a 35°C para su estabilización. Después, los cortes se mantuvieron en el mismo recipiente, pero a temperatura ambiente (25°C).

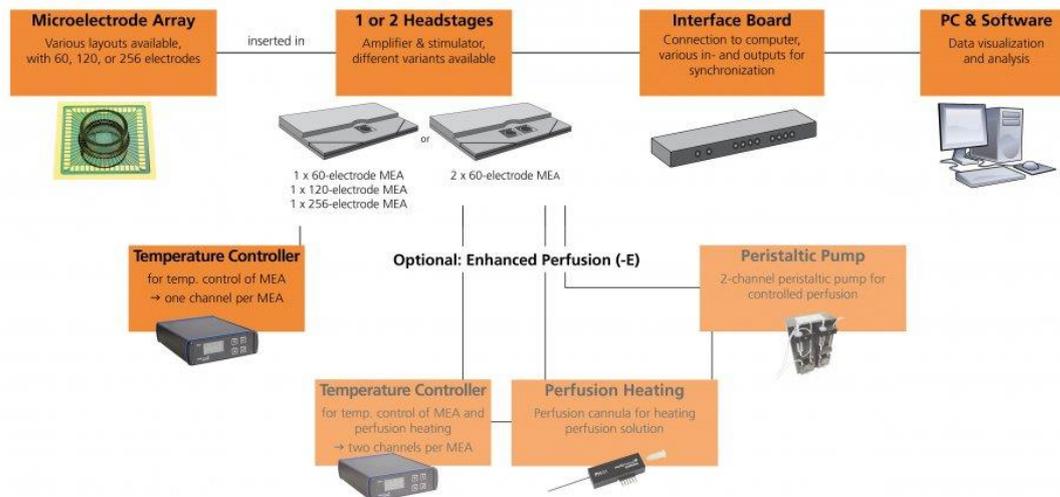


Figura 14. Sistema MEA 2100. El sistema MEA 2100 consta de varios componentes: MEAs, headstage (donde se encuentran el amplificador y el estimulador), la placa de interfaz, un ordenador con software, el controlador de temperatura, así como una bomba de perfusión peristáltica. El cabezal es el elemento central del sistema, alberga y calienta el MEA, amplifica y digitaliza las señales y tiene un generador de estímulos integrado, que puede generar señales de estimulación de corriente o de voltaje en tres canales independientes. El amplificador incorporado se encarga de que las señales registradas se amplifiquen cerca de la fuente de la señal, minimizando así el ruido. A continuación, los datos se muestrean a 50 kHz/canal en todos los canales simultáneamente, lo que garantiza una excelente calidad de datos. La placa de interfaz recibe los datos del cabezal a través de un cable iX tipo B. En la placa de interfaz, se encuentra un procesador de señales digitales que puede utilizarse para la detección de señales en tiempo real. La tarjeta de interfaz se conecta al ordenador mediante USB 3.0 SuperSpeed. El ordenador cuenta con el software Multi Channel Suite que consta de tres programas: Multi Channel Experimenter, que es la herramienta de adquisición de datos y análisis en línea; Multi Channel Analyzer, que es la herramienta de análisis; y Multi Channel DataManager, que facilita la exportación de datos para su análisis con otros programas, en nuestro caso en formato HDF5 para Matlab.

Para el registro extracelular de curvas de Input-Output se utilizó el sistema MEA2100 (Multi Channel Systems; Figura 14); este sistema permite el uso de diferentes setups MEA. En nuestro caso, se utilizaron 2 unidades MEA en paralelo, con una frecuencia de muestreo de 50 kHz por canal. Todos los registros se realizaron en matrices de 120 electrodos planares de nitruro de titanio (30 μm de diámetro) aislados con nitruro de silicio y un electrodo de referencia interno, dispuestos en una matriz de 12 x 10 electrodos, con una separación de 200 μm entre electrodos (Figura 15A). Este sistema permite el registro de los 120 electrodos y, además, cuenta con 8 canales analógicos adicionales.

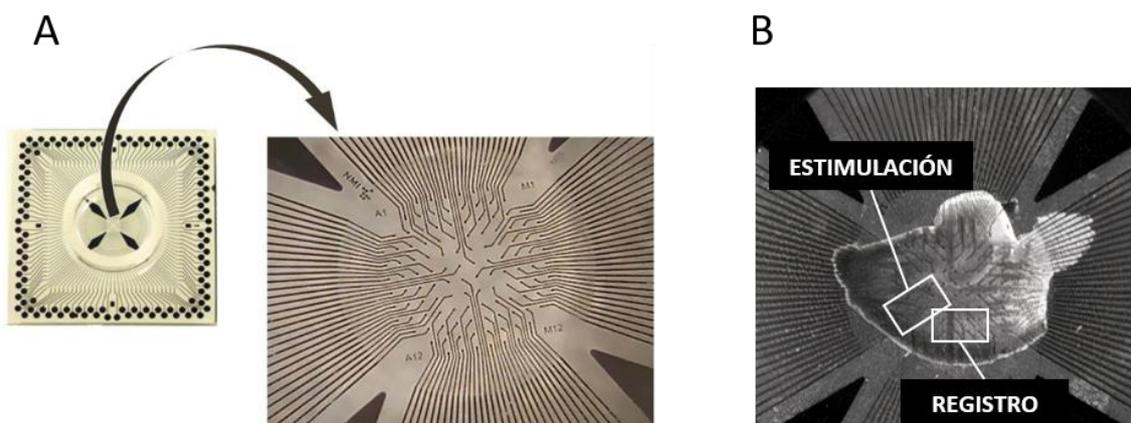


Figura 15. Microelectrode Array. A. El MEA cuenta con 120 electrodos planos de 30 μm de diámetro, 200 μm de separación entre electrodos, una impedancia < 100 k Ω y 4 electrodos internos de referencia. Los electrodos están incrustados en un sustrato de vidrio con un tamaño de 49mm x 49mm x 1mm. B. Imagen de una rodaja de hipocampo por medio del microscopio de mesa Video MEA-VMTC-1. Se muestra la zona de estimulación, colaterales de Schaffer, y la zona de registro de potenciales evocados, CA1.

Después de 1 hora a 25°C, se colocaron uno por uno los cortes obtenidos en la matriz de electrodos, continuamente perfundida con ACSF estándar (en mM): NaCl 125, KCl 3,5, NaH₂PO₄·H₂O, glucosa 10 NaHCO₃, CaCl₂·H₂O 0,5 y MgCl₂·H₂O saturado con 95% O₂ y 5% CO₂, gracias a una bomba peristáltica (velocidad de perfusión de 2,5-3 ml/min). La temperatura se mantuvo a 31 °C gracias a un controlador de temperatura. Los cortes se inmovilizaron mediante un anillo de plata con una malla de nylon adherida. Los cortes de hipocampo se visualizaron con un Microscopio de mesa Video MEA-VMTC-1 (sistemas multicanal). Se seleccionó uno de los 120 microelectrodos planares para la estimulación tetánica, localizado en la parte medial o distal del Stratum Radiatum, en el límite entre CA1 y CA3, y otro como electrodo de registro en la zona de CA1 (Figura 15 B). El protocolo de estimulación tetánica (10 minutos) consistió en trenes de estimulación bifásicos y rectangulares con una frecuencia de 100Hz, en una secuencia de estimulaciones desde -500/+500mV a -5000/+5000mV, con incrementos de 250mV por tren tetánico (Figura 16).

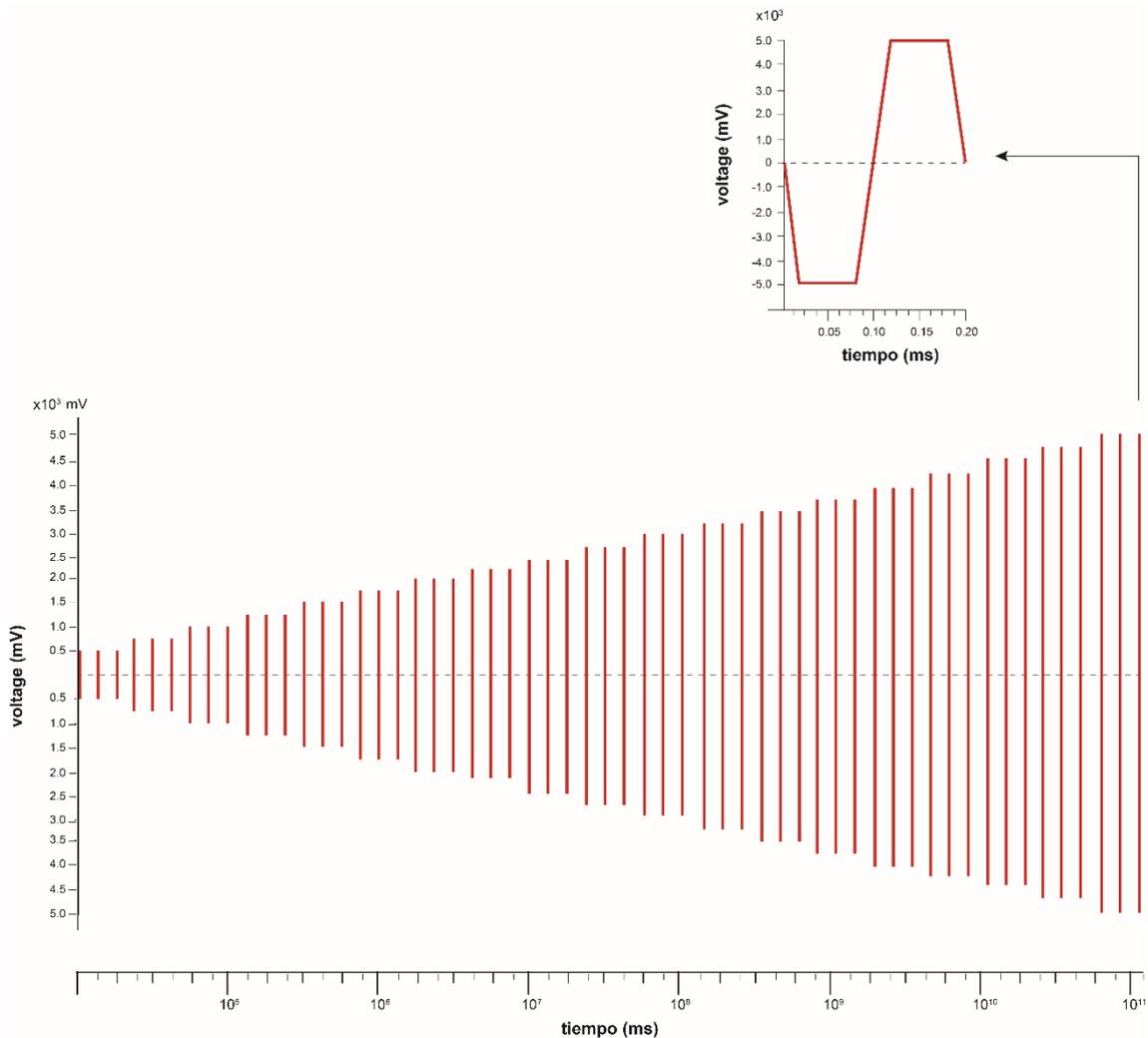


Figura 16. Protocolo de estimulación. Se aplico un protocolo de estimulación tetánica que consta de estimulaciones de tipo bifásico y rectangular. Las intensidades de estimulación fueron desde -500/+500mV a -5000/+5000mV, incrementando 250mV en cada tren de estimulación. A cada intensidad de estimulación se aplicaron tres estímulos.

Para la detección de las diferentes variables estudiadas se utilizó el Software Matlab, a partir de los registros obtenidos y exportados en formato HDF5.

8.2. Curvas I-O de receptores AMPA y NMDA

A partir de los ficheros de salida del sistema MEA en formato HDF5 se utilizó la plataforma de cálculo numérico MATLAB (The MathWorks, Natick, MA, EE.UU.) para la medida de los parámetros de los potenciales evocados, a partir de los registros obtenidos y exportados en formato HDF5.

En el caso de los experimentos destinados a estudiar la funcionalidad de los receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA, se buscó respuesta con ACSF, tras la obtención de respuesta eléctrica en la región de interés. El corte de hipocampo se perfundió durante 20 minutos con la

disolución A, ACSF estándar con picrotoxina (70 mM), con el fin de inhibir los receptores GABA_A, que constituyen la principal fuente de neurotransmisión inhibitoria en el hipocampo. A continuación, se registraron los potenciales evocados postsinápticos con el protocolo de estimulación tetánica explicado anteriormente durante 10 minutos. Se perfundieron los cortes con solución B, ACSF con picrotoxina, para seguir manteniendo inhibidos los receptores GABA_A, y CNQX (40 mM), para inhibir a los receptores AMPA, durante 15 minutos y se registraron los potenciales evocados postsinápticos durante 10 minutos. Tanto en los cortes basales como en los cortes tratados con GMPc se registró la curva la C_1 (disolución A: ACSF con picrotoxina) y la C_2 (disolución B: ACSF con picrotoxina y CNQX). La diferencia de ambas curvas evidencia el componente AMPA de la respuesta,

$$R_{AMPA} = C_1 - C_2$$

donde R_{AMPA} es la curva derivada de la respuesta de los receptores AMPA; C_1 , potencial obtenido inhibiendo los receptores GABA_A con picrotoxina; y C_2 , en la que siguen inhibidos los receptores GABA_A con picrotoxina y, además, se inhiben los receptores AMPA con CNQX.

El siguiente paso del protocolo consistió en la perfusión del hipocampo con la disolución C, ACSF con baja concentración de magnesio, con el fin de que los receptores NMDA no estuviesen bloqueados por dicho catión, durante 30 minutos. Para la solución baja en magnesio, la concentración de MgCl₂·H₂O se redujo a 0.1 mM y la concentración de CaCl₂·H₂O se elevó a 2.4 mM en el ACSF. Tras los 30 minutos de perfusión se registraron los potenciales postsinápticos durante 10 minutos. Por último, se perfundió la rodaja de hipocampo con la disolución D, ACSF con AP5 (25 mM), para inhibir a los receptores NMDA, durante 15 minutos y se registraron los potenciales evocados postsinápticos (10 minutos). La resta de la C_3 (disolución C: ACSF con picrotoxina, CNQX y baja concentración de magnesio) menos la C_4 (disolución D: ACSF con picrotoxina, CNQX y AP5) evidencia el componente NMDA de la respuesta,

$$R_{NMDA} = C_3 - C_4$$

donde R_{NMDA} es la curva derivada de la respuesta de los receptores NMDA; C_3 , potencial obtenido inhibiendo los receptores GABA_A con picrotoxina y los receptores AMPA con CNQX y manteniendo los receptores NMDA activos al reducir la concentración de magnesio; y C_4 , con inhibición tanto de los receptores GABA_A con picrotoxina, como los receptores AMPA con CNQX y los receptores NMDA con AP5.

En el caso de los cortes tratados con GMPc, se siguió el mismo procedimiento, pero las soluciones contenían adicionalmente GMPc a una concentración de 40 nM. En la figura 17 se detallan las

diferentes perfusiones. Cabe mencionar que todos los tratamientos se mantuvieron con oxigenación continua.

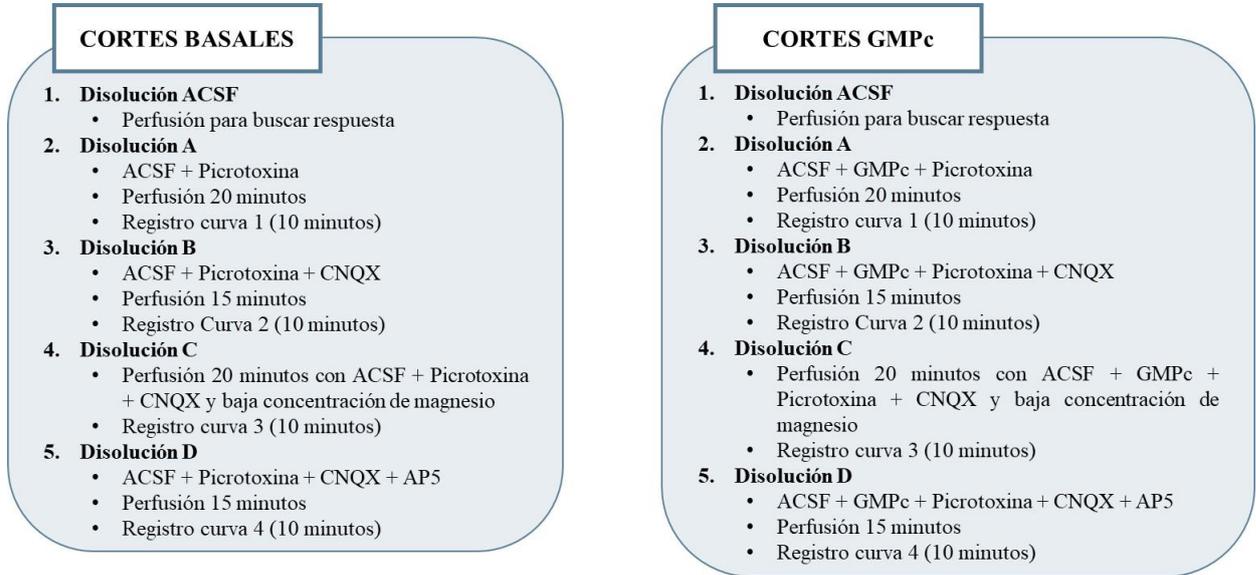


Figura 17. Protocolo de perfusión y registro para el estudio de la funcionalidad de los receptores AMPA y NMDA en cortes basales y en cortes perfundidos con GMPc.

8.3. Curvas I-O de receptores GABA_A

En el caso de las rodajas de hipocampo obtenidas como se detalla en el apartado 6.1. para estudios la funcionalidad de los receptores GABA_A, también teníamos tanto cortes basales como perfundidos con disoluciones que contienen GMPc. Se buscó respuesta perfundiendo el corte con ACSF. Tras la obtención de respuesta en la región de interés, el corte de hipocampo se perfundió durante 20 minutos con la disolución que únicamente contenía ACSF estándar, con el fin de no inhibir ningún receptor. A continuación, se registraron los potenciales evocados postsinápticos con el protocolo de estimulación tetánica durante 10 minutos, curva 0 (C_0). A continuación, los cortes se perfundieron durante 20 minutos con una disolución B que contiene ACSF y picrotoxina (70 mM), para inhibir a los receptores GABA_A, y se registraron los potenciales evocados durante 10 minutos, curva 1 (C_1). La diferencia entre C_0 y la C_1 evidencia el componente GABA_A de la respuesta,

$$R_{GABA} = C_0 - C_1$$

donde R_{GABA} es la curva derivada de la respuesta de los receptores GABA_A; C_0 , potencial obtenido sin inhibición de ningún tipo de receptor; y C_1 , con inhibición de los receptores GABA_A por el tratamiento con picrotoxina.

En el caso de los cortes tratados con GMPc, las perfusiones fueron las mismas, pero las disoluciones además contenían GMPc. En la figura 18 se detallan las perfusiones realizadas tanto en los cortes basales como en los cortes tratados con GMPc.

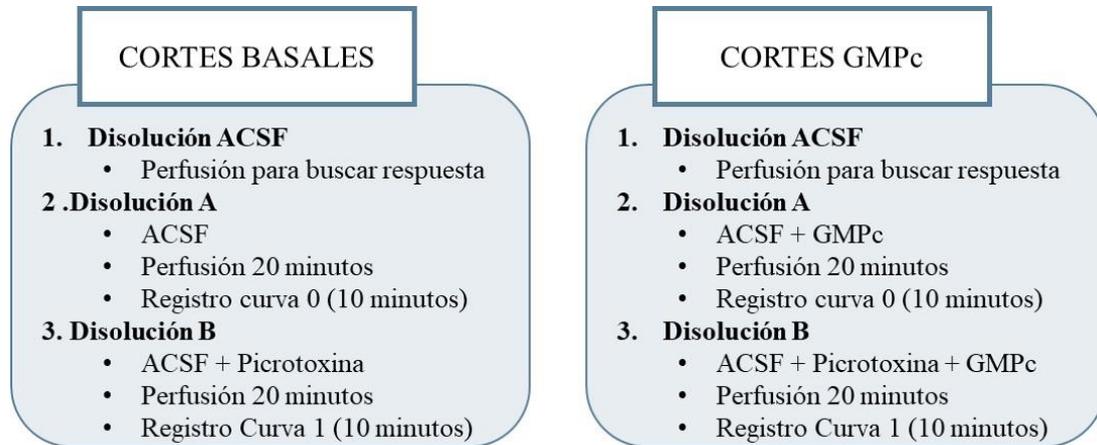


Figura 18. Protocolo de perfusión y registro para el estudio de la funcionalidad de los receptores GABA_A.

8.4. Análisis de las curvas I-O de receptores AMPA, NMDA y GABA_A

Las grabaciones de los registros de los potenciales postsinápticos AMPA, NMDA y GABA_A se importaron en MATLAB para su análisis. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando rutinas con código propio (ver anexo).

En primer lugar, reconstruimos las curvas de I-O derivadas del protocolo de estimulación. Las medidas de amplitud individuales se agruparon en grupos de 5 valores, lo que dio lugar a una curva de tipo sigmoideal en función de la intensidad de la estimulación (Figura 19). Se ajustaron los puntos de registro experimentales a una función sigmoideal definida por la amplitud (A [mV], variable dependiente) y la intensidad del estímulo (I [mA], variable independiente):

$$A(I) = A_0 + \frac{A_{max} - A_0}{1 + e^{-k(I-I_{50})}}$$

donde A_0 y A_{max} son los valores asintóticos inferior y superior, respectivamente; I_{50} es la intensidad del estímulo que produce una respuesta media, entre A_0 y A_{max} ; y k representa la pendiente alrededor del punto de inflexión. Las amplitudes de respuesta se corrigieron en base al primer valor de intensidad (1250 mV). Se aplicó una regresión por mínimos cuadrados, con R^2 ajustada para cuantificar la bondad del ajuste. La figura 19 representa las variables de los potenciales postsinápticos evaluados. Se utilizó el mismo ajuste sigmoideal para los componentes positivos y negativos y el área de desensibilización. Para el parámetro *delay* se utilizó un ajuste lineal.

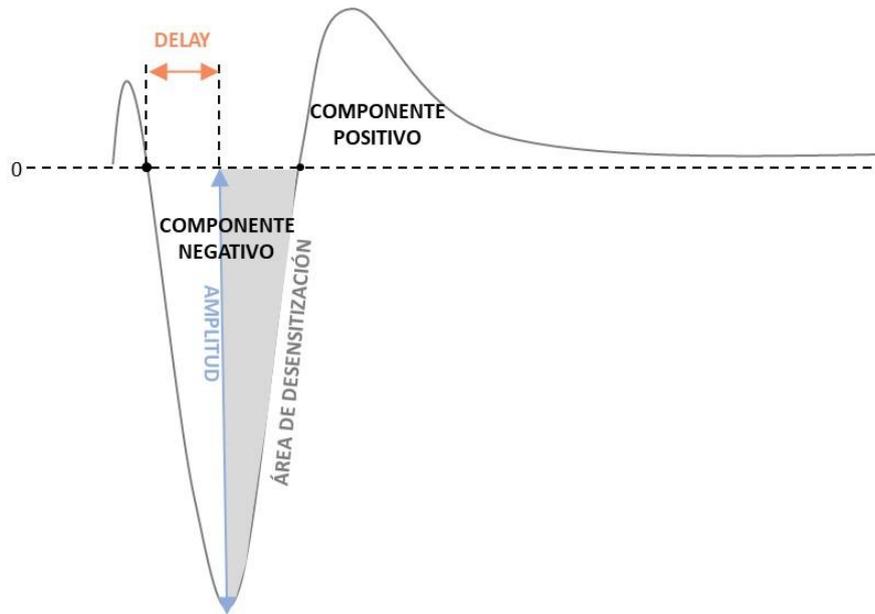


Figura 19. Parámetros analizados de los potenciales postsinápticos, curvas Input-Output. Analizamos diferentes parámetros de los potenciales postsinápticos tanto excitatorios (EPSPs) como inhibitorios (IPSPs). Delay: tiempo (ms) que tarda en alcanzarse la amplitud máxima. Amplitud del potencial postsináptico. Componente negativo: área de despolarización. Componente positivo: área de hiperpolarización. Área de desensitización.

8.4.1. Análisis de potenciales postsinápticos secundarios

Puesto que a mayores intensidades de estimulaciones aparecían EPSPs evocados secundarios, es decir, una sumación temporal de potenciales postsinápticos, decidimos crear una nueva rutina para el análisis por separado de cada potencial postsináptico. Esto nos permitió estudiar el efecto de la hiperamonemia y del GMPc extracelular sobre la integración sináptica glutamatérgica (receptores AMPA y NMDA) y GABAérgicas (receptores GABA_A). Se ajustaron cada uno de los potenciales postsinápticos (EPSPs en el caso de receptores AMPA y NMDA e IPSPs en el caso de receptores GABA_A) a funciones teóricas de curvas gaussianas (2) y exponenciales (3),

$$V_g(t) = \exp\left(-\frac{t-p}{0.601 \cdot w}\right)^2 \quad (2)$$

donde t es la variable independiente tiempo, p la posición temporal del potencial postsináptico ajustado a una curva gaussiana y w la anchura de la curva (Figura 20 A); y

$$V_e(t) = \exp(-\tau_1 \cdot t) \cdot (1 - \exp(-\tau_2 \cdot t)) \quad (3)$$

donde t es la variable de tiempo, τ_1 es la constante de subida de la curva y τ_2 la constante de decaimiento de la curva. Así, cada potencial postsináptico de la respuesta postsináptica global se

caracterizó por el tiempo de respuesta, la duración de la respuesta y la cinética de la despolarización (τ_1) y repolarización postsináptica (τ_2) (Figura 20 B).

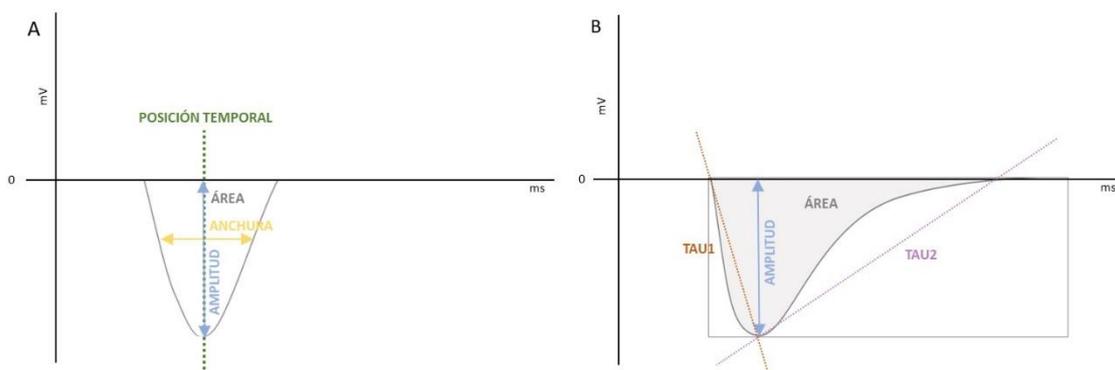
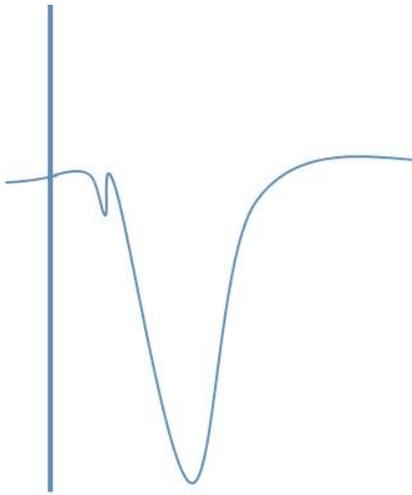


Figura 20. Parámetros analizados en la descomposición de la respuesta en diferentes potenciales postsinápticos. A. Ajuste de curvas I/O a una curva gaussiana teórica. Se analizaron los siguientes parámetros característicos de las curvas gaussianas: posición temporal: tiempo al que se alcanza la amplitud máxima. Amplitud del potencial postsináptico. Anchura de la curva. Área del potencial postsináptico. B. Ajuste de curvas I/O a una curva exponencial teórica. Se analizaron los siguientes parámetros de la curva: τ_1 : cinética de despolarización, velocidad de despolarización. Amplitud del EPSP. Área del EPSP. τ_2 : cinética de repolarización, velocidad de repolarización.

En este caso, el análisis estadístico se realizó con el GraphPad Software, Inc. versión 7.0. En primer lugar, se evaluó la normalidad y las varianzas de los datos. En los casos en los que los datos fueran normales y las varianzas iguales se realizó un análisis de la varianza de una o dos vías (ANOVA) seguido de un test post-hoc. En aquellos casos en los que los datos no siguieron una distribución normal, se aplicaron test no paramétricos. Los resultados se expresaron como media \pm SEM (error estándar de la media) del número de animales.

En el Anexo aparecen las rutinas de MATLAB utilizadas para el análisis de los potenciales postsinápticos y la descomposición de la respuesta postsináptica en diferentes potenciales.



CAPÍTULO 1: RESULTADOS Y DISCUSIÓN



RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA HIPERAMONEMIA Y EL GMPc EXTRACELULAR SOBRE LA FUNCIÓN DE RECEPTORES AMPA Y NMDA EN HIPOCAMPO EX VIVO

El objetivo principal del presente capítulo fue caracterizar los efectos de la hiperamonemia sobre la respuesta del conjunto neuronal de CA1 tras su activación. Mediante la aplicación de estímulos presinápticos despolarizantes, se estudió si la hiperamonemia es capaz de inducir cambios en las respuestas sinápticas mediadas por receptores de glutamato AMPA y NMDA.

Se realizaron registros de potencial de campo en las sinapsis colaterales Schäffer-CA1 en rodajas de hipocampo. Tanto en el caso de los receptores AMPA, como de los NMDA, se calculó la correlación I/O de potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) para medir la eficiencia de la transmisión sináptica excitatoria.

Descompusimos la respuesta del potencial postsináptico de los receptores AMPA y NMDA en sus diferentes fases: componente positivo (área de hiperpolarización) y negativo (área de despolarización) de la curva, zona de desensitización y *delay* (Ver apartado 6.2 de Material y Métodos, Figura 19). Este enfoque nos permite comprender mejor qué aspectos de la función de los receptores AMPA y NMDA se ven afectados por la hiperamonemia y el GMPc extracelular.

La amplitud de la respuesta sináptica permitió una clara caracterización del comportamiento de los receptores de glutamato. Ajustando los valores a curvas sigmoidales, para analizar la respuesta I/O, se obtuvieron los siguientes parámetros característicos: la amplitud máxima (A_{max}), la constante k y el valor de voltaje que evocó la respuesta media (S_{50}), con valores $R^2 > 0,9$, demostrando así la bondad del ajuste.

1.1. Función de los receptores AMPA

1.1.1. Estudio de las curvas Input-Output (I/O) de receptores AMPA en función de la intensidad de estimulación

A partir de las curvas normalizadas de las respuestas AMPA, observamos que la hiperamonemia reduce la amplitud de las respuestas, en comparación con el grupo control (Tabla 5; $F = 266,0$; $p < 0,0001$), tanto si comparamos la A_{max} ($F = 73,54$; $p < 0,01$), la S_{50} ($F = 10,94$; $p < 0,01$) o la k ($F = 4,92$; $p < 0,05$) (Figura 21A y Tabla 5) y el GMPc extracelular normaliza esta alteración (F

= 491,7; $p < 0,01$), aumentando la amplitud hasta valores similares a los encontrados en ratas control.

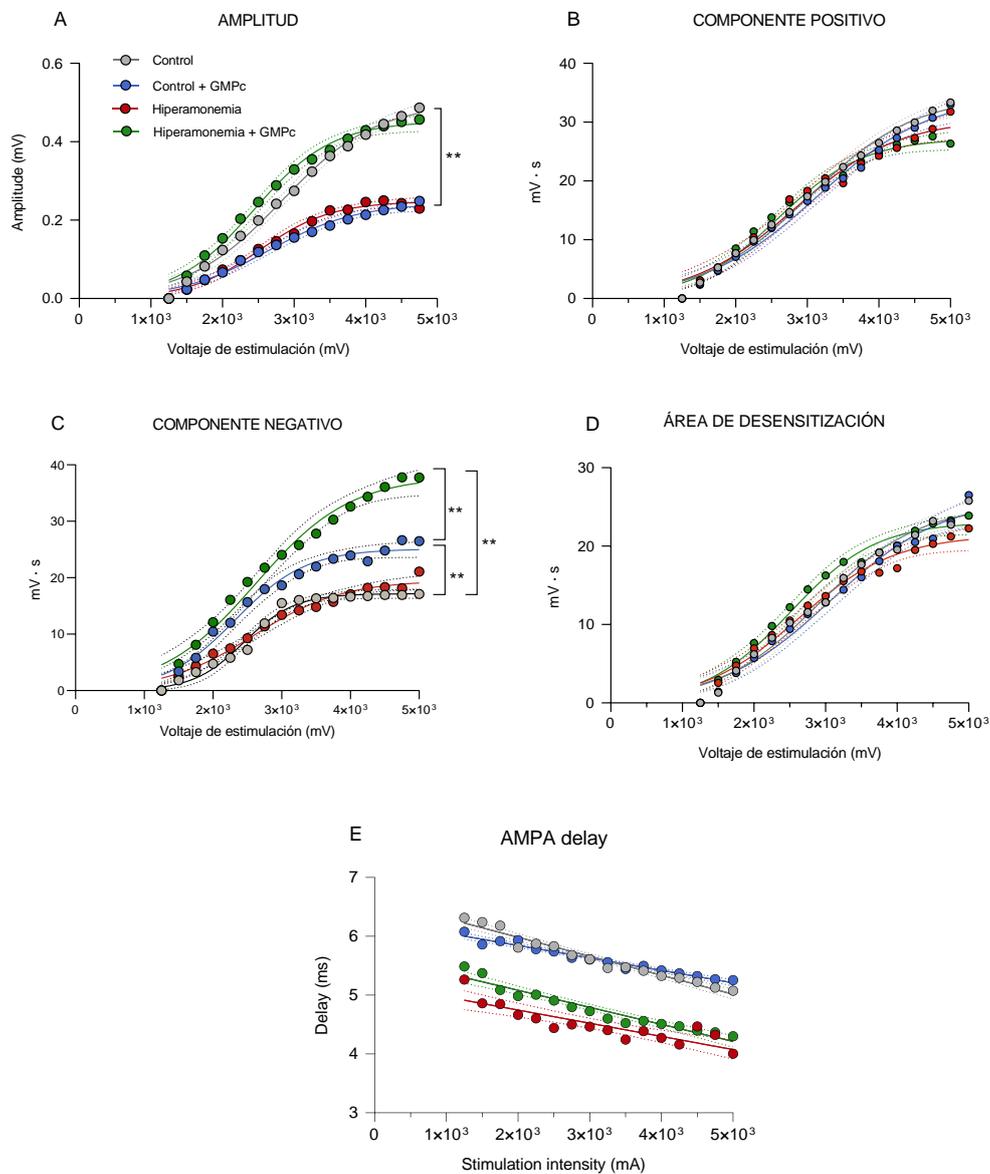


Figura 21. Efectos de la hiperamonemia y el GMPc extracelular sobre la amplitud (A), el componente positivo (B), el componente negativo (C), el área de desensitización (D) y el delay (E) de las curvas I/O mediadas por receptores AMPA. Los valores son medias de 16-20 cortes de hipocampo por grupo. Los datos fueron analizados por un análisis de regresión no lineal. Los valores estadísticamente significativos están representados por asteriscos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Por otra parte, el GMPc extracelular en cortes de hipocampo procedentes de ratas control da lugar a una reducción de la amplitud de la respuesta respecto al grupo control basal ($F = 491,7$; $p < 0,0001$), hasta valores similares a los observados en condiciones de HA ($F = 2,51$; $p = 0,12$).

Tabla 5. Efectos de la hiperamonemia y del GMPc extracelular sobre los valores de las variables estudiadas de las respuestas mediadas por receptores AMPA.

		Control		Hiperamonemia	
		Basal	GMPc	Basal	GMPc
AMPLITUD	A_{max} (mV)	0.499 ± 0.0166	0.2435 ± 0.0089 **	0.2479 ± 0.0064 **	0.4527 ± 0.0114 aa
	$S_{50} \times 10^3$ (mA)	2.828 ± 68.06	2.636 ± 76.27	2.520 ± 52.22 *	2.439 ± 52.66
	K	0.0015 ± 0.0001	0.0016 ± 0.0002	0.002 ± 0.0002	0.0018 ± 0.0002
COMPONENTE POSITIVO	A_{max} (mV)	34.58 ± 1.318	34.73 ± 1.862	30.54 ± 1.65	27.23 ± 0.8735
	$S_{50} \times 10^3$ (mA)	3.02 ± 0.0841	3.14 ± 0.12	2.821 ± 0.1216	2.588 ± 0.0711
	K	0.0013 ± 0.0001	0.0012 ± 0.0001	0.0014 ± 0.0002	0.0017 ± 0.0002
COMPONENTE NEGATIVO	A_{max} (mV)	17.17 ± 0.3735	25.11 ± 0.6927 **	19.53 ± 0.7494 **	37.96 ± 1.522 **, aa
	$S_{50} \times 10^3$ (mA)	2.453 ± 0.0443	2.326 ± 0.06265	2.592 ± 0.0867	2.624 ± 0.0916
	K	0.0027 ± 0.0003	0.002 ± 0.0002 *	0.0015 ± 0.0002 **	0.0015 ± 0.0002 **
ÁREA DE DESENSITIZACIÓN	A_{max} (mV)	25.26 ± 1.166	21.44 ± 0.9121	24.21 ± 1.69	23.09 ± 0.7297
	$S_{50} \times 10^3$ (mA)	2.904 ± 0.1014	2.616 ± 0.0969	3.076 ± 0.1446	2.504 ± 0.6024
	K	0.0014 ± 0.0002	0.0015 ± 0.0002	0.0013 ± 0.0002	0.0017 ± 0.0002
DELAY	$Y_{intercept}$	6.63 ± 0.1703	6.628 ± 0.1337	5.194 ± 0.145 **	5.663 ± 0.1302 **
	$S \times 10^{-4}$ (mA)	-3.23 ± 0.5114	-2.15 ± 0.4014	-2.234 ± 0.4355	-2.9 ± 0.3909

El ajuste a curvas sigmoidales de los valores de los EPSPs AMPA, utilizado como una aproximación para representar la respuesta de I/O, aporta tres parámetros característicos: la amplitud máxima (A_{max}), la estimulación que evoca la respuesta media (S_{50}) y la pendiente en torno al punto de inflexión (k). Los valores de R^2 fueron $> 0,9$, demostrando así la bondad de ajuste. En el caso del *delay*, el ajuste se realizó a una regresión lineal, lo que aporta dos parámetros característicos: punto en el que la línea cruza el eje Y ($Y_{intercepción}$) y la pendiente (S). Los valores significativamente diferentes de los de las ratas de control y de las ratas con HA se indican con asteriscos y a, respectivamente. [$*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $^a p < 0,05$, $^{aa} p < 0,01$].

El componente positivo del EPSP de la respuesta AMPA no se ve alterado por la hiperamonemia ($F = 2,932$; $p > 0,05$), tanto si comparamos la A_{max} ($F = 2,764$; $p > 0,05$), como S_{50} ($F = 1,404$; $p > 0,05$) o k ($F = 0,0388$; $p > 0,05$). El GMPc extracelular tampoco produce ningún cambio en este componente ($F = 1,135$; $p > 0,05$): A_{max} ($F = 3,202$; $p > 0,05$), S_{50} ($F = 2,545$; $p > 0,05$) y k ($F = 1,312$; $p > 0,05$) (Figura 21B, Tabla 5).

En el caso del componente negativo de la curva de I/O AMPA pudimos observar que la hiperamonemia produce un aumento de esta área ($F = 5,122$; $p < 0,01$) si comparamos A_{max} ($F = 9,642$; $p < 0,01$) y k ($F = 13,49$; $p < 0,01$), pero no si comparamos S_{50} ($F = 2,151$; $p > 0,05$). El GMPc extracelular produce un aumento del componente negativo respecto al grupo hiperamonemia ($F = 178,1$; $p < 0,01$) y respecto al grupo control. Estas diferencias se deben a cambios en A_{max} ($F = 18,56$; $p < 0,01$) y k ($F = 13,49$; $p < 0,01$). En el caso del grupo control, el GMPc extracelular aumenta el componente negativo de la respuesta mediada por los receptores AMPA ($F = 76,98$; $p < 0,01$). Encontramos diferencias tanto en el A_{max} ($F = 66,33$; $p < 0,01$) como en k ($F = 3,993$; $p < 0,01$), pero no en S_{50} ($F = 2,396$; $p > 0,05$) (Figura 21C, Tabla 5).

En cuanto al área de desensitización, otro componente del potencial postsináptico mediado por receptores AMPA, no se ve afectado ni por la hiperamonemia ni por el GMPc extracelular (Figura 21D). La hiperamonemia induce una disminución del delay ($F = 5,152$; $p < 0,01$). El GMPc extracelular no tiene ningún efecto sobre el delay de los EPSPs mediados por receptores AMPA

ni en los cortes de hipocampo procedentes de ratas control ni en aquellos procedentes de ratas hiperamonémicas (Figura 21E).

1.1.2. Estudio de las curvas I/O por rangos de estimulación

Para analizar en mayor profundidad el efecto de la hiperamonemia y el GMPc extracelular sobre los potenciales evocados de los receptores AMPA evaluamos las curvas de I/O por tramos de intensidades de estimulación. Analizamos la presencia de EPSPs en los potenciales evocados promedio de cada uno de estos intervalos de estimulación: 1250-2500 mV (primer rango), 2750-4000 mV (segundo rango), 4250-5000 mV (tercer rango) (Figura 22 A). Observamos que en el caso del componente AMPA, se produce una clara depresión de los EPSPs secundarios que aparecen a intensidades de estimulación mayores, la cual es evidente por la disminución de la amplitud de los EPSPs ($F = 7,16, p < 0,01$; Figura 22 C).

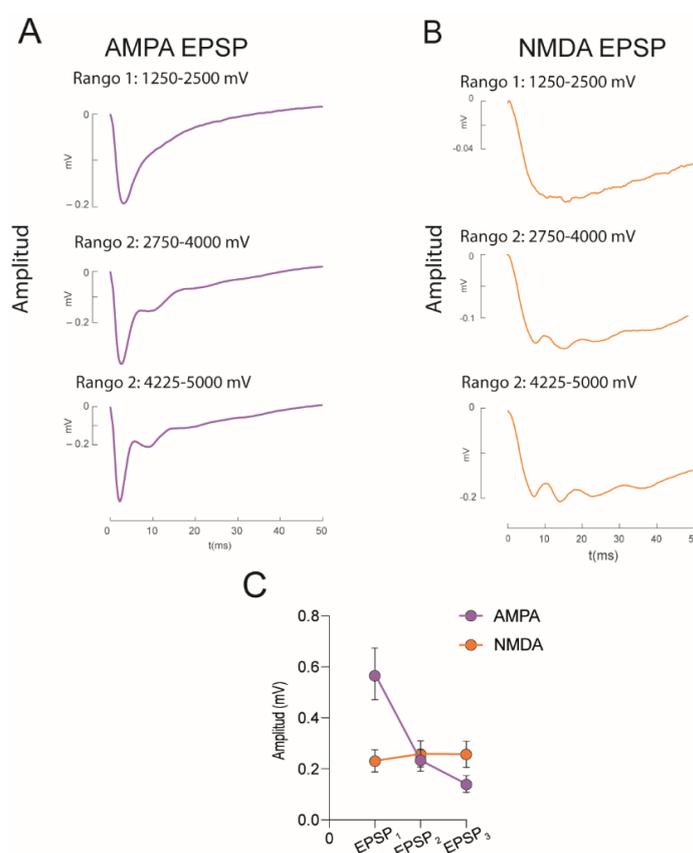


Figura 22. Curvas modelo AMPA y NMDA por rangos de estimulación del grupo control. A. Ejemplo de las curvas medias de I/O AMPA por rangos de estimulación. En el primer rango de estimulación aparece un EPSP, mientras que en el segundo y tercer rango de estimulación aparecen más de un EPSPs, en todos los grupos experimentales excepto en el control tratado con GMPc extracelular. B. Ejemplo de las curvas medias de I/O NMDA por rangos de estimulación. En el primer rango de estimulación aparece un EPSP, mientras que en el segundo rango de estimulación más EPSPs y en el tercer rango de estimulación hasta 4 EPSPs, en todos los grupos experimentales excepto en el control tratado con GMPc extracelular. Tanto en A como en B los EPSPs secundarios aparecen a intensidades de estimulación superiores a 2500 mV, a partir del rango de estimulación 2. C. Amplitudes de los tres EPSPs AMPA y NMDA que aparecen a intensidades de estimulación altas. Rango 1: 1250-2500 mV; Rango 2: 2750-4000 mV; Rango 3: 4225-5000 mV. A y B son imágenes extraídas de matlab de todos los casos estudiados del grupo control basal y modificada con Adobe Illustrator.

La hiperamonemia tiende a disminuir la amplitud del EPSP en el rango de estimulación 1250-2500 mV. El GMPc extracelular normalizaría esta alteración.

En el primer rango de estimulación (1250-2500 mV) únicamente detectamos un EPSP. En este EPSP, la hiperamonemia tiende a disminuir la amplitud, mientras que el tratamiento de los cortes procedentes de ratas hiperamonémicas con GMPc extracelular tiende a normalizar esta alteración. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($F = 2,681$, $p > 0,05$) (Figura 23). Además, el GMPc extracelular en los cortes de ratas control retrasa la aparición de este EPSP (Tabla 6, $F = 4,304$; $p < 0,05$) y aumenta su anchura ($F = 9,739$; $p < 0,0001$) y τ_2 ($F = 3,611$, $p < 0,05$) respecto al grupo control basal (Figura 23 A, B, F). Sin embargo, ni la hiperamonemia ni el tratamiento con GMPc extracelular tienen efecto sobre el área y la τ_1 (Tabla 6).

La hiperamonemia disminuye la amplitud y el área del primer y segundo EPSPs en el rango de estimulación 2750-4000 mV. El GMPc extracelular normaliza esta alteración.

En el segundo intervalo de estimulación estudiado se detectan dos EPSPs. En el primer EPSP, la hiperamonemia induce una disminución de la amplitud ($F = 4,235$; $p < 0,05$) respecto al grupo control y el GMPc extracelular revierte esta alteración ($p < 0,05$) (Figura 23 I). Sin embargo, la hiperamonemia no afecta a las demás variables estudiadas. En el caso de cortes de hipocampo de ratas control, el GMPc extracelular retrasa la aparición del primer EPSP ($F = 4,995$; $p < 0,05$), aumenta la anchura ($F = 5,219$; $p < 0,05$), el área ($F = 6,447$; $p < 0,05$) y τ_2 ($F = 4,407$; $p < 0,05$) y disminuye la τ_1 ($F = 3,223$; $p < 0,05$) (Figura 23 G-L). Aunque el GMPc extracelular en el grupo de control tiende a disminuir la amplitud, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

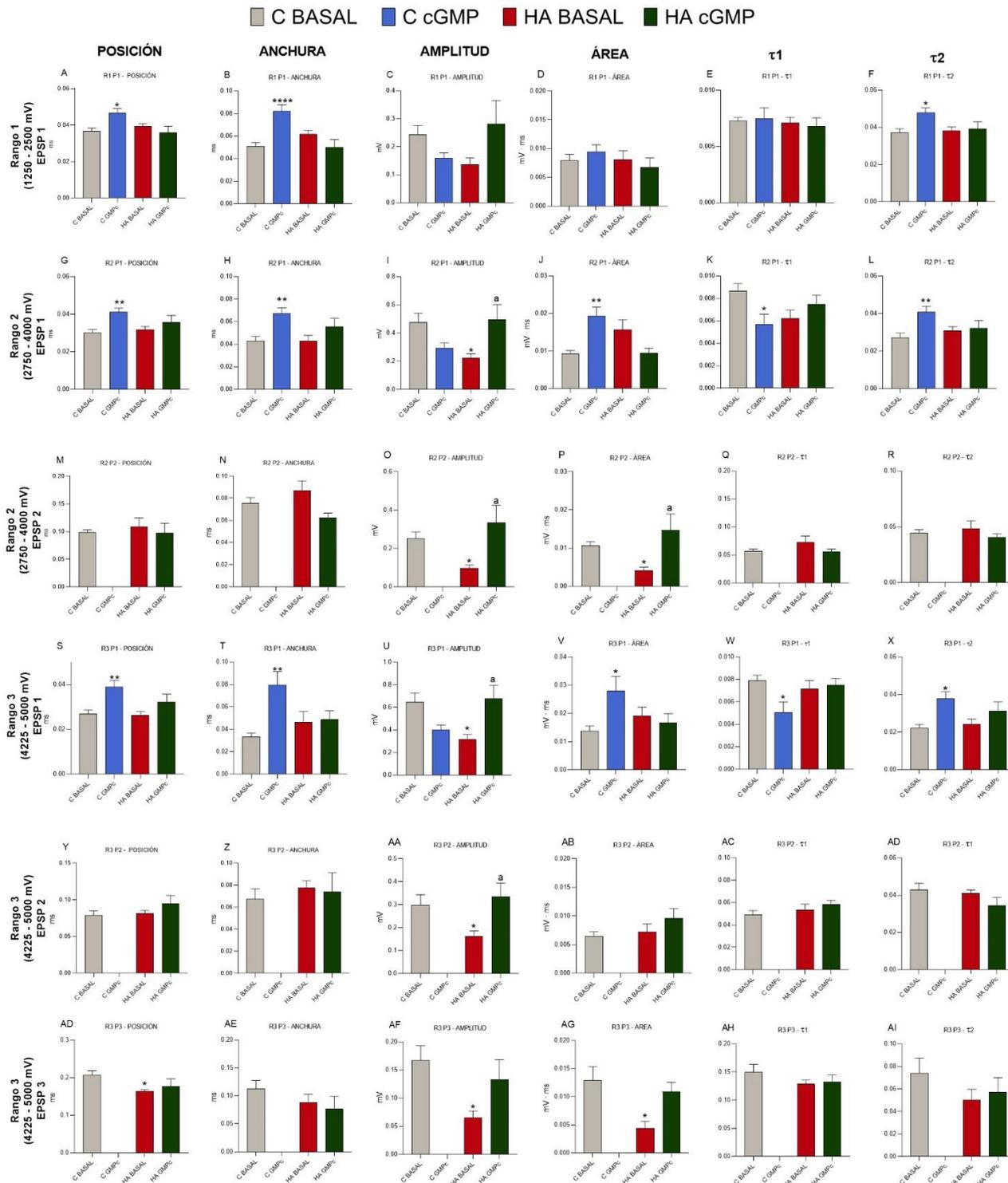


Figura 23. Efectos de la hiperamnesia y del GMPc extracelular sobre los valores de los parámetros analizados en los EPSPs de las curvas I/O AMPA. R=rango de estimulación; P=EPSP. Rango 1: 1250-2500 mV; Rango 2: 2750-4000 mV; Rango 3: 4225-5000 mV. En aquellos casos en los que los datos siguen una distribución normal el análisis estadístico se llevó a cabo con un test paramétrico, ANOVA, mientras que en aquellos casos en los que los datos no seguían una distribución normal se realizó un test Kruskal-Wallis. Los valores estadísticamente significativos respecto al grupo control están representados con un asterisco (*): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Los valores estadísticamente significativos respecto al grupo hiperamnesia están representados con una a: $a < 0.05$.

En cuanto al segundo EPSP, el GMPc extracelular impide la aparición de este segundo EPSP en los cortes de ratas control (Figura 23 M-R). La hiperamonemia disminuye tanto la amplitud ($F = 5,421$; $p < 0,05$) como el área ($F = 6,373$; $p < 0,05$) del segundo EPSP y el GMPc extracelular revierte esta alteración ($p < 0,05$) (Figura 23 O-P). La hiperamonemia no afecta a las demás variables.

Tabla 6. Efecto de la hiperamonemia y del GMPc extracelular sobre los parámetros estudiados a diferentes intensidades de estimulación en los EPSPs AMPA.

	VARIABLE	F	MEDIA \pm SEM			
			CONTROL		HIPERAMONEMIA	
			Basal	GMPc	Basal	GMPc
RANGO 1 (1250-2500 mV) EPSP 1 GAUSIANA	POSICIÓN	4.304	0,0367 \pm 0,0016	0,0465 \pm 0,0025 *	0,0398 \pm 0,0014	0,0357 \pm 0,0036
	AMPLITUD	3.061	0,2661 \pm 0,0372	0,1587 \pm 0,0186 *	0,1296 \pm 0,0198	0,2923 \pm 0,0887
	ANCHURA	9.739	0,051 \pm 0,0032	0,0819 \pm 0,0058	0,0615 \pm 0,0035	0,0502 \pm 0,0069
	ÁREA	0.433	0,0073 \pm 0,0008	0,0086 \pm 0,001	0,0077 \pm 0,0013	0,0068 \pm 0,0017
RANGO 1 (1250-2500 mV) EPSP 1 EXPONENCIAL	τ_1	0.183	0,0073 \pm 0,0003	0,0075 \pm 0,001	0,0071 \pm 0,0005	0,0068 \pm 0,0007
	AMPLITUD	2.681	0,2431 \pm 0,0332	0,1594 \pm 0,0186	0,1360 \pm 0,0243	0,2814 \pm 0,0832
	τ_2	3.611	0,0372 \pm 0,0021	0,0479 \pm 0,0025 *	0,0382 \pm 0,0021	0,0392 \pm 0,0038
	ÁREA	0.615	0,0079 \pm 0,0012	0,0094 \pm 0,0012	0,0081 \pm 0,0015	0,0067 \pm 0,0016
RANGO 2 (2750-4000 mV) EPSP 1 GAUSIANA	POSICIÓN	4.995	0,0301 \pm 0,0021	0,0412 \pm 0,0021 **	0,0318 \pm 0,0017	0,0357 \pm 0,0036
	AMPLITUD	4.253	0,5092 \pm 0,0655	0,3099 \pm 0,047	0,2416 \pm 0,0309	0,5235 \pm 0,1205
	ANCHURA	5.219	0,0429 \pm 0,0042	0,0672 \pm 0,0051 **	0,043 \pm 0,0049	0,0557 \pm 0,0071
	ÁREA	4.010	0,0124 \pm 0,0014	0,021 \pm 0,003 *	0,01 \pm 0,0017	0,0153 \pm 0,0032
RANGO 2 (2750-4000 mV) EPSP 1 EXPONENCIAL	τ_1	3.223	0,0087 \pm 0,0007	0,0057 \pm 0,0009 *	0,0062 \pm 0,0008	0,0075 \pm 0,0008
	AMPLITUD	3.090	0,475 \pm 0,0655	0,2939 \pm 0,036	0,2434 \pm 0,0325 *	0,4315 \pm 0,0948 a
	τ_2	4.407	0,0274 \pm 0,0022	0,0408 \pm 0,0032 **	0,0308 \pm 0,0022	0,0321 \pm 0,0042
	ÁREA	6.447	0,0092 \pm 0,0009	0,0194 \pm 0,0023 *	0,0157 \pm 0,0027	0,0094 \pm 0,0013
RANGO 2 (2750-4000 mV) EPSP 2 GAUSIANA	POSICIÓN	0.384	0,0981 \pm 0,0051		0,1091 \pm 0,0156	0,0973 \pm 0,0177
	AMPLITUD	5.421	0,2514 \pm 0,0343		0,0966 \pm 0,0169 *	0,3338 \pm 0,0916 a
	ANCHURA	1.560	0,0753 \pm 0,0053		0,0868 \pm 0,009	0,0622 \pm 0,0044
	ÁREA	1.496	0,0074 \pm 0,0011		0,006 \pm 0,0020 *	0,0114 \pm 0,0038 a
RANGO 2 (2750-4000 mV) EPSP 2 EXPONENCIAL	τ_1	1.630	0,0569 \pm 0,0034		0,0723 \pm 0,0116	0,0558 \pm 0,0045
	AMPLITUD	8.131	0,2372 \pm 0,0315		0,1438 \pm 0,0332	0,4251 \pm 0,0434
	τ_2	0.413	0,0446 \pm 0,003		0,0484 \pm 0,0068	0,0404 \pm 0,0033
	ÁREA	5.180	0,0108 \pm 0,0012		0,0041 \pm 0,0009 *	0,0146 \pm 0,0043 a
RANGO 3 (4225-5000 mV) EPSP 1 GAUSIANA	POSICIÓN	5.693	0,0269 \pm 0,0017	0,0389 \pm 0,0029 **	0,0263 \pm 0,0016	0,0321 \pm 0,0035
	AMPLITUD	4.242	0,6283 \pm 0,079	0,4007 \pm 0,0467	0,3315 \pm 0,0438	0,6529 \pm 0,1147
	ANCHURA	5.42	0,0333 \pm 0,0033	0,0795 \pm 0,0121 **	0,0466 \pm 0,0093	0,0488 \pm 0,0077
	ÁREA	4.567	0,015 \pm 0,0021	0,0329 \pm 0,0060 *	0,0188 \pm 0,0032	0,0184 \pm 0,0033
RANGO 3 (4225-5000 mV) EPSP 1 EXPONENCIAL	τ_1	2.834	0,0079 \pm 0,0005	0,0151 \pm 0,0009 *	0,0071 \pm 0,0008	0,0075 \pm 0,0006
	AMPLITUD	4.726	0,6452 \pm 0,0816	0,3985 \pm 0,0453	0,3151 \pm 0,0463 *	0,6748 \pm 0,1205 a
	τ_2	5.719	0,0221 \pm 0,0021	0,0379 \pm 0,0036 *	0,0243 \pm 0,0027	0,0314 \pm 0,0047
	ÁREA	3.35	0,0138 \pm 0,0018	0,0279 \pm 0,0052 *	0,0192 \pm 0,0031	0,0168 \pm 0,0031
RANGO 3 (4225-5000 mV) EPSP 2 GAUSIANA	POSICIÓN	1.268	0,0789 \pm 0,0058		0,0812 \pm 0,0042	0,0945 \pm 0,0011
	AMPLITUD	4.695	0,2986 \pm 0,0451		0,1633 \pm 0,0214 *	0,3346 \pm 0,059 a
	ANCHURA	0.275	0,0674 \pm 0,0093		0,0774 \pm 0,0067	0,0738 \pm 0,0176
	ÁREA	1.526	0,0065 \pm 0,0007		0,0072 \pm 0,0014	0,0096 \pm 0,0017
RANGO 3 (4225-5000 mV) EPSP 2 EXPONENCIAL	τ_1	0.925	0,0492 \pm 0,0038		0,0535 \pm 0,0051	0,0584 \pm 0,0038
	AMPLITUD	4.426	0,2919 \pm 0,0463		0,1518 \pm 0,0205 *	0,3101 \pm 0,0452 a
	τ_2	1.295	0,0423 \pm 0,0036		0,0411 \pm 0,0018	0,0344 \pm 0,0044
	ÁREA	0.773	0,0065 \pm 0,0007		0,0078 \pm 0,0014	0,0083 \pm 0,0013
RANGO 3 (4225-5000 mV) EPSP 3 GAUSIANA	POSICIÓN	4.978	0,2065 \pm 0,0119		0,1639 \pm 0,0045 *	0,1769 \pm 0,0201
	AMPLITUD	5.878	0,1672 \pm 0,0258		0,0653 \pm 0,0122 *	0,1505 \pm 0,0302
	ANCHURA	1.055	0,1123 \pm 0,0152		0,0879 \pm 0,0153	0,0764 \pm 0,0225
	ÁREA	5.109	0,0129 \pm 0,0025		0,0044 \pm 0,0012 *	0,0109 \pm 0,0017
RANGO 3 (4225-5000 mV) EPSP 3 EXPONENCIAL	τ_1	0.94	0,1493 \pm 0,0146		0,1285 \pm 0,0072	0,1326 \pm 0,0126
	AMPLITUD	3.331	0,1514 \pm 0,0274		0,0667 \pm 0,0119 *	0,1339 \pm 0,0348
	τ_2	1.09	0,0742 \pm 0,0134		0,0504 \pm 0,0094	0,0572 \pm 0,0129
	ÁREA	4.036	0,012 \pm 0,0024		0,0044 \pm 0,0012 *	0,0109 \pm 0,0017

Para cada variable se muestra el valor del estadístico (F) y la Media \pm SEM de cada grupo, ajustando los valores de los EPSPs AMPA a curvas gaussianas o exponenciales. Se obtuvieron cuatro parámetros característicos en el caso de la curva gaussiana: posición temporal (tiempo en el que se alcanza la máxima amplitud), amplitud del EPSP, anchura del EPSP y área del EPSP. En el caso de los EPSP ajustados a una curva exponencial, tenemos cuatro parámetros característicos: τ_1 (velocidad de crecimiento), amplitud del EPSP, τ_2 (velocidad de caída) y área del EPSP. Tanto en los ajustes a curvas gaussianas como exponenciales, los valores de R^2 fueron $> 0,9$, demostrando así la bondad del ajuste. En el caso del *delay* se ajustó a una regresión lineal a los valores agrupados, obtuvimos dos parámetros característicos: punto en el que la línea cruza el eje Y ($Y_{intercepción}$) y la pendiente (S). Los valores significativamente diferentes a los de las ratas de

control y a los de las ratas con HA se indican con asteriscos y a, respectivamente. [$*p < 0,05$, $**p < 0,01$, a $p < 0,05$].

La hiperamonemia disminuye la amplitud del primer, segundo y tercer EPSP en el rango de estimulación de 4225-5000 mV y el GMPc extracelular normaliza estas alteraciones.

En el tercer rango de estimulación, detectamos tres EPSPs. Respecto al primer EPSP, la hiperamonemia disminuye la amplitud ($F = 4,726$; $p < 0,05$), la cual se normaliza con el tratamiento con GMPc extracelular ($p < 0,05$) (Figura 22U). El GMPc extracelular en los cortes de ratas control retrasa la aparición del primer EPSP ($F = 5,693$; $p < 0,05$) y aumenta la anchura ($F = 5,420$; $p < 0,05$), el área ($F = 3,35$; $p < 0,05$) y la τ_2 ($F = 4,913$; $p < 0,05$), mientras que disminuye la τ_1 ($F = 2,834$; $p < 0,05$), pero no afecta a la amplitud del primer EPSP (Figura 23 S-X).

Por otro lado, el GMPc extracelular elimina el segundo EPSP en los cortes de ratas control (Figura 23 Y-AD). La hiperamonemia disminuye la amplitud de este segundo EPSP ($F = 4,695$; $p < 0,05$) y el GMPc extracelular lo normaliza ($p < 0,05$) (Figura 23 AA). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las otras variables.

En el caso del tercer EPSP, el GMPc extracelular también elimina su aparición en el grupo control (Figura 22 AD-AI). La hiperamonemia hace que este EPSP aparezca antes en el tiempo ($F = 4,978$; $p < 0,05$) (Figura 23 AD) y disminuye su amplitud ($F = 5,55$; $p < 0,05$) y su área ($F = 5,109$; $p < 0,05$) (Figura 23 AF-AG). El cGMP extracelular parece revertir estas alteraciones en condiciones de hiperamonemia, sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas.

1.2. Efectos de la hiperamonemia y el GMPC extracelular sobre la función de los receptores NMDA

1.2.1. Estudio de las curvas Input-Output de receptores NMDA en función de la intensidad de estimulación

En la tabla 7 se recogen todas las medias y desviaciones medias de cada grupo para las variables estudiadas.

La hiperamonemia produce una mayor respuesta sináptica mediada por receptores NMDA respecto al grupo control basal, lo que se traduce en una mayor amplitud de los EPSPs (Figura 24 A y Tabla 7, $F = 1249$; $p < 0,0001$) y el GMPc extracelular normaliza la amplitud en ratas hiperamonémicas hasta valores similares a los de las ratas control. En las ratas control, el GMPc extracelular disminuyó la amplitud de la respuesta NMDA ($F = 443,3$; $p < 0,0001$).

A diferencia de lo que ocurría con el componente positivo de la curva AMPA (área de hiperpolarización), en el caso de los receptores NMDA, la hiperamonemia aumenta significativamente el componente positivo de la curva I/O ($F = 517,0$; $p < 0,01$) (Figura 24B). Este aumento se detecta tanto si comparamos A_{\max} ($F = 5,516$; $p < 0,05$) como S_{50} ($F = 6,146$; $p < 0,01$), pero no k ($F = 2,774$; $p > 0,05$). El cGMP extracelular en cortes de hipocampo procedentes de ratas hiperamonémicas disminuye el componente positivo hasta valores similares a los del grupo control basal ($F = 56,59$; $p < 0,01$). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el A_{\max} ($F = 4,748$; $p < 0,05$), pero no en S_{50} ($F = 2,29$; $p > 0,05$) o k ($F = 0,483$; $p > 0,05$). En los cortes procedentes de ratas control, el GMPc disminuye el componente positivo de los EPSPs NMDA ($F = 34,64$; $p < 0,01$), encontrando diferencias en el A_{\max} ($F = 20,19$; $p < 0,01$) y S_{50} ($F = 9,178$; $p < 0,01$), pero no en k ($F = 2,837$; $p < 0,01$) (Figura 24B).

Tabla 7. Efectos de la hiperamonemia y del GMPc extracelular sobre los valores de las variables estudiadas de las respuestas mediadas por receptores NMDA.

		Control		Hyperammonemia	
		Basal	GMPc	Basal	GMPc
AMPLITUD	A_{\max} (mV)	0.1921 ± 0.0115	0.0867 ± 0.0037	0.2718 ± 0.0103 **	0.1541 ± 0.0061 aa
	$S_{50} \times 10^3$ (mA)	0.8045 ± 0.1377	0.7246 ± 0.098	0.6917 ± 0.0819	0.6821 ± 0.0894
	K	0.0012 ± 0.0001	0.0014 ± 0.0001	0.0014 ± 0.0001	0.0015 ± 0.0002
COMPONENTE POSITIVO	A_{\max} (mV)	84.68 ± 5.357	56.13 ± 2.693 **	158.7 ± 6.172 *	133.7 ± 6.185 *, a
	$S_{50} \times 10^3$ (mA)	3.628 ± 144.8	3.056 ± 104.9 **	3.053 ± 82.54 *	3.265 ± 99.13
	K	0.001 ± 0.0007	0.0013 ± 0.0001	0.0014 ± 0.0001	0.0013 ± 0.0001
COMPONENTE NEGATIVO	A_{\max} (mV)	8.847 ± 1.154	14.73 ± 0.8468	66.43 ± 6.412 **	70 ± 5.171 aa
	$S_{50} \times 10^3$ (mA)	3.290 ± 328.2	2.551 ± 126 **	3.319 ± 229.4	3.420 ± 158.8
	K	0.001 ± 0.0002	0.018 ± 0.0004 **	0.0011 ± 0.0001	0.0012 ± 0.0001
ÁREA DE DESENSITIZACIÓN	A_{\max} (mV)	74.83 ± 6.575	45.44 ± 4.573 **	90.41 ± 2.736	114.7 ± 5.735 aa
	$S_{50} \times 10^3$ (mA)	4.056 ± 0.1867	3.684 ± 0.2206	2.852 ± 0.2736 **	3.204 ± 0.1066 **, aa
	K	0.0011 ± 0.00008	0.0011 ± 0.0001	0.0018 ± 0.0002 **	0.0013 ± 0.0001 a
DELAY	$Y_{\text{intercept}}$	25.21 ± 2.4840	15.9 ± 1.59	24.15 ± 2.256	24.5 ± 5.654
	$S \times 10^{-3}$ (mA)	-1.367 ± 0.7459	-0.89 ± 0.04	-1.213 ± 0.66772	-1.845 ± 0.7969

El ajuste de los valores de las curvas I/O NMDA a curvas sigmoidales, como aproximación para representar la respuesta mediada por receptores NMDA, nos dio tres parámetros característicos: la amplitud máxima (A_{\max}), la intensidad de estimulación a la cual se alcanza la respuesta media (S_{50}) y la pendiente en torno al punto de inflexión (k). En todos los casos, los valores de R^2 fueron $> 0,9$, demostrando así la bondad del ajuste. En el caso del *delay*, se realizó un ajuste a una regresión lineal, lo que aporta dos parámetros característicos: donde la línea cruza el eje Y ($Y_{\text{intercepción}}$) y la pendiente (S). Los valores significativamente diferentes de los de las ratas de control y de los de ratas HA se indican con asteriscos y a, respectivamente. [$*p < 0,05$, $**p < 0,01$, a $p < 0,05$, aa $p < 0,01$].

En cuanto al componente negativo de la curva de NMDA (área de despolarización), la hiperamonemia lo aumentó significativamente respecto al grupo control ($F = 560,3$; $p < 0,01$) (Figura 24 C). No se encontraron diferencias entre el grupo hiperamonemia basal e hiperamonemia con GMPc extracelular. El GMPc extracelular en los cortes de hipocampo procedentes de ratas control aumenta el componente negativo de la curva NMDA ($F = 34,64$; $p < 0,01$) (Figura 24 C, Tabla 7).

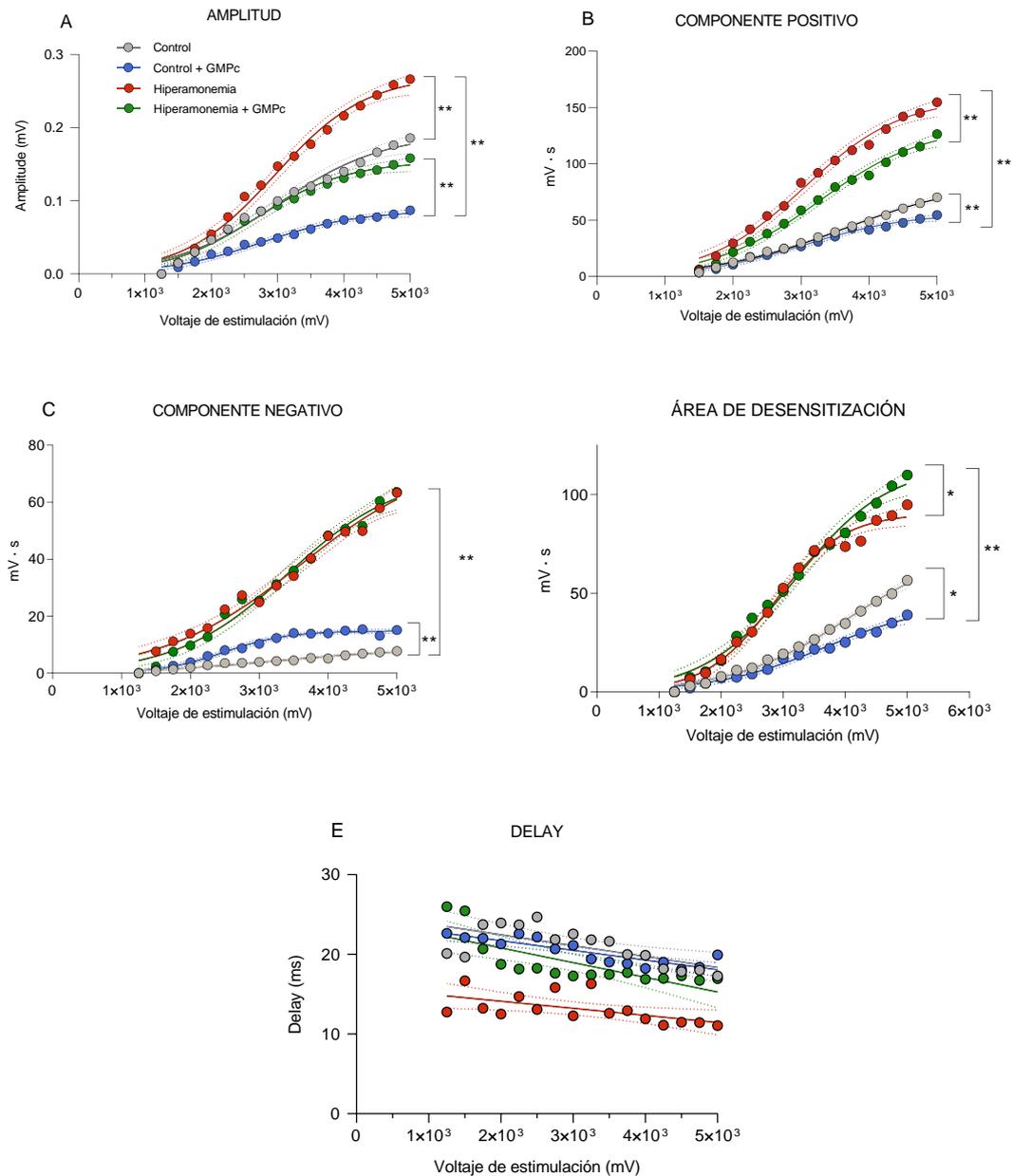


Figura 24. Efectos de la hiperamonemia y el GMPc extracelular sobre la amplitud (A), el componente positivo (B), el componente negativo (C), el área de desensitización (D) y el delay (E) de las curvas I/O mediadas por receptores NMDA. Los valores son las medias de 16-20 cortes por grupo a intensidades de estimulación crecientes. Los datos se analizaron mediante un ajuste de regresión no lineal. Los valores significativamente diferentes se indican con asteriscos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Por otro lado, la hiperamonemia aumentó significativamente el área de desensitización de la curva I/O NMDA ($F = 309,6$; $p < 0,01$) debido a los cambios en S_{50} ($F = 40,37$; $p < 0,01$) y k ($F = 11,9$; $p < 0,01$), pero no en A_{max} ($F = 0,832$, $p < 0,01$) y el GMPc extracelular lo aumentó todavía más en condiciones de hiperamonemia ($F = 7,671$; $p < 0,01$): A_{max} ($F = 16,34$; $p > 0,01$), S_{50} ($F = 8,239$; $p < 0,01$) y k ($F = 4,884$; $p < 0,01$) (Figura 24 D). El GMPc extracelular en cortes de hipocampo de ratas control disminuye el área de desensitización ($F = 76,22$; $p < 0,01$),

encontrando diferencias estadísticamente significativas si comparamos A_{\max} ($F = 7,818; p > 0,01$), pero no si comparamos S_{50} ($F = 0,9188; p < 0,01$) y k ($F = 0,1235; p < 0,01$) (Figura 24 D). Ni la hiperamonemia ni el GMPc extracelular tienen ningún efecto sobre el *delay* de la respuesta mediada por los receptores NMDA (Figura 24 E).

1.2.2. Estudio de los EPSPs de las curvas I/O mediadas por receptores NMDA por rangos de estimulación

En el caso de las respuestas NMDA también evaluamos la presencia de EPSPs en los potenciales evocados promedio de cada uno de estos rangos de estimulación: 1250-2500 mV (primer rango), 2750-4000 mV (segundo rango), 4250-5000 mV (tercer rango) y observamos que aparecen más de un EPSPs tanto en el segundo como en el tercer rango de intensidad de estimulación (Figura 22 B).

Ni la hiperamonemia ni el GMPc extracelular tienen ningún efecto sobre las variables estudiadas del primer EPSP en el primer rango de estimulación (1250-2500 mV).

En el primer rango de estimulación, en el caso de los receptores NMDA, sólo detectamos un EPSP. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos (Figura 25 A-F). La tabla 8 contiene los valores del estadístico, la media y la SEM de todas las variables estudiadas.

La hiperamonemia altera la posición temporal, la amplitud, la anchura, τ_2 y el área del primer EPSP en el segundo rango de estimulación (2750-4000 mV). El GMPc extracelular normaliza estas alteraciones.

En el segundo rango de estimulación detectamos hasta cuatro EPSPs. La hiperamonemia retrasa la aparición del primer EPSP ($F = 6,241; p < 0,05$) y aumenta su amplitud ($F = 6,526; p < 0,05$), anchura ($F = 7,419; p < 0,05$) y τ_2 ($F = 4,669; p < 0,05$). El GMPc extracelular normaliza estas alteraciones producidas por la hiperamonemia ($p < 0,05$) (Figura 25 G-I, L). El GMPc en los cortes de hipocampo de ratas control retrasa la aparición del primer EPSP, aumenta la anchura, la amplitud y τ_2 ($p < 0,05$) (Figura 25 G-H, K-L).

Por otro lado, el GMPc extracelular elimina el segundo EPSP en los cortes de ratas control. La hiperamonemia no tiene ningún efecto sobre las variables estudiadas en el caso de los otros tres EPSP secundarios.

La hiperamonemia altera la posición temporal, la amplitud, la anchura y la τ_2 del primer EPSP en el tercer rango de estimulación (4225-5000 mV). El GMPc extracelular normaliza estas alteraciones.

En el tercer rango de estimulación, de 4225 mV a 5000 mV, detectamos cuatro EPSPs. La hiperamonemia retrasa la aparición del primer EPSP ($F=10,34$; $p < 0,001$), aumenta la anchura ($F = 11,92$; $p < 0,001$), la amplitud ($F = 5,982$; $p < 0,05$), τ_2 ($F = 8,61$; $p < 0,05$) y el área ($F = 5,429$; $p < 0,05$) (Figura 25 M-P, R; Tabla 8). El GMPc extracelular revierte las alteraciones en la anchura ($p < 0,001$), la amplitud ($p < 0,05$), τ_2 ($p < 0,05$) y el área ($F = 6,241$; $p < 0,05$) y hace que el primer EPSP aparezca antes en el tiempo. El GMPc extracelular en los cortes procedentes de ratas control retrasa la aparición de este EPSP ($F = 2,07$; $p < 0,05$) y aumenta la anchura ($F = 5,429$; $p < 0,05$) y τ_2 ($F = 8,61$; $p < 0,05$) (Figura 25 M, N, R; Tabla 8).

Al igual que en el caso anterior, el GMPc extracelular en los cortes procedentes de ratas control impide que se generen el segundo y el tercer EPSP. No se encontraron diferencias en ninguna de las variables estudiadas entre los grupos en el caso del segundo, tercer y cuarto EPSP.

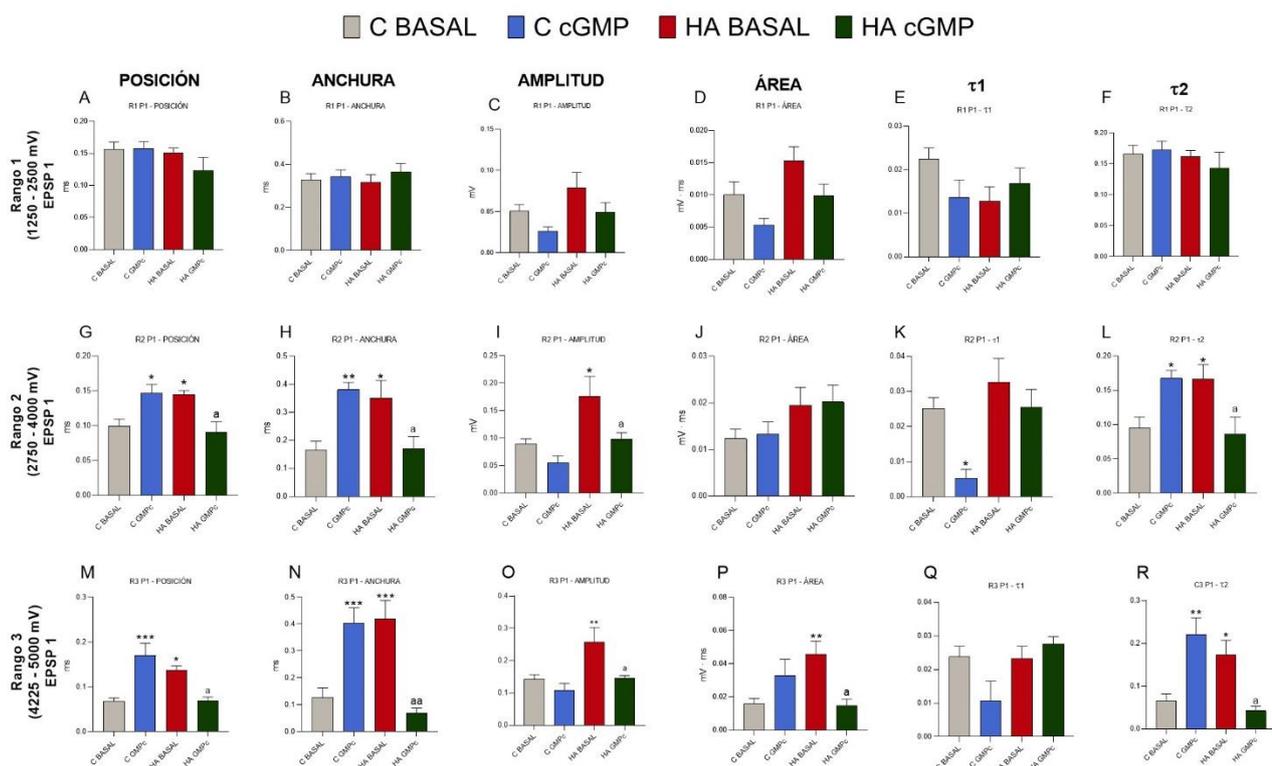


Figura 25. Efectos de la hiperamonemia y del GMPc extracelular sobre los valores de los parámetros analizados en los EPSPs NMDA. R=rango de estimulación; P=EPSP. Rango 1: 1250-2500 mV; Rango 2: 2750-4000 mV; Rango 3: 4225-5000 mV. En aquellos casos en los que los datos siguen una distribución normal el análisis estadístico se llevó a cabo con un test paramétrico, ANOVA, mientras que en aquellos casos en los que los datos no seguían una distribución normal se realizó un test Kruskal-Wallis. Los valores estadísticamente significativos respecto al grupo control están representados con un asterisco (*): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Los valores estadísticamente significativos respecto al grupo hiperamonemia están representados con una a: $a < 0,05$.

Tabla 8. Efecto de la hiperamonemia y del GMPc extracelular sobre los parámetros estudiados a diferentes intensidades de estimulación en los EPSPs mediados por receptores NMDA. Para cada variable se muestra el valor del estadístico (F) y la Media \pm SEM de cada grupo.

	VARIABLE	F	MEDIA \pm SEM			
			CONTROL		HIPERAMONEMIA	
			BASAL	GMPc	BASAL	GMPc
RANGO 1 (1250-2500 mV) EPSP 1 GAUSIANA	POSICIÓN	1,305	0,1564 \pm 0.0114	0,1576 \pm 0.0104	0,151 \pm 0.0073	0,1231 \pm 0.0206
	AMPLITUD	3,186	0,0488 \pm 0.0078	0,0258 \pm 0.0052	0,0789 \pm 0.0196	0,4215 \pm 0.0105
	ANCHURA	0,3248	0,3301 \pm 0.028	0,3436 \pm 0.0317	0,3168 \pm 0.0364	0,3667 \pm 0.0391
RANGO 1 (1250-2500 mV) EPSP 1 EXPONENCIA L	ÁREA	2,755	0,0107 \pm 0.002	0,0053 \pm 0.001	0,0143 \pm 0.0022	0,011 \pm 0.0019
	τ_1	2,075	0,0224 \pm 0.0026	0,0136 \pm 0.0041	0,0128 \pm 0.0032	0,0168 \pm 0.0036
	AMPLITUD	2,994	0,0506 \pm 0.008	0,0265 \pm 0.0051	0,0787 \pm 0.0187	0,0495 \pm 0.0116
RANGO 2 (2750-4000 mV) EPSP 1 GAUSIANA	τ_2	0,4854	0,1657 \pm 0.014	0,1720 \pm 0.0144	0,1612 \pm 0.0102	0,1427 \pm 0.0256
	ÁREA	3,537	0,0101 \pm 0.002	0,0053 \pm 0.0010	0,0153 \pm 0.0022	0,0099 \pm 0.0018
	POSICIÓN	6,241	0,0992 \pm 0.0107	0,1472 \pm 0.0124 *	0,145 \pm 0.0055 *	0,0904 \pm 0.0155 a
RANGO 2 (2750-4000 mV) EPSP 1 GAUSIANA	AMPLITUD	4,951	0,1075 \pm 0.0162	0,0512 \pm 0.0123	0,1420 \pm 0.081 *	0,0982 \pm 0.0111 a
	ANCHURA	7,419	0,1646 \pm 0.0328	0,3811 \pm 0.0264 **	0,2509 \pm 0.0636 *	0,1706 \pm 0.0434 a
	ÁREA	5,638	0,0123 \pm 0.0021	0,0159 \pm 0.0029	0,0294 \pm 0.005	0,0147 \pm 0.0032
RANGO 2 (2750-4000 mV) EPSP 1 EXPONENCIA L	τ_1	4,413	0,0252 \pm 0.0030	0,0009 \pm 0.0025 *	0,0106 \pm 0.0067	0,0254 \pm 0.0052
	AMPLITUD	6,526	0,0891 \pm 0.01	0,0548 \pm 0.013	0,1766 \pm 0.0355 *	0,0986 \pm 0.011 a
	τ_2	4,669	0,0951 \pm 0.016	0,1674 \pm 0.0113 *	0,1663 \pm 0.0208 *	0,1002 \pm 0.0259 a
RANGO 2 (2750-4000 mV) EPSP 2 GAUSIANA	ÁREA	1,848	0,0123 \pm 0.0021	0,0133 \pm 0.0026	0,0195 \pm 0.0038	0,0202 \pm 0.0036
	POSICIÓN	2,32	0,151 \pm 0.010		0,2112 \pm 0.046	0,1324 \pm 0.2
	AMPLITUD	0,0646	0,1624 \pm 0.034		0,147 \pm 0.0219	0,1671 \pm 0.0431
RANGO 2 (2750-4000 mV) EPSP 2 EXPONENCIA L	ANCHURA	1,507	0,1983 \pm 0.0371		0,0923 \pm 0.0223	0,1549 \pm 0.034
	ÁREA	1,362	0,0148 \pm 0.0025		0,0167 \pm 0.0041	0,0237 \pm 0.0062
	τ_1	0,94	0,0841 \pm 0.0073		0,0904 \pm 0.0063	0,0701 \pm 0.0139
RANGO 2 (2750-4000 mV) EPSP 2 EXPONENCIA L	AMPLITUD	0,0826	0,1622 \pm 0.034		0,1443 \pm 0.0212	0,1664 \pm 0.0424
	τ_2	0,0696	0,0899 \pm 0.0165		0,0809 \pm 0.0249	0,0929 \pm 0.0226
	ÁREA	0,0137	0,0169 \pm 0.0026		0,0167 \pm 0.0041	0,0177 \pm 0.006
RANGO 3 (4225-5000 mV) EPSP 1 GAUSIANA	POSICIÓN	10,34	0,0674 \pm 0.0075	0,17 \pm 0.0273 ***	0,1374 \pm 0.0094 *	0,069 \pm 0.008 a
	AMPLITUD	8,205	0,1321 \pm 0.0126	0,1019 \pm 0.0203	0,2030 \pm 0.0140 **	0,1336 \pm 0.0089 a
	ANCHURA	11,92	0,126 \pm 0.0372	0,405 \pm 0.0558 ***	0,4188 \pm 0.0692 ***	0,0703 \pm 0.0172 aa
RANGO 3 (4225-5000 mV) EPSP 1 EXPONENCIA L	ÁREA	8,535	0,123 \pm 0.0028	0,0408 \pm 0.0115	0,046 \pm 0.0073 **	0,0148 \pm 0.004 a
	τ_1	2,441	0,0238 \pm 0.0031	0,0108 \pm 0.0057	0,0233 \pm 0.0036	0,0277 \pm 0.0021
	AMPLITUD	5,982	0,142 \pm 0.015	0,1074 \pm 0.0221	0,258 \pm 0.0447 **	0,1462 \pm 0.0075 a
RANGO 3 (4225-5000 mV) EPSP 2 EXPONENCIA L	τ_2	8,61	0,0663 \pm 0.0156	0,2209 \pm 0.015 **	0,1726 \pm 0.0345 *	0,0427 \pm 0.0104 a
	ÁREA	5,429	0,0157 \pm 0.0033	0,0327 \pm 0.01	0,0456 \pm 0.008	0,0147 \pm 0.0040
	POSICIÓN	2,070	0,1418 \pm 0.0034		0,1844 \pm 0.032	0,1644 \pm 0.0204
RANGO 3 (4225-5000 mV) EPSP 2 GAUSIANA	AMPLITUD	0,8105	0,2975 \pm 0.0565		0,1845 \pm 0.0337	0,3449 \pm 0.0866
	ANCHURA	1,544	0,1002 \pm 0.01		0,1017 \pm 0.0147	0,1407 \pm 0.03
	ÁREA	4,609	0,0094 \pm 0.0009		0,0223 \pm 0.0073	0,0168 \pm 0.0034
RANGO 3 (4225-5000 mV) EPSP 2 EXPONENCIA L	τ_1	5,069	0,0935 \pm 0.0055		0,1357 \pm 0.0235	0,0823 \pm 0.0104
	AMPLITUD	0,1261	0,1872 \pm 0.0259		0,1839 \pm 0.0332	0,1685 \pm 0.0101
	τ_2	0,0928	0,0562 \pm 0.0057		0,0616 \pm 0.0079	0,0613 \pm 0.0187
RANGO 3 (4225-5000 mV) EPSP 3 GAUSIANA	ÁREA	4,96	0,0094 \pm 0.0009		0,0223 \pm 0.0073	0,0144 \pm 0.0029
	POSICIÓN	2,684	0,2344 \pm 0.0104		0,2982 \pm 0.0377	0,2307 \pm 0.0287
	AMPLITUD	0,4759	0,3163 \pm 0.0651		0,2162 \pm 0.0405	0,0365 \pm 0.1226
RANGO 3 (4225-5000 mV) EPSP 3 EXPONENCIA L	ANCHURA	1,086	0,1232 \pm 0.0103		0,1593 \pm 0.0082	0,1258 \pm 0.0376
	ÁREA	1,472	0,0194 \pm 0.0028		0,0282 \pm 0.0094	0,0294 \pm 0.0048
	τ_1	0,5926	0,1751 \pm 0.0144		0,2083 \pm 0.0243	0,1948 \pm 0.0343
RANGO 3 (4225-5000 mV) EPSP 3 EXPONENCIA L	AMPLITUD	0,9882	0,3161 \pm 0.0651		0,2166 \pm 0.0411	0,4242 \pm 0.1124
	τ_2	0,0498	0,0943 \pm 0.0161		0,0945 \pm 0.0093	0,0918 \pm 0.0203
	ÁREA	3,778	0,0175 \pm 0.0023		0,021 \pm 0.0086	0,034 \pm 0.0018

El ajuste de los valores medios de los EPSP mediados por receptores NMDA a curvas gaussianas y exponenciales aportó cuatro parámetros característicos en el caso de la curva gaussiana: posición temporal (tiempo en el que se alcanza la máxima amplitud), amplitud del EPSP, anchura del EPSP y área del EPSP. En el caso de los ajustes a una curva exponencial, tenemos cuatro parámetros característicos: τ_1 (velocidad de crecimiento), amplitud del EPSP, τ_2 (velocidad de caída), y área del EPSP. Tanto en los ajustes a curvas gaussianas como exponenciales, los valores de R^2 fueron $> 0,9$, demostrando así la bondad del ajuste. En el caso del delay, el ajuste se realizó a una regresión lineal, lo que aporta dos parámetros característicos: punto en el que la línea cruza el eje Y ($Y_{intercepción}$) y la pendiente (S). Los valores significativamente diferentes de los del grupo control basal y del grupo HA basal se indican con asteriscos y a, respectivamente. [* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, a $p < 0,05$, aa $p < 0,01$].

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este primer capítulo proporcionan información relevante acerca de cómo la hiperamonemia crónica altera las respuestas sinápticas mediadas por los receptores AMPA y NMDA en el hipocampo, así como acerca del efecto del GMPc extracelular sobre dichas respuestas tanto en ratas control como hiperamonémicas.

Estudios anteriores han demostrado que los niveles de GMPc extracelular están disminuidos en el cerebro de ratas hiperamonémicas y que el aumento del GMPc extracelular mediante administración intracerebral por medio de minibombas osmóticas es capaz de restaurar el aprendizaje espacial. Esta restauración de la capacidad de aprendizaje espacial está mediada por la normalización de la expresión en membrana de diferentes subunidades del receptor AMPA en hipocampo (Cabrera-Pastor, 2016a). Además, el GMPc extracelular también reduce la neuroinflamación.

Los mecanismos moleculares y las vías de transducción asociadas, por los que el GMPc extracelular reduce la neuroinflamación y normaliza la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA han sido descritos (Taoro-González, 2018). Sin embargo, hasta el momento, se desconocía cómo la hiperamonemia crónica y el GMPc extracelular modulan la función de los receptores AMPA y NMDA.

Los resultados presentados en el primer capítulo de la presente tesis doctoral muestran que la hiperamonemia crónica induce una disminución de la amplitud y el *delay* en la respuesta postsináptica mediada por los receptores AMPA. El GMPc extracelular normaliza la amplitud de los EPSPs mediados por receptores AMPA, pero no el *delay*, a la vez que aumenta el componente negativo de las curvas I/O.

La modulación de la expresión en membrana de los receptores AMPA juega un papel fundamental en la plasticidad sináptica en el hipocampo (Anggono y Hugarir, 2012) y en la potenciación a largo plazo (LTP) (Malinow, 2003). Se ha demostrado que en animales con hiperamonemia crónica se producen alteraciones de la LTP en hipocampo (Muñoz et al., 2000) y, como consecuencia, en el aprendizaje y la memoria espacial (Hernández-Rabaza et al., 2016). En conjunto, estos datos apoyan la idea de que en ratas hiperamonémicas, la alteración de la expresión en membrana de las subunidades del receptor AMPA conduce a una disminución de la amplitud y del *delay* de la respuesta postsináptica mediada por este tipo de receptores en hipocampo, lo que llevaría en última instancia, al deterioro de la LTP y del aprendizaje y la memoria espacial. El GMPc extracelular normalizaría la amplitud de la respuesta postsináptica de los receptores AMPA al aumentar la componente negativo de la curva de I/O. Una explicación

plausible de por qué el GMPc normalizaría la amplitud sería la normalización de la expresión en membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA (Taoro-Gonzalez et al., 2018).

La exocitosis de los receptores AMPA a la membrana plasmática es un mecanismo clave en la modulación de la fuerza de la transmisión sináptica. En las neuronas principales del hipocampo, predominan los receptores AMPA que contienen GluA2 (GluA1/2 o GluA2/3) y sólo una pequeña subpoblación de receptores AMPA es homomérica para GluA1 (Sheng et al., 1994; Wenthold et al., 1996). Los receptores AMPA que contienen GluA2 son permeables al Na^+ , pero impermeables al calcio, lo que hace que estos canales tengan una relación corriente-voltaje lineal. Por el contrario, los receptores GluA1-homoméricos tienen una mayor permeabilidad al calcio, una mayor conductancia del canal y una relación I-V rectificadora (Isaac et al., 2007; Coombs y Cull-Candy, 2009). Estos receptores homoméricos GluA1 están presentes en las reservas intracelulares de receptores AMPA en las neuronas de CA1 en condiciones basales y pueden translocarse rápidamente a las sinapsis en determinadas condiciones fisiológicas y patológicas. Los receptores AMPA GluA1-homoméricos juegan un papel crítico en la mediación de varias formas de plasticidad sináptica, particularmente en el hipocampo, incluyendo la LTP, la LTD y el escalamiento sináptico homeostático (Thiagarajan et al., 2005; Sutton et al., 2006; Sanderson et al., 2016). Se ha demostrado que tanto la estimulación química para producir LTP, como la estimulación tetánica conducen a un agrandamiento estructural de las cabezas de las espinas dendríticas y al reclutamiento de receptores AMPA permeables al Ca^{2+} , con exocitosis de GluA1, un componente clave de la respuesta AMPA, la LTP y la memoria y el aprendizaje (Kopec et al., 2007; Fortin et al., 2010; Chater y Goda et al., 2014). La inserción en la membrana de GluA1 es necesaria para aumentar el tamaño de las espinas, tanto en cultivos de rodajas de hipocampo como in vivo (Kopec et al., 2007). De hecho, la sobreexpresión de GluA1 aumenta el área de la cabeza de la espina dendrítica, la amplitud de los EPSC y la expresión sináptica de los receptores AMPA permeables al Ca^{2+} (Fortin et al., 2010). La inserción sináptica de GluA1 tiene dos funciones: el aumento de la fuerza sináptica a través de su canal iónico, y un papel estructural a través de la estabilización de su extremo C que permite un aumento del tamaño de la espina. El extremo C terminal de la subunidad GluA1 presenta un sitio de acoplamiento específico para un complejo regulador de la actina, lo que permite el crecimiento de las espinas dendríticas (Kopec et al., 2007).

En hiperamonemia, la expresión en membrana de GluA1 está disminuida, lo que explicaría la reducción de la amplitud y del *delay* de los EPSPs y la reducción de la respuesta sináptica de los receptores AMPA. Por su parte, el GMPc normaliza la expresión en membrana de GluA1 y, como consecuencia, la función de los receptores AMPA. Concretamente, en hiperamonemia Src

fosforila GluN2B en el residuo Ser1303, reduciendo la expresión en membrana de CaMKII y, en consecuencia, la fosforilación de GluA1 en el residuo Ser831, lo que disminuye su expresión en membrana. El GMPc extracelular en el grupo control reduce la amplitud de las curvas de I/O mediadas por receptores AMPA y, al mismo tiempo, aumenta el componente negativo (área de despolarización). Se ha descrito que el GMPc produce una disminución de los EPSPs AMPA al modificar la cinética de la respuesta de estos receptores en las neuronas del hipocampo CA1 de una manera independiente de la fosforilación (Lei et al., 2000). Esto explicaría la disminución de la amplitud producida por el GMPc extracelular en el grupo control

También demostramos que la hiperamonemia crónica aumenta la amplitud de la respuesta postsináptica de los receptores NMDA y el componente negativo y el área de desensitización, de las curvas de I/O en el hipocampo. El GMPc extracelular normaliza la amplitud de la respuesta mediada por receptores NMDA.

El número y la composición de subtipos de los receptores NMDA en las sinapsis determinan sus propiedades funcionales y su papel en el aprendizaje y la memoria. En función de la composición de subunidades de los receptores NMDA, estos receptores tendrán diferentes propiedades biofísicas (Carta et al., 2018). GluN2A y GluN2B son las subunidades predominantes en el hipocampo. Los receptores que contienen GluN2B tienen una cinética de canal más lenta y menores probabilidades de apertura que los que contienen GluN2A. Como la subunidad GluA1 de los receptores AMPA, GluN2A y GluN2B son cruciales en la LTP y LTD y, como consecuencia, en la plasticidad implicada en el comportamiento y la memoria (Liu et al., 2004; Massey et al., 2004). Algunos estudios demuestran que la disminución de la expresión en membrana de GluN2B, como por ejemplo durante el envejecimiento o en determinadas patologías, así como la disminución de la fosforilación de GluN2B deterioran la LTP y el aprendizaje hipocampal o cortical (Clayton et al., 2002; Takehara et al., 2004; Nakazawa et al., 2006; Gardoni et al., 2009). Por el contrario, la sobreexpresión de GluN2B o la hipodegradación de GluN2B mejoran la LTP en hipocampo y el aprendizaje (Tang et al., 1999). Además, los receptores que contienen GluN2B son cruciales para la liberación de glutamato tanto espontánea como dependiente de estimulación en las sinapsis CA3-CA1 del hipocampo. De hecho, los antagonistas de GluN2B, impiden completamente la activación tónica y el aumento de la liberación de glutamato. La sobreexpresión de GluN2B promovería una mayor liberación de glutamato y, por tanto, una mayor respuesta de los receptores NMDA (Prius-Mengual et al., 2018).

En hiperamonemia crónica aumenta la expresión en membrana de las subunidades NMDA (GluN1, GluN2A, GluN2B) en el hipocampo (Cabrera-Pastor 2016a). Este aumento sería un

contribuyente esencial en la potenciación de la respuesta NMDA observada en hiperamonemia en el presente estudio.

La fuerza sináptica está determinada tanto por la probabilidad de liberación del neurotransmisor como por el contenido de neurotransmisor que se libera. Además, la fuerza sináptica está determinada también por la unión de la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) a la subunidad del receptor de glutamato tipo NMDA GluN2B; una subunidad que a su vez es imprescindible en los procesos de aprendizaje y memoria (Barcomb et al., 2016). Se ha demostrado que en condiciones de hiperamonemia hay una disminución de la CAMKII asociada a la membrana y que el GMPc extracelular normaliza la expresión en membrana de CaMKII y de la subunidad GluN2B en el hipocampo de ratas con hiperamonemia (Taoro-González et al., 2018). Esto podría contribuir a la normalización de la amplitud del receptor NMDA por el GMPc extracelular en ratas con hiperamonemia.

Estudios anteriores han demostrado que la amplitud de los EPSPs evocados disminuye por el cloruro amónico de una manera dependiente a la concentración en las neuronas CA1 del hipocampo de rata (Kameyama et al., 2020). En co-cultivos de neuronas y astrocitos de hipocampo, en condiciones de hiperamonemia aguda la actividad de los receptores NMDA aumenta, mientras que la actividad de los receptores AMPA disminuye (Kosenkov et al., 2018). Esto concuerda con nuestros resultados, según los cuales aumentan las respuestas sinápticas mediadas por los receptores NMDA en la región CA1 en condiciones de hiperamonemia crónica, mientras que, las respuestas sinápticas mediadas por receptores AMPA disminuyen.

La activación de los receptores AMPA conduce a la activación de los receptores NMDA (Cabrera-Pastor et al., 2012; Xin et al., 2005; Salonen et al., 2006). La activación de los receptores AMPA permite la entrada de Na^+ . Hay una pequeña proporción de receptores AMPA que son también permeables a Ca^{2+} ; los receptores que carecen de subunidades GluA2. Además, existen receptores AMPA de alta y baja afinidad por el glutamato (Liu et al., 2005, Geieger et al., 1995). En cerebelo se ha demostrado que en ratas hiperamonémicas los receptores AMPA de alta afinidad inducen un leve aumento de calcio, pero un fuerte aumento de Na^+ y esto resulta en una potenciación de la activación de los receptores NMDA debido tanto a la reducción de la inhibición por calcio como a la mayor activación por sodio (Cabrera-Pastor et al., 2012). Estudios previos han demostrado que, en el hipocampo de ratas con hiperamonemia, la expresión de membrana de GluA2 está aumentada (Taoro-González et al., 2018). Estos podrían contribuir a aumentar la entrada de Na^+ a través de AMPA llevando a la despolarización neuronal y contribuyendo al aumento de la respuesta NMDA.

Por otro lado, el estudio de las curvas de I/O de receptores AMPA por intervalos de estimulación, muestran que el aumento de la intensidad de estimulación conduce a EPSPs evocados sucesivos, un fenómeno de sumación temporal de EPSPs. La hiperamonemia disminuye la amplitud como en el análisis anterior, pero las diferencias sólo son estadísticamente significativas a partir del segundo rango de estimulación, es decir, a intensidades de estimulación superiores a 2750 mV. El GMPc extracelular normaliza esta alteración en la amplitud. Además, la hiperamonemia también disminuye la amplitud del segundo pico que aparece en el segundo rango de estimulación (2750-4000 mV) y en el tercer rango de estimulación, así como, la amplitud del tercer EPSP en el tercer rango de estimulación (4250-5000 mV). Estos resultados sugieren que las alteraciones de la función del receptor AMPA se acentúan a medida que la intensidad de estimulación aumenta y persiste en el tiempo y con la generación de sucesivos potenciales. En hiperamonemia el contenido de GluA1 en la membrana está disminuido (Taoro-González et al., 2018) y, como se ha comentado anteriormente, los receptores AMPA que contienen GluA1 son reclutados a la membrana sináptica a medida que aumenta la estimulación y tienen mayor permeabilidad al Ca^{2+} . La disminución de la expresión en membrana de GluA1 podría estar alterando la respuesta AMPA, especialmente la amplitud de los EPSPs y, en consecuencia, también la excitotoxicidad inducida por la estimulación de receptores que contienen GluA1 a la sinapsis.

Un resultado interesante es el efecto del GMPc sobre los receptores AMPA en el grupo control. El GMPc retrasa la aparición del primer pico en todas las intensidades de estimulación, lo que demuestra que el GMPc extracelular induce una respuesta más lenta en las neuronas de CA1 que, además, responden más tarde en el tiempo. Pero, al mismo tiempo, el GMPc en los cortes de ratas control tiende a disminuir la amplitud y τ_1 y a aumentar la anchura del EPSP y τ_2 , lo que sugiere que disminuye la respuesta y la velocidad a la que se alcanza la amplitud máxima, lo que aumentaría la anchura del potencial. Al mismo tiempo el GMPc extracelular en el grupo control también aumenta la velocidad de retorno al potencial de reposo. Esto cuadra con los resultados del primer análisis en el que el GMPc extracelular disminuye la amplitud de la respuesta AMPA al mismo tiempo que aumenta el componente negativo. El aumento de la anchura y de τ_1 conducen a un aumento del área del potencial despolarizante (componente negativo). Otro hallazgo interesante es que el GMPc en los cortes de ratas control suprime la aparición del segundo y tercer EPSP. En ratas control el GMPc extracelular no altera la expresión de la membrana de las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA (Taoro-González et al., 2018). Se ha descrito que el GMPc puede interactuar directamente con los canales del receptor AMPA alterando su respuesta. El GMPc altera la cinética de las corrientes mediadas por los receptores AMPA. Lei et al. (2000) demostraron que el GMPc disminuye el pico de corriente al disminuir la amplitud de los EPSPs de AMPA y que el GMPc deprime la transmisión sináptica excitatoria en las neuronas de CA1 del hipocampo a través de una inhibición de los receptores AMPA

independiente de la fosforilación. Este fenómeno, junto con la ralentización de la respuesta mediada por el GMPc extracelular, podría contribuir a la eliminación de EPSPs secundarios en ratas control por GMPc extracelular.

En cuanto a los resultados obtenidos del estudio de las curvas de I/O de receptores NMDA por intensidades de estimulación, las distintas variables mostraron diferencias significativas entre el grupo control y el de ratas hiperamonemia en todos los rangos de estimulación. La hiperamonemia retrasa la respuesta de los receptores NMDA, ya que el primero de los EPSPs en los tres rangos de estimulación aparece más tarde (posición temporal). Además, la hiperamonemia aumenta la amplitud, la anchura y la τ_2 del primer EPSP en los tres rangos de estimulación y el GMPc extracelular normaliza todas estas variables: amplitud, anchura, τ_2 y posición temporal. El retraso en la respuesta puede deberse a una menor respuesta del receptor AMPA. La activación del NMDA requiere una despolarización que libere el Mg^{2+} que bloquea su canal y esto requiere la activación previa de los receptores AMPA. La hiperamonemia disminuye la respuesta postsináptica de los receptores AMPA, lo que puede retrasar la activación de los receptores NMDA. El aumento de la amplitud y la anchura es coherente con los resultados obtenidos en el primer análisis, y puede ser el resultado del aumento de la expresión en membrana de las subunidades del receptor NMDA (GluN1, GluN2A y GluN2B) en hiperamonemia. En cuanto al retorno al potencial de reposo, varios estudios demuestran que un aumento de la subunidad GluN2B genera EPSCs con una cinética de decaimiento lenta (Tovar y Westbrook 1999; Vicini et al. 1998). Esto podría explicar el aumento de τ_2 y de la anchura. El GMPc extracelular podría estar revirtiendo las alteraciones de amplitud, anchura y τ_2 al normalizar la expresión de membrana de la subunidad del receptor GluN2B y GluN2A, como se ha demostrado previamente (Taoro-González et al. 2019a).

El GMPc extracelular en rodajas de ratas control retrasa la aparición del primer EPSP mediado por receptores NMDA, pero en este caso, solo encontramos diferencias significativas a partir del segundo rango de estimulación, no en el primer rango de estimulación, en el que las intensidades son más bajas. El GMPc extracelular aumenta la anchura y el τ_2 , lo que significa que hay una aceleración del retorno al estado de reposo, posiblemente debido al aumento de la expresión en membrana de GluN1 producida por el GMPc extracelular en ratas control (Cabrera-Pastor et al., 2016a). Al igual que en el caso de los receptores AMPA, el GMPc extracelular en el grupo control elimina la aparición del segundo EPSP del segundo rango de estimulación y del segundo y tercer EPSP del tercer rango de estimulación, posiblemente debido también a la desaceleración de la respuesta NMDA mediada por el GMPc extracelular.

En resumen, los resultados descritos muestran que la hiperamonemia crónica reduce la función de los receptores AMPA en el hipocampo, reduciendo la amplitud de la respuesta. Por el contrario, la hiperamonemia retrasa la aparición de respuestas NMDA, probablemente debido a la reducción de la activación de los receptores AMPA y aumenta la magnitud de la respuesta de los receptores NMDA aumentando la amplitud y el área de desensitización, lo cual parece estar mediado por el aumento en la expresión en membrana de GluN2A, GluN2B y GluN1. El GMPc extracelular revierte algunas de estas alteraciones, disminuyendo la amplitud y normalizando el momento en el que responden los receptores NMDA, probablemente al normalizar la expresión en membrana de las subunidades GluN2A y GluN2B (Cabrera-Pastor et al., 2016a; Taoro-Gonzalez et al., 2018).

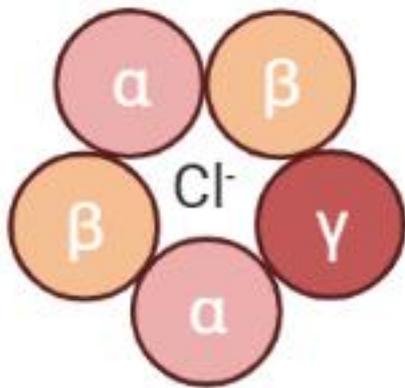
El aumento de la activación de los receptores NMDA es uno de los principales factores que contribuyen a los efectos perjudiciales tanto en la toxicidad aguda por amonio, que provoca la muerte, como en la hiperamonemia crónica moderada, que provoca deterioro cognitivo.

La intoxicación aguda con grandes dosis de amonio conduce a la activación de los receptores NMDA en el cerebro in vivo (Hermenegildo et al., 2000) y a una rápida muerte, que se evita casi por completo en ratas y ratones bloqueando los receptores NMDA con antagonistas selectivos (Marcaida et al., 1992; Hermenegildo et al., 1996). Estos estudios demuestran que, en la intoxicación aguda con grandes dosis de amonio, la muerte está mediada principalmente por un mecanismo excitotóxico similar al que se produce, por ejemplo, en la isquemia cerebral (Felipo et al., 1998), que está mediado por la activación excesiva de los receptores NMDA.

En hiperamonemia crónica, con concentraciones más bajas de amonio, la activación de los receptores NMDA también aumenta (ElMlili et al., 2010), pero no lo suficiente como para inducir la muerte. La hiperamonemia crónica permite que se produzcan mecanismos adaptativos para evitar el daño inducido por la excesiva activación de los receptores NMDA. Estos mecanismos adaptativos incluyen la reducción de la activación del óxido nítrico sintasa en respuesta a la activación de los receptores NMDA. Esto conduce a un deterioro de la función de la vía glutamato-óxido nítrico-cGMP, que a su vez conduce a un deterioro de la función cognitiva (Hermenegildo et al., 1998; Llansola et al., 2007; Monfort et al., 2010).

Los resultados presentados aquí proporcionan las bases para comprender algunos de los mecanismos que subyacen a esta respuesta aumentada de los receptores NMDA en hiperamonemia y a las consecuencias deletéreas asociadas. Además, también mostramos los mecanismos por los que el aumento del GMPc extracelular restablece tanto las respuestas AMPA como NMDA. Esto sugiere la posible utilidad terapéutica de aumentar los niveles de GMPc extracelular en patologías en las que se reduce la activación de los receptores AMPA o se potencia

la de los NMDA. Esto ocurre en muchas enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, así como en hiperamonemia y encefalopatía hepática. Un modo de aumentar los niveles de GMPc extracelular es utilizando inhibidores de la fosfodiesterasa 5, como el sildenafil, que aumentan el GMPc tanto intra- como extracelular (Erceg et al., 2005a).



CAPÍTULO 2: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA HIPERAMONEMIA Y EL GMPc EXTRACELULAR SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA EN HIPOCAMPO DE RATAS HIPERAMONÉMICAS

1.1. Estudio de los efectos de la hiperamonemia y el GMPc extracelular sobre la función de los receptores GABA_A

El objetivo principal de esta parte de la tesis fue caracterizar los efectos de la hiperamonemia y el GMPc extracelular sobre la respuesta del conjunto neuronal CA1 ante su activación. Mediante la aplicación de estímulos postsinápticos despolarizantes, se estudió si la hiperamonemia induce cambios en las respuestas sinápticas mediadas por receptores GABA_A.

Se realizaron registros de potencial de campo en las sinapsis colaterales de Schäffer-CA1 en rodajas de hipocampo. Se calculó la correlación entrada-salida de potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSPs) para medir la eficiencia de la transmisión sináptica mediada por receptores GABA_A.

1.1.1. Estudio de las curvas Input-Output (I/O) de receptores GABA_A en función de la intensidad de estimulación

Como en el caso de las respuestas AMPA y NMDA para los IPSPs mediados por receptores GABA_A también analizamos varios parámetros: componente positivo (área de hiperpolarización), componente negativo (área de despolarización), área de desensitización y delay (Ver apartado 6.2 de Material y Métodos, Figura 19). La figura 26 muestra un potencial mediado por receptores GABA_A tipo con los parámetros estudiados.

La amplitud fue la variable que mejor nos permitió caracterizar la respuesta mediada por los receptores GABA_A. Ajustando los valores medios de las amplitudes obtenidas para cada intensidad de estimulación a curvas sigmoidales, se obtuvieron los siguientes parámetros característicos: la amplitud máxima (A_{max}), la constante k y el valor de voltaje que evocó la respuesta media (S_{50}). Los valores $R^2 > 0,8$, demostrando así la bondad del ajuste.

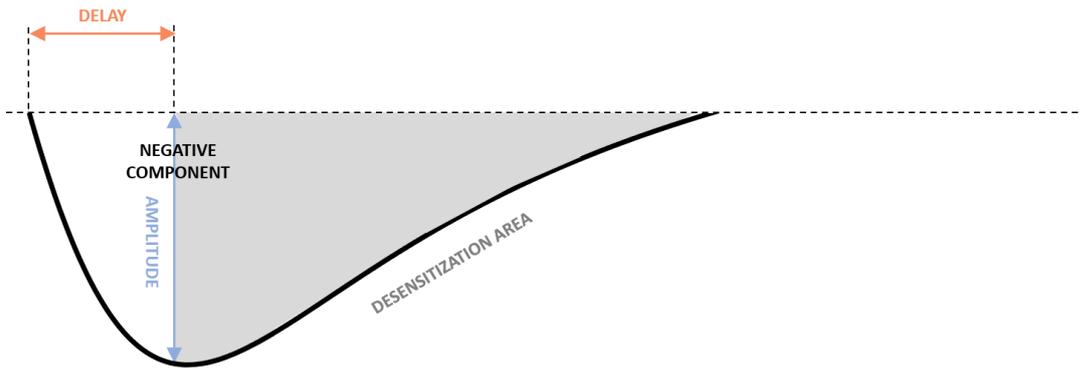


Figura 26. Parámetros analizados de los potenciales postsinápticos inhibitorios mediados por receptores GABA_A. Analizamos diferentes parámetros de los potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSPs). Delay: tiempo (ms) que tarda en alcanzarse la amplitud máxima. Amplitud del potencial postsináptico. Componente negativo: área de despolarización. Área de desensibilización.

La hiperamonemia aumenta la amplitud de las respuestas GABA_A, en comparación con el grupo control ($F = 108,4$; $p < 0,0001$), tanto si comparamos la A_{max} ($F = 12,21$; $p < 0,01$), la S_{50} ($F = 6,03$; $p < 0,01$) o la k ($F = 3,456$; $p < 0,05$) (Figura 27A y Tabla 9). El GMPc extracelular normaliza esta alteración ($F = 151,2$; $p < 0,01$), reduciendo la amplitud hasta valores similares a los encontrados en ratas control ($F = 3,04$; $p > 0,05$).

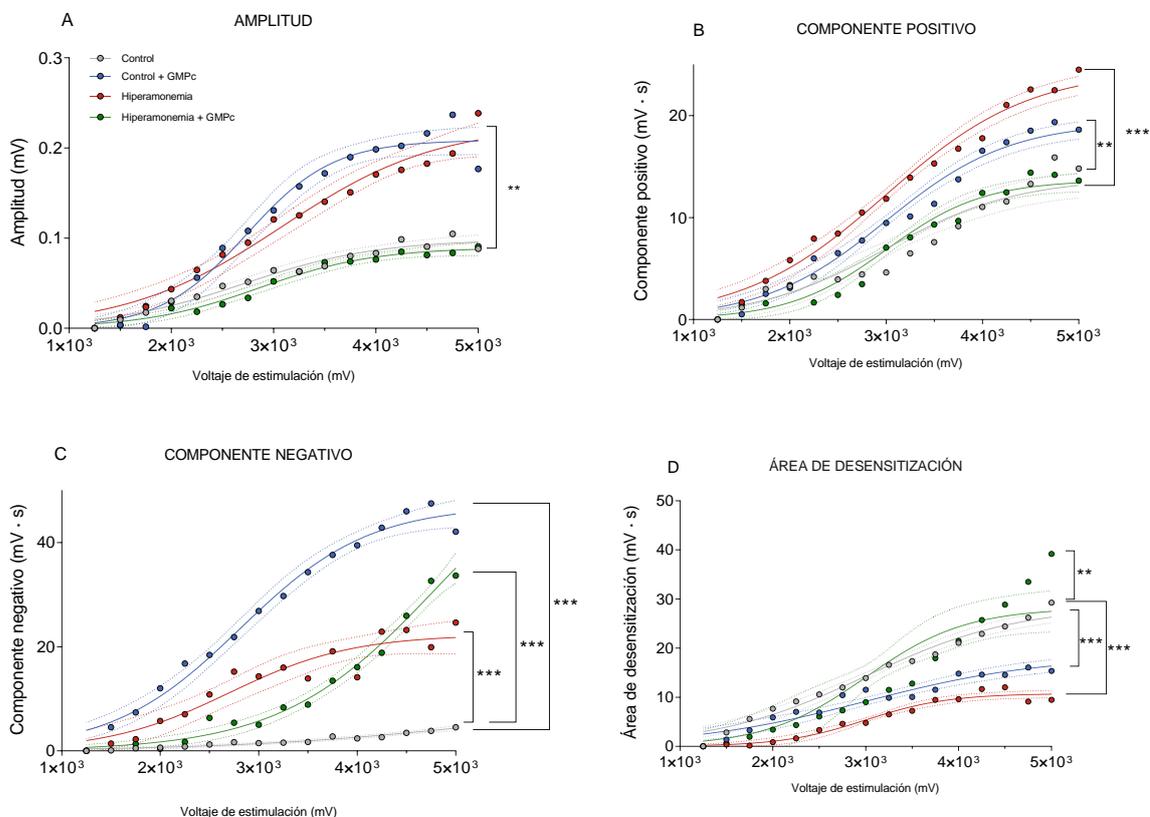


Figura 27. Efecto de la hiperamonemia y el GMPc extracelular sobre la amplitud (A), el componente positivo (B), el componente negativo (C) y el área de desensibilización (D). Los valores son las medias de 10-16 cortes por grupo. Los datos se analizaron mediante ajustes de regresión no lineal. Los valores significativamente diferentes se indican con asteriscos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

El GMPc extracelular en cortes de hipocampo procedentes de ratas control induce un aumento de la amplitud de la respuesta respecto al grupo control basal ($F = 217,6$; $p < 0,01$), hasta valores similares a los observados en los cortes de ratas hiperamonemias ($F = 1,728$; $p > 0,05$) (Figura 27 A, Tabla 9).

Se analizó también el componente positivo, que refleja el área de hiperpolarización. La hiperamonemia produce un aumento del mismo ($F = 135,6$; $p < 0,01$) y el GMPc extracelular normaliza esta alteración, disminuyendo el área de hiperpolarización ($F = 48,9$; $p < 0,0001$) hasta valores similares a los observados en el grupo control. No encontramos diferencias significativas entre el grupo control y el grupo hiperamonemia tratado con GMPc extracelular ($F = 3$; $p > 0,05$) (Figura 27 B, Tabla 9). El GMPc extracelular en el grupo control aumenta el componente positivo respecto al grupo control basal ($F = 41,36$; $p < 0,0001$) (Figura 27 B, Tabla 9).

En cuanto al componente negativo o área de despolarización, la hiperamonemia induce un aumento del mismo respecto al grupo control ($F = 333,1$; $p < 0,0001$) y el GMPc extracelular revierte esta alteración, manteniendo el área en valores similares a los encontrados en hiperamonemia basal, lo que hace que existan diferencias significativas entre el grupo control basal e hiperamonemia GMPc extracelular ($F = 300$; $p < 0,0001$) (Figura 27 D, Tabla 9). El GMPc extracelular en el grupo control induce un aumento del componente negativo respecto al grupo control ($F = 995,5$; $p < 0,01$) (Figura 27 C, Tabla 9).

Tabla 9. Efectos de la hiperamonemia y del GMPc extracelular sobre los valores de las variables estudiadas de las respuestas mediadas por receptores GABA_A

		CONTROL		HYPERAMMONEMIA	
		Sin cGMP	Con cGMP	Sin cGMP	Con cGMP
AMPLITUD	A _{max} (mV)	0,1 ± 0,0051	0,2 ± 0,008	0,23 ± 0,17 **	0,09 ± 0,004 aa
	S ₅₀ x 10 ³ (mA)	2,7 ± 0,1	2,7 ± 0,007	3,1 ± 0,17 **	2,9 ± 0,01 aa
	k	0,002 ± 0,0002	0,002 ± 0,0003	0,001 ± 0,0002 *	0,002 ± 0,0002 a
COMPONENTE NEGATIVO	A _{max} (mV)	9,9 ± 6,8	47 ± 1,8 *	22,3 ± 1,98 *	62,2 ± 17,32 *
	S ₅₀ x 10 ³ (mA)	5,3 ± 1,5	2,8 ± 0,08 *	2,7 ± 0,19 *	4,8 ± 0,43
	k	0,0008 ± 0,0002	0,0015 ± 0,0001	0,0016 ± 0,0004	0,001 ± 0,0002
COMPONENTE POSITIVO	A _{max} (mV)	22,2 ± 4,5	21,1 ± 1,2 **	26,6 ± 1,7 **	15,1 ± 0,9 aa
	S ₅₀ x 10 ³ (mA)	4,2 ± 0,45	3,2 ± 0,12 *	3,2 ± 0,15 *	3,2 ± 0,12 a
	k	0,0014 ± 0,0002	0,0012 ± 0,0001	0,0012 ± 0,0001	0,0017 ± 0,0002
ÁREA DE DESENSITIZACIÓN	A _{max} (mV)	22,8 ± 4,5	21,1 ± 1,2 *	26,6 ± 1,7 **	15,1 ± 0,9 *
	S ₅₀ x 10 ³ (mA)	4,2 ± 0,45	3,2 ± 0,12	3,2 ± 0,15	3,2 ± 0,12
	k	0,001 ± 0,0001	0,0014 ± 0,0002	0,0012 ± 0,0002 *	0,0017 ± 0,0002

El ajuste de los valores de las curvas I/O GABA_A a curvas sigmoidales, como aproximación para representar la respuesta inhibitoria mediada por receptores GABA_A proporciona tres parámetros característicos: la amplitud máxima (A_{max}), la intensidad de estimulación a la cual se alcanza la respuesta media (S₅₀) y la pendiente en torno al punto de inflexión (k). En todos los casos, los valores de R² fueron > 0,9, demostrando la bondad del ajuste. En el caso del delay,

se realizó un ajuste a una regresión lineal, lo que aporta dos parámetros característicos: donde la línea cruza el eje Y ($Y_{intercepción}$) y la pendiente (S). Los valores son la media \pm SEM de 10-15 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de los de las ratas de control y de los de las ratas hiperamonemia se indican con asteriscos y a, respectivamente. [* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, a $p < 0,05$, aa $p < 0,01$].

La hiperamonemia disminuye el área de desensitización ($F = 211,1$; $p < 0,01$) y el GMPc extracelular tiende a aumentarla ($F = 524,7$; $p < 0,01$). Sin embargo, no alcanza valores similares a los del grupo control, encontrando diferencias significativas entre el grupo control e hiperamonemia tratada con GMPc extracelular ($F = 47$; $p > 0,01$). Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en la k ($F = 0,355$; $p > 0,05$) ni en S_{50} ($F = 3,2$; $p > 0,05$), sí se encontraron diferencias en la $A_{m\acute{a}x}$ ($F = 14,58$; $p < 0,05$). El GMPc extracelular en el grupo control disminuye el área de desensitización ($F = 60,61$; $p < 0,0001$).

1.1.2. Estudio de las curvas I-O por rangos de estimulación

Para analizar con mayor profundidad el efecto de la hiperamonemia y el GMPc extracelular sobre los potenciales evocados de los receptores GABA evaluamos las IPSPs de I/O por tramos de intensidades de estimulación. Se realizó un ajuste a curvas gaussianas y exponenciales mediante un script de Matlab que nosotros mismos diseñamos. Los rangos de estimulación estudiados, al igual que en los receptores AMPA y NMDA, fueron los siguientes: 1250-2500 mV (primer rango), 2750-4000 mV (segundo rango), 4250-5000 mV (tercer rango).

La hiperamonemia retrasa la aparición del IPSP en el primer rango de intensidad de estimulación y aumenta la amplitud, el área y la anchura, así como la velocidad de caída y de retorno al estado de reposo. El GMPc extracelular normaliza algunas de estas alteraciones.

En el primer IPSP del primer rango aparecen de uno a dos IPSPs, la hiperamonemia da lugar a un retraso en la generación del IPSP ($F = 4,891$; $p < 0,05$) y el GMPc extracelular revierte esta alteración ($p < 0,05$). Además, la hiperamonemia aumenta la amplitud ($F = 8,49$; $p < 0,05$) y la anchura del primer IPSP del primer rango ($F = 3,929$; $p < 0,05$) respecto al grupo control y el GMPc extracelular revierte el aumento en la amplitud ($p < 0,05$) y, aunque tiende a revertir el aumento de la anchura, las diferencias no llegan a ser significativas (Figura 28 B-C). Además, la hiperamonemia aumenta el área de despolarización ($F = 9,201$; $p < 0,01$) y el GMPc extracelular disminuye este aumento ($p < 0,01$), hasta valores similares a los observados en el grupo control (Figura 28 D). La hiperamonemia también aumenta la velocidad a la que se alcanza la amplitud máxima (τ_1) ($F = 8,704$; $p < 0,05$), así como a la velocidad de retorno al estado de reposo (τ_2), ($F = 10,22$; $p < 0,05$). El GMPc extracelular no revierte el aumento en τ_2 y, aunque tiende a revertir el aumento de τ_1 , las diferencias no son significativas. Aunque el GMPc extracelular en el grupo control tiende a aumentar la anchura, el área, τ_1 y τ_2 , no encontramos diferencias significativas.

Ni la hiperamonemia ni el GMPc extracelular tienen efecto sobre ninguna de las variables estudiadas en el segundo IPSPs en el primer rango de estimulación.

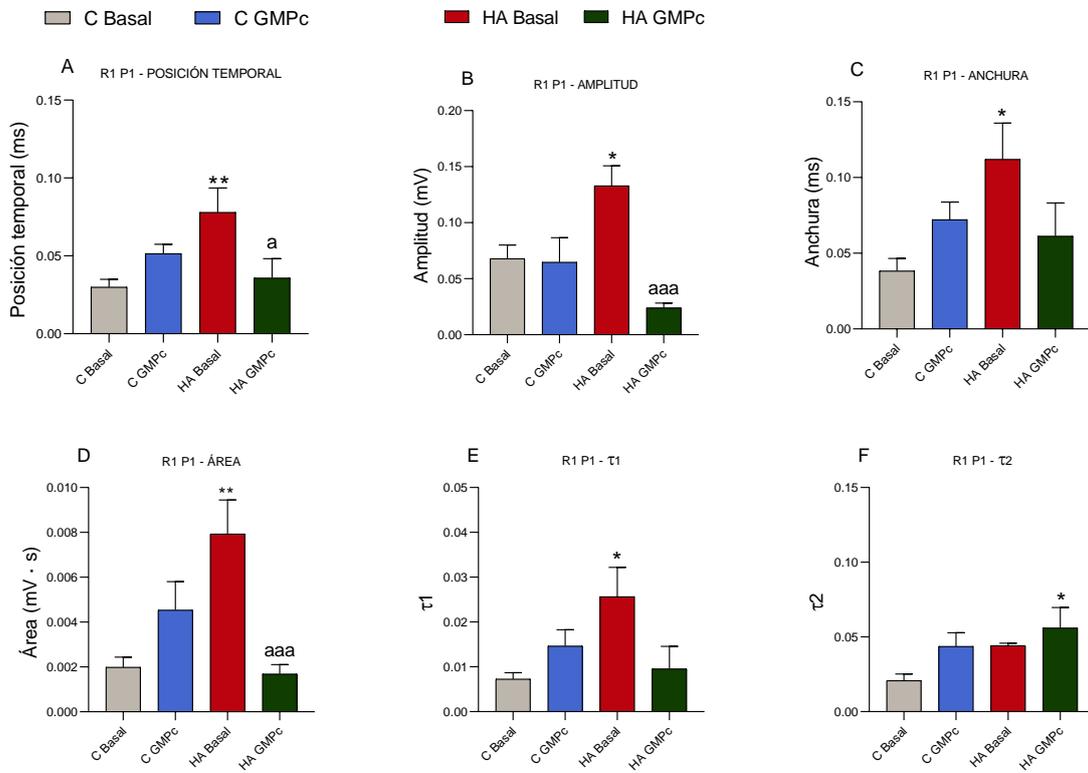


Figura 28. Efectos de la hiperamonemia y del GMPc extracelular sobre los valores de los parámetros analizados en el IPSPs mediado por receptores GABA_A del primer rango de estimulación (1250-2500 mV) de la curva I/O. R=rango; P=IPSP. Rango 1. En A, B, C, D y F los datos siguen una distribución normal, por lo que se analizaron con test paramétricos, ANOVA, y un test post-hoc de Tukey. En E los datos no seguían una distribución normal, se realizó un test Kruskal-Wallis y un test post-hoc de Dunn's. Los valores estadísticamente significativos respecto al grupo control están indicados con asteriscos (*): *p<0.05, **p<0.01. Los valores son la media ± SEM de 10-15 ratas por grupo. Los valores estadísticamente significativos respecto al grupo hiperamonemia están indicados con una a: a p < 0.05, aa p < 0.01; aaa p < 0.001

La hiperamonemia aumenta la amplitud, la anchura, el área y τ_2 del IPSP del segundo rango de estimulación (2750-4000 mV). El GMPc extracelular normaliza algunas de estas alteraciones.

Se detectaron de dos a tres IPSPs en todos los grupos experimentales. La hiperamonemia retrasa la aparición del IPSP ($F = 3,525$; $p < 0,05$), aumenta su amplitud ($F = 6,335$; $p < 0,05$), anchura ($F = 5,439$; $p < 0,05$), área ($F = 5,346$; $p < 0,05$) y τ_2 ($F = 12,78$; $p < 0,05$). El GMPc extracelular normaliza la amplitud ($p < 0,01$), la anchura ($p < 0,05$) y el área ($p < 0,05$), pero no el aumento de τ_2 ($p > 0,05$) y aunque tiende revertir el retraso en la generación de la respuesta, las diferencias no llegan a ser significativas (Figura 29 A-F, Tabla 10).

El GMPc extracelular en el grupo control aumenta la anchura del IPSP ($F = 5,439$; $p < 0,05$) y τ_2 ($F = 12,78$; $p < 0,05$) respecto al grupo control basal. Además, el GMPc extracelular en los cortes procedentes de ratas control tiende a retrasar la aparición del IPSP, a aumentar la amplitud y el área, pero las diferencias no llegan a ser significativas.

Ni la hiperamonemia ni el GMPc extracelular tienen efecto sobre ninguna de las variables estudiadas en el segundo y tercer IPSPs en el segundo rango de estimulación.

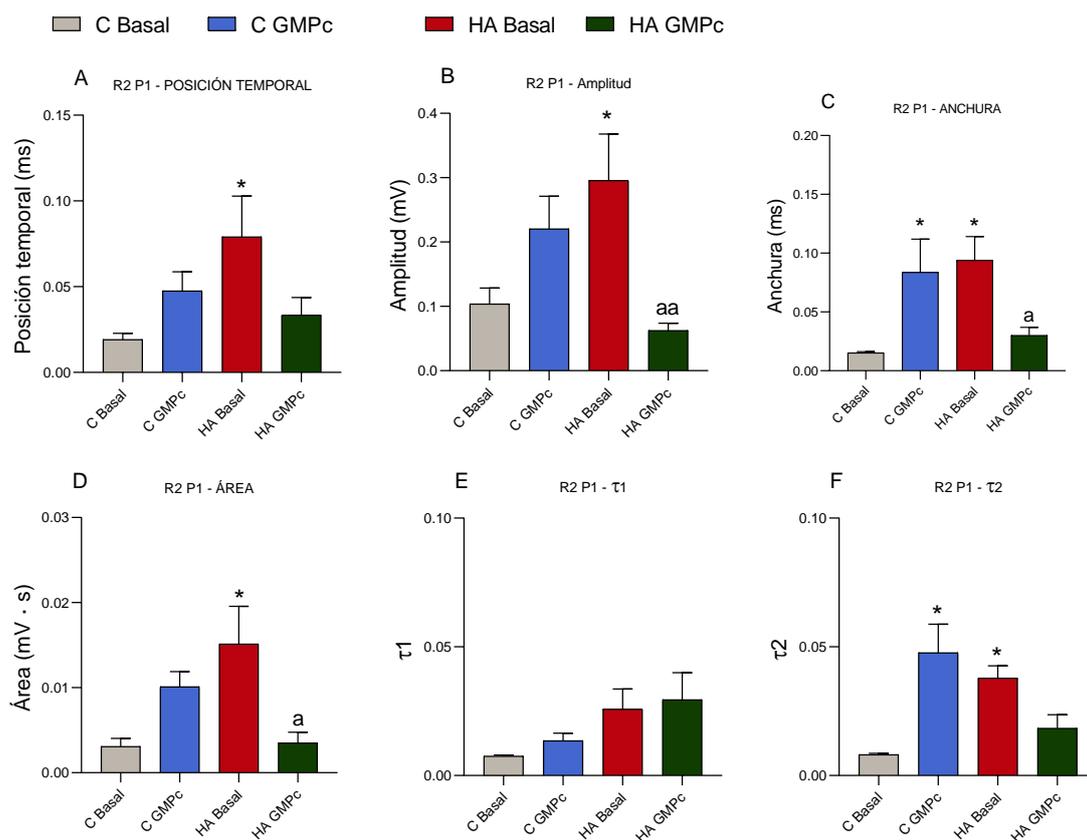


Figura 29. Efectos de la hiperamonemia y del GMPc extracelular sobre los valores de los parámetros analizados en los IPSPs mediados por receptores GABA_A en el segundo rango de estimulación (2750-4000 mV). R=rango; P=IPSP. Rango 1. En A, B, D, E y F los datos siguen una distribución normal, por lo que el análisis estadístico se realizó un test paramétrico, ANOVA, y un test post-hoc de Tukey. En C los datos no seguían una distribución normal, se realizó un test Kruskal-Wallis y un test post-hoc de Dunn's. Los valores son la media \pm SEM de 10-15 ratas por grupo. Los valores estadísticamente significativos respecto al grupo control están indicados con asteriscos (*): * $p < 0,05$. Los valores estadísticamente significativos respecto al grupo hiperamonemia están indicados con una a: $a p < 0,05$, $aa p < 0,01$.

La hiperamonemia aumenta la amplitud, la anchura, el área y τ_2 del IPSP del tercer rango de estimulación (4250-5000 mV). El GMPc extracelular normaliza algunas de estas alteraciones.

A intensidades de estimulación altas, rango de estimulación de 4225 mV a 5000 mV, se detectaron de dos a tres IPSPs, y observamos que la hiperamonemia sigue retrasando la aparición del IPSP ($F = 5,127$; $p < 0,01$), aumenta la amplitud ($F = 9,45$; $p < 0,05$), el área ($F = 9,687$; $p < 0,01$) y la anchura ($F = 3,901$; $p < 0,05$) y tiende a seguir aumentando τ_2 . El GMPc extracelular revierte el aumento en la amplitud ($p < 0,001$), el área ($p < 0,01$) y normaliza también el momento en el que se alcanza la amplitud máxima (posición temporal del IPSP) ($p < 0,01$). Además, tiende a disminuir el aumento en la anchura del IPSP. Sin embargo, aumenta τ_1 ($F = 5,28$; $p < 0,05$) y no tiene ningún efecto sobre τ_2 (Figura 30 A-F, Tabla 10).

Ni la hiperamonemia ni el GMPc extracelular tienen efecto sobre ninguna de las variables estudiadas en el segundo y tercer IPSPs en el tercer rango de estimulación.

La figura 31 muestra las curvas I/O medias observados en el grupo control basal en los tres rangos de estimulación.

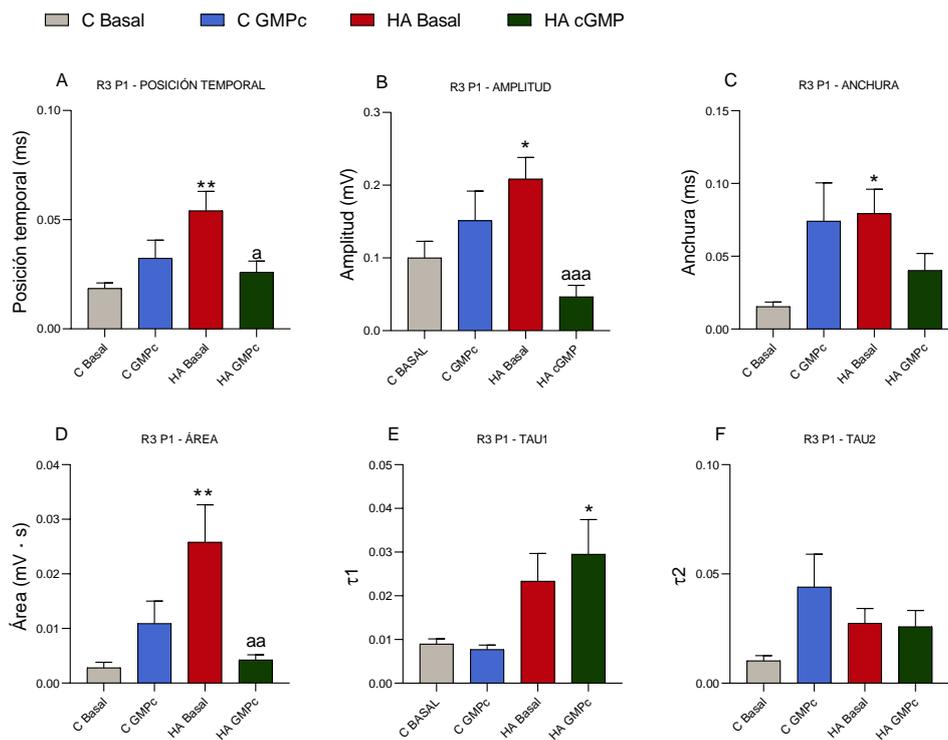


Figura 30. Efectos de la hiperamonemia y del GMPc extracelular sobre los valores de los parámetros analizados en los IPSPs mediados por receptores GABA_A del tercer rango de estimulación (4250-5000 mV). R=rango; P=IPSP. Todos los datos siguieron una distribución normal, por lo que el análisis estadístico se llevó a cabo con un test paramétrico, ANOVA, y un test post-hoc de Tukey. Los valores son la media ± SEM de 10-15 ratas por grupo. Los valores estadísticamente significativos respecto al grupo control están indicados con asteriscos (*): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Los valores estadísticamente significativos respecto al grupo hiperamonemia están indicados con una 'a': a $p < 0,05$; aa $p < 0,01$; aaa $p < 0,001$.

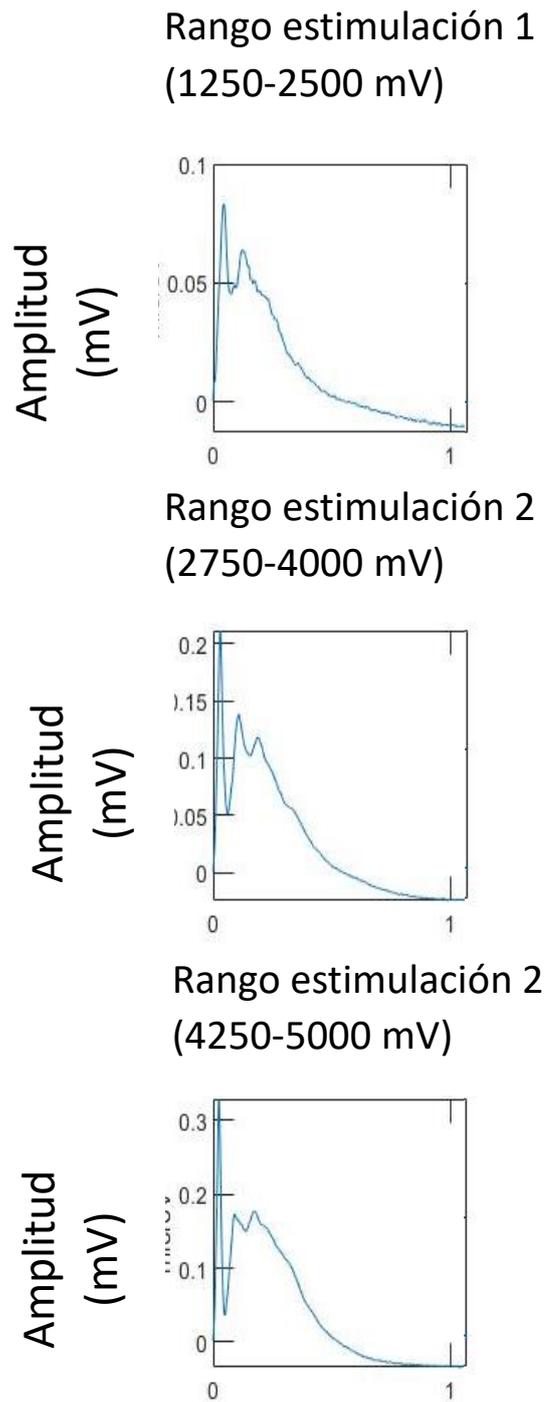


Figura 31. Curvas medias $GABA_A$ por rangos de estimulación de 12 slices del grupo control. Imagen extraída de Matlab.

Tabla 10. Efectos de la hiperamonemia y del GMPc extracelular sobre los valores de las variables del estudio de IPSPs mediados por el receptor GABA_A por rangos de estimulación. Para cada variable se muestra el valor del estadístico (F) y la Media \pm SEM de cada grupo.

	VARIABLE	F	MEDIA \pm SEM			
			CONTROL		HIPERAMONEMIA	
			BASAL	GMPc	BASAL	GMPc
RANGO 1 IPSP 1 GAUSIANA	POSICIÓN	4,891	0,0299 \pm 0,0014	0,0515 \pm 0,0059	0,078 \pm 0,0156 **	0,0358 \pm 0,0124 a
	AMPLITUD	8,49	0,068 \pm 0,0123	0,0645 \pm 0,0218	0,1328 \pm 0,0177 *	0,024 \pm 0,0045 aaa
	ANCHURA	3,929	0,0383 \pm 0,0082	0,0723 \pm 0,0115	0,112 \pm 0,0238 *	0,0613 \pm 0,0219
	ÁREA	9,201	0,002 \pm 0,0005	0,0045 \pm 0,0013	0,0079 \pm 0,0015 **	0,0017 \pm 0,0004 aaa
RANGO 1 IPSP 1 EXPONENCIAL	τ 1	2,075	0,0073 \pm 0,0014	0,015 \pm 0,0037	0,0257 \pm 0,0066 *	0,0095 \pm 0,005
	AMPLITUD	2,994	0,0523 \pm 0,0089	0,0683 \pm 0,0213	0,1125 \pm 0,0213 *	0,025 \pm 0,0043 aaa
	τ 2	0,4854	0,0208 \pm 0,0045	0,0437 \pm 0,0091	0,0527 \pm 0,0086	0,0561 \pm 0,0136 *
	ÁREA	3,537	0,002 \pm 0,0005	0,0046 \pm 0,0013	0,0073 \pm 0,0017 **	0,0018 \pm 0,0004 aa
RANGO 2 IPSP 1 GAUSIANA	POSICIÓN	3,525	0,0192 \pm 0,0036	0,0475 \pm 0,0112	0,0791 \pm 0,0237 *	0,0334 \pm 0,0103
	AMPLITUD	6,335	0,1038 \pm 0,0249	0,2206 \pm 0,0505	0,296 \pm 0,0719 *	0,0624 \pm 0,0113 aa
	ANCHURA	5,439	0,152 \pm 0,001	0,0837 \pm 0,0281 *	0,0939 \pm 0,0202 *	0,0301 \pm 0,0068 a
	ÁREA	5,346	0,0031 \pm 0,001	0,01 \pm 0,0017	0,015 \pm 0,0044 *	0,0035 \pm 0,0013 a
RANGO 2 IPSP 1 EXPONENCIAL	τ 1	1,969	0,0075 \pm 0,0004	0,0135 \pm 0,0029	0,0258 \pm 0,0078	0,0295 \pm 0,105
	AMPLITUD	4,868	0,0998 \pm 0,0235	0,1392 \pm 0,0384	0,2562 \pm 0,0641 *	0,0622 \pm 0,0111 aa
	τ 2	12,78	0,0081 \pm 0,0005	0,0477 \pm 0,0111 *	0,0379 \pm 0,0009 *	0,0184 \pm 0,0052
	ÁREA	5,84	0,0031 \pm 0,0009	0,01 \pm 0,0019	0,0154 \pm 0,0045 *	0,0026 \pm 0,0011 a
RANGO 3 IPSP 1 GAUSIANA	POSICIÓN	5,127	0,0185 \pm 0,0025	0,0324 \pm 0,0083	0,0541 \pm 0,0089 **	0,026 \pm 0,0051 a
	AMPLITUD	9,45	0,11 \pm 0,0244	0,1513 \pm 0,0172	0,2086 \pm 0,0295 *	0,05 \pm 0,0156 aaa
	ANCHURA	3,901	0,0155 \pm 0,0031	0,0472 \pm 0,026	0,0795 \pm 0,0165 *	0,0303 \pm 0,0074
	ÁREA	9,687	0,0028 \pm 0,0002	0,011 \pm 0,004	0,0258 \pm 0,0068 **	0,0048 \pm 0,0009 aa
RANGO 3 IPSP 1 EXPONENCIAL	τ 1	5,28	0,009 \pm 0,0012	0,0077 \pm 0,001	0,0234 \pm 0,0063	0,03 \pm 0,008 *
	AMPLITUD	5,793	0,1208 \pm 0,0315	0,1655 \pm 0,0507	0,396 \pm 0,0926 *	0,1381 \pm 0,0171 aa
	τ 2	2,314	0,0103 \pm 0,0023	0,0441 \pm 0,0149	0,0275 \pm 0,0068	0,0259 \pm 0,0074
	ÁREA	3,694	0,0028 \pm 0,001	0,01 \pm 0,0036	0,0204 \pm 0,0079 **	0,0055 \pm 0,0009 aa

El ajuste de los valores medios de los IPSP mediados por receptores GABA_A a curvas gaussianas aportó cuatro parámetros característicos: posición temporal (tiempo en el que se alcanza la máxima amplitud), amplitud del IPSP, anchura del IPSP y área del IPSP. En el caso del ajuste a curvas exponenciales se obtuvieron también cuatro parámetros característicos: τ 1 (velocidad de crecimiento), amplitud del IPSP, τ 2 (velocidad de caída), y área del IPSP. Tanto en los ajustes a curvas gaussianas como exponenciales. Los valores de R² fueron > 0,8, demostrando la bondad del ajuste. Los valores son la media \pm SEM de 10-15 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de los del grupo control basal y del grupo HA basal se indican con asteriscos y a, respectivamente. [$*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, a $p < 0,05$, aa $p < 0,01$, aaa $p < 0,001$].

1.2. Efecto de la hiperamonemia y el GMPc EXTRACELULAR sobre factores que modulan la neurotransmisión GABAérgica en hipocampo

1.2.1. La hiperamonemia disminuye los niveles de GABA en hipocampo

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC, por lo que juega un papel fundamental en la modulación de la excitabilidad de los circuitos neuronales.

Se midió la concentración total de GABA por cromatografía líquida-espectrometría de masas (HPLC-MS) en rodajas de hipocampo. La hiperamonemia disminuye el contenido total de GABA hasta un 63 ± 8 % del de ratas control ($5,5$ nmoles/mg; $F = 5,142$, $p < 0,05$) y el GMPc extracelular revierte esta alteración ($p < 0,01$), aumentando el contenido total hasta un 110 ± 13 % (Figura 32 A).

Puesto que el GABA se sintetiza a partir del glutamato por descarboxilación por el enzima glutamato descarboxilasa (GAD) y existen dos tipos principales de este enzima en el SNC: GAD-65 y GAD-67; se analizó el contenido total de estos enzimas en hipocampo por inmunoblot con el fin de saber si la disminución producida por la hiperamonemia en el contenido total de GABA podría ser debida a alteraciones en la cantidad de alguno de estos enzimas. En el caso de GAD-65 la hiperamonemia no altera el contenido (103 ± 7 %; $F = 0,0053$, $p > 0,05$) respecto al grupo control, y el GMPc extracelular no altera el contenido de GAD-65 ni en los cortes procedentes de ratas control (102 ± 10 %) ni en los cortes de ratas hiperamonemicas (102 ± 9 %) (Figura 32 B). Sin embargo, la hiperamonemia sí que disminuye respecto al grupo control el contenido de GAD-67 ($F = 15,16$, $p < 0,01$) hasta un 78 ± 3 %. El GMPc extracelular revierte esta disminución, aumentando el contenido total de GAD-67 hasta valores similares a los de ratas control (95 ± 7 %, $p < 0,05$). El GMPc extracelular en el grupo control induce un aumento de GAD-67 (122 ± 4 %, $p < 0,01$) (Figura 32 C).

A pesar de que la hiperamonemia disminuye GAD67 y el contenido de GABA en tejido, lo que realmente puede activar el receptor GABA_A es el GABA en el medio extracelular. Se analizó su concentración por microdiálisis *in vivo*. La hiperamonemia aumenta el GABA extracelular en hipocampo (132 ± 10 %, $p < 0,05$) respecto a las ratas control (48 ± 14 nM) (Figura 32 D).

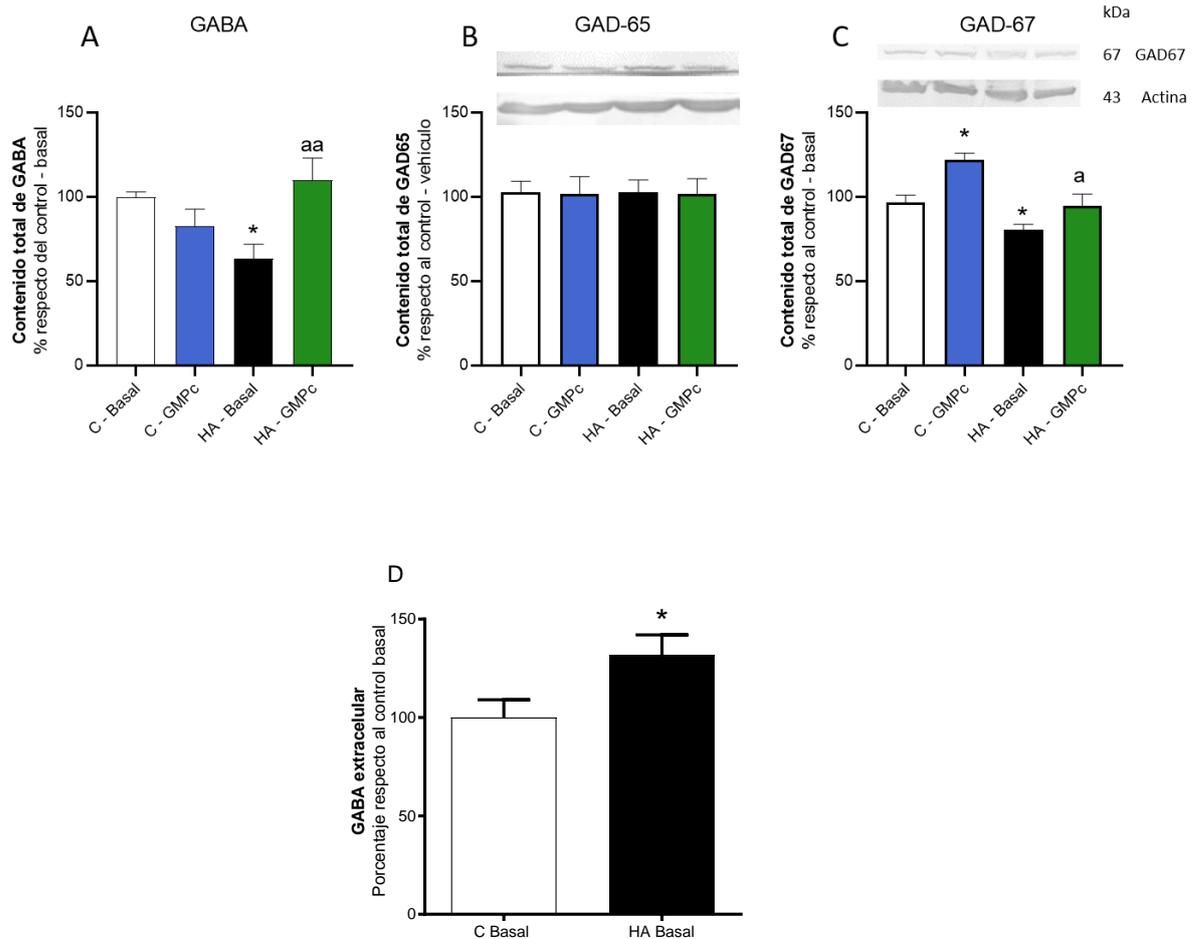


Figura 32. La hiperamonemia disminuye el contenido total de GABA (A), pero no altera el contenido total de GAD-65 (B) y disminuye el contenido total de GAD67 (C) y aumenta el GABA extracelular en hipocampo (D). Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin GMPC extracelular. En A las muestras se analizaron por HPLC como se describe en métodos. En B y C los datos se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. En D se analizó el contenido extracelular de GABA por HPLC en muestras obtenidas por microdiálisis. Los valores son la media \pm SEM de 7-14 ratas por grupo. Todos los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía. En D los datos se analizaron con un t test. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

1.2.2. Efecto de la hiperamonemia y el GMPC extracelular sobre la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A en hipocampo.

Se ha demostrado que la hiperamonemia altera la expresión en membrana de determinadas subunidades de receptores AMPA y NMDA, así como de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 5$ de los receptores GABA_A (Cabrera-Pastor et al., 2016a; Hernández-Rabaza et al., 2016a; Taoro-González et al., 2018; Taoro-González et al., 2019). Sin embargo, no se sabe cómo la hiperamonemia afecta a la expresión en membrana de otras subunidades del receptor GABA_A. Con el fin de estudiar en más profundidad como la hiperamonemia y el GMPC extracelular afectan la neurotransmisión GABAérgica, se analizó por inmunoblot la expresión en membrana de

diferentes subunidades del receptor GABA_A utilizando el procedimiento del crosslinker BS3 como se describe en métodos (apartado 3).

La hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de la subunidad $\alpha 1$ ($126 \pm 9 \%$; $F = 6,31$, $p > 0,05$) respecto al grupo control y el GMPc extracelular normaliza esta alteración ($87 \pm 17 \%$, $p < 0,05$). El tratamiento del grupo control con GMPc extracelular no produce ningún cambio en la expresión en membrana de $\alpha 1$ ($108 \pm 9 \%$, $p > 0,05$) (Figura 33 A). En el caso de la subunidad $\alpha 2$, la hiperamonemia también aumenta su expresión en membrana hasta $198 \pm 34 \%$ respecto al grupo control basal ($F = 6,374$, $p > 0,01$) y el GMPc extracelular revierte esta alteración ($101 \pm 24 \%$, $p < 0,05$). El GMPc extracelular en el grupo control tiende a disminuir la expresión en membrana de $\alpha 2$, sin embargo, las diferencias no son significativas ($68 \pm 20 \%$, $p > 0,05$) (Figura 33 B). La hiperamonemia reduce la expresión en membrana de la subunidad $\alpha 5$ ($82 \pm 7 \%$) respecto al grupo control ($F = 16,61$, $p > 0,001$) y, en este caso, el GMPc extracelular no es capaz de normalizar la expresión en membrana ($60 \pm 6 \%$, $p > 0,05$). Además, el GMPc extracelular en el grupo control disminuye también la expresión en membrana de $\alpha 5$ ($74 \pm 7 \%$, $p < 0,05$) (Figura 33 C).

Por otro lado, la hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de la subunidad $\gamma 2$ ($180 \pm 22 \%$) ($F = 9,064$, $p < 0,001$) y el GMPc extracelular reduce este aumento hasta valores similares a los observados en el grupo control basal ($86 \pm 13 \%$, $p < 0,01$). El GMPc extracelular en el grupo control tiende a disminuir la expresión en membrana de $\gamma 2$, pero esta disminución no es significativa ($54 \pm 9 \%$, $p > 0,05$) (Figura 33 D).

En cuanto a la subunidad $\beta 3$, la hiperamonemia también aumenta su expresión en membrana ($155 \pm 14 \%$) respecto al grupo control basal ($F = 6,605$, $p < 0,01$) y el GMPc extracelular disminuye su expresión en membrana ($p < 0,01$) hasta valores similares a los observados en el grupo control basal ($75 \pm 16 \%$). En el grupo control, el GMPc extracelular, no altera la expresión en membrana de $\beta 3$ ($78 \pm 20 \%$) (Figura 33 E).

Además, la hiperamonemia también da lugar a un aumento de la expresión en membrana de la subunidad δ del receptor GABA_A ($F = 9,549$, $< 0,001$) hasta $146 \pm 11 \%$ respecto al grupo control y el GMPc extracelular revierte esta alteración ($42 \pm 7 \%$, $p < 0,001$). El GMPc extracelular en el grupo control no altera la expresión en membrana ($85 \pm 12 \%$, $p > 0,05$) (Figura 33 F).

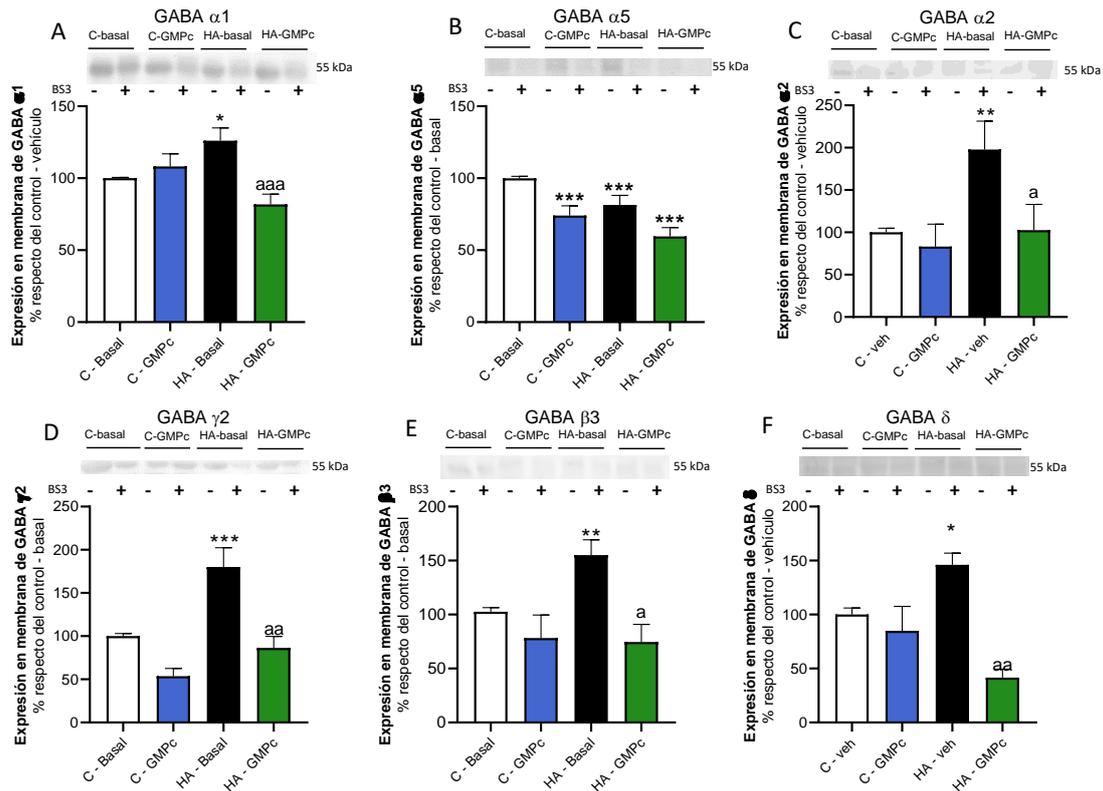


Figura 33. La hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA α $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ y δ , pero disminuye la expresión en membrana de la subunidad $\alpha 5$. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin GMPC extracelular. Se analizó la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$ (A), $\alpha 5$ (B), $\alpha 2$ (C), $\gamma 2$ (D), $\beta 3$ (E) y δ (F) mediante western blot utilizando el crosslinker BS3, tal y como se describe en Métodos. Las muestras incubadas en ausencia o presencia de BS3 se sometieron a inmunoblot empleando los anticuerpos contra las subunidades correspondientes. Se muestran imágenes representativas de las bandas, en las que la muestras no tratadas con BS3 (-) representan la cantidad total de proteína en el homogenado y las muestras tratadas con BS3 (+) representan el contenido citosólico de la proteína. Se cuantificó la intensidad de cada banda y se obtuvo la expresión en membrana como la resta de la banda sin BS3 menos la banda con BS3. Los valores se expresan como porcentaje respecto a las ratas control y son la media \pm SEM de la intensidad de banda de 6-16 ratas por grupo. Todos los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$; ^{aaa} $p < 0.001$).

1.2.3. Efecto de la hiperamonemia y el GMPC extracelular sobre la fosforilación de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA α en los residuos S408/S409.

Uno de los principales mecanismos de modulación de la expresión en membrana de los receptores GABA α es la fosforilación. La subunidad $\beta 3$ del receptor GABA α se combina con todas las subunidades y su fosforilación en los residuos de serina 408-409 aumenta la expresión en membrana del receptor GABA α al evitar la unión de AP2.

Encontramos que la hiperamonemia aumenta la fosforilación de $\beta 3$ en S408-S409 respecto al grupo control basal (216 ± 40 %; $F = 6.36$, $p < 0.05$) y el GMPc extracelular normaliza la fosforilación de $\beta 3$ en estos dos residuos (73 ± 11 %). En el caso del grupo control el GMPc extracelular tiende a disminuir la fosforilación en los residuos S408-S409 de $\beta 3$, sin embargo, las diferencias no son significativas (47 ± 13 %) (Figura 34).

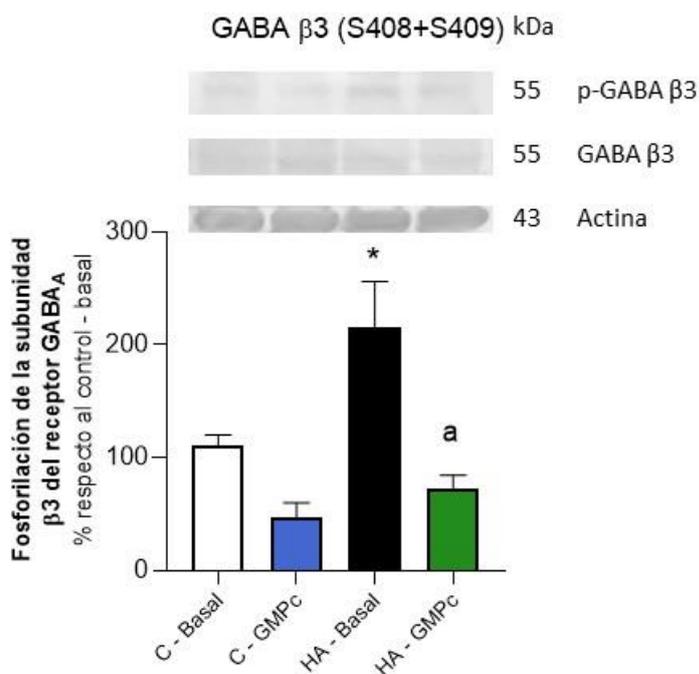


Figura 34. La hiperamonemia aumenta la fosforilación de GABA $\beta 3$ en el residuo S408-S409. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin GMPc extracelular. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. Se representa en porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 4-10 ratas por grupo. Todos los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

1.2.4. Efecto de la hiperamonemia y el GMPc extracelular sobre el contenido total de gephyrin en hipocampo.

Gephyrin es una proteína estructural que une las proteínas sinápticas con el citoesqueleto. Es indispensable para la organización y agrupación de receptores GABA_A en las sinapsis inhibitorias. Se analizó el contenido total de gephyrin por western blot.

La hiperamonemia aumenta el contenido total de gephyrin (118 ± 6 %; $F = 5.402$, $p < 0.05$) respecto al grupo control (100 ± 3 %) y el GMPc extracelular revierte este aumento ($p < 0.05$),

disminuyendo el contenido total de gephyrin hasta valores similares a los presentes en el grupo control ($98 \pm 9 \%$) (Figura 35).

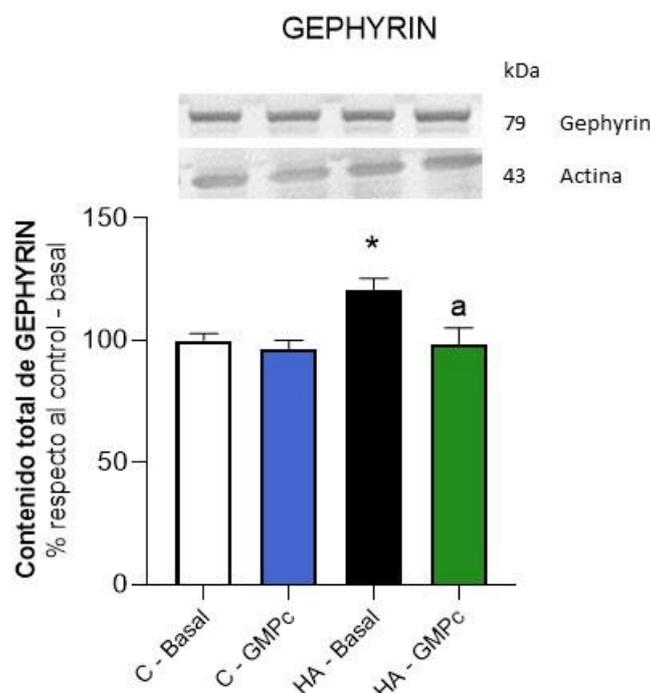


Figura 35. La hiperamonemia aumenta el contenido total de gephyrin y el GMPc extracelular lo normaliza. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin GMPc extracelular. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en material y métodos. Se representa en porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 6-10 ratas por grupo. Todos los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

1.2.5. Efecto la hiperamonemia y el GMPc extracelular sobre el contenido total y la expresión en membrana de transportadores GABA

La eliminación del GABA del espacio extracelular se realiza por transportadores específicos. Los transportadores son los principales encargados de mantener la concentración extracelular del GABA para evitar la activación tónica excesiva de los receptores GABA y se localizan tanto sináptica como extrasinápticamente. En la presente tesis doctoral analizamos tanto el contenido total como la expresión en membrana de los dos transportadores principales de GABA en el SNC: GAT-1, que se expresa fundamentalmente en neuronas GABAérgicas, pero también en glía, y GAT-3, que se expresa únicamente en astrocitos. El contenido total tanto de GAT-1 como de GAT-3 aumentan en hiperamonemia crónica ($122 \pm 6 \%$; $121 \pm 5 \%$; $F = 6.28$, $p < 0.05$; $F = 6.701$, $p < 0.05$ respectivamente). El GMPc extracelular normaliza el contenido total tanto de

GAT-1 ($72 \pm 17 \%$, $p < 0.05$) como de GAT-3 ($75 \pm 24 \%$, $p < 0.01$) (Figura 36 A y B). El GMPc extracelular en el grupo control no altera el contenido total ni de GAT-1 ($81 \pm 4 \%$, $p > 0.05$) ni de GAT-3 ($87 \pm 7 \%$, $p > 0.05$).

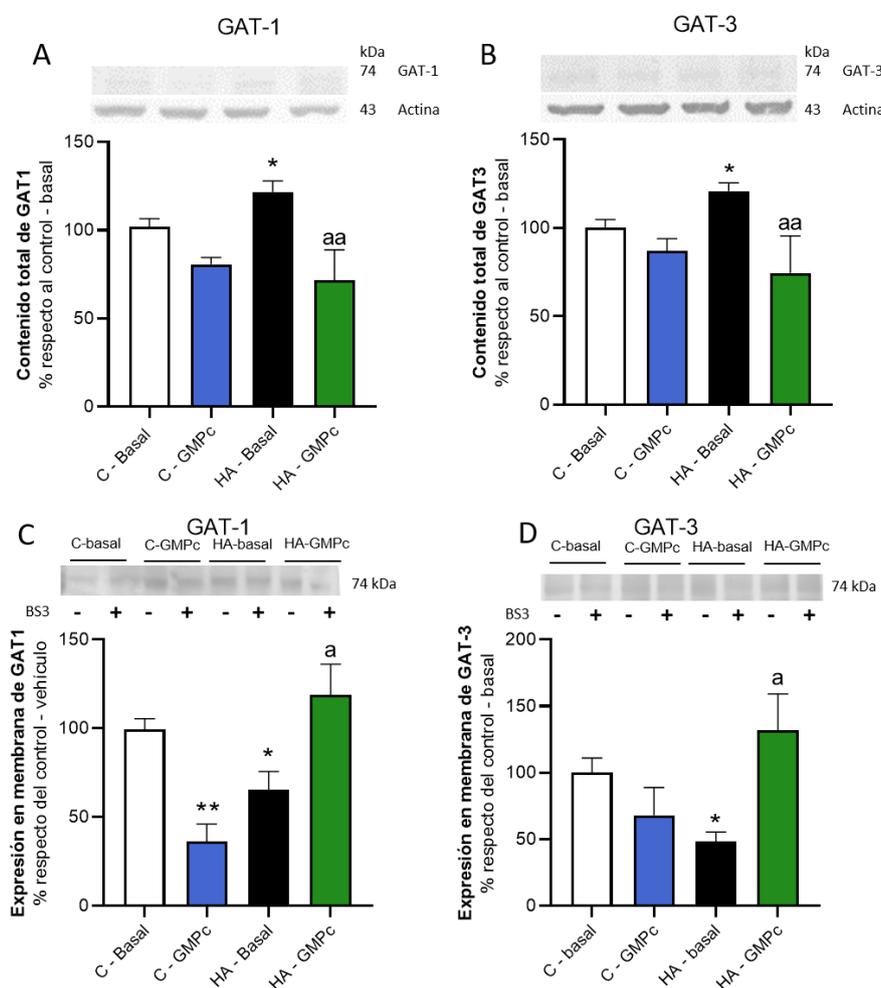


Figura 36. La hiperamonemia aumenta el contenido total de GAT-1 y GAT-3, pero disminuye su expresión en membrana. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin GMPc extracelular. Se analizó el contenido total de GAT-1 (A) y GAT-3 (B) por western blot como se describe en Métodos. Se representa en porcentaje la media \pm SEM de la intensidad de banda de 10-15 ratas por grupo respecto de ratas control. Se analizó la expresión en membrana de GAT-1 (C) y GAT-3 (D) mediante el crosslinker BS3 como se describe en métodos. Las muestras incubadas en ausencia o presencia de BS3 se sometieron a inmunoblot empleando los anticuerpos contra las subunidades correspondientes. Se muestran imágenes representativas de las bandas, en las que las muestras no tratadas con BS3 (-) representan la cantidad total de proteína en el homogenado y las muestras tratadas con BS3 (+) representan el contenido citosólico de la proteína. Se cuantificó la intensidad de cada banda y se obtuvo la expresión en membrana como la resta de la banda sin BS3 menos la banda con BS3. Los valores son la media \pm SEM de 6-10 ratas por grupo. En D los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. En el resto de casos (A, B y C) los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

Por otro lado, la expresión en membrana de GAT-1 se encuentra disminuida en ratas hiperamonémicas ($63 \pm 11 \%$; $F = 8.514$, $p < 0.05$) respecto del grupo control y el GMPc extracelular aumenta la expresión en membrana de GAT-1 hasta niveles similares a los observados en el grupo control basal ($119 \pm 17 \%$, $p < 0.01$) (Figura 36 C). Además, el GMPc extracelular en el grupo control disminuye la expresión en membrana de GAT-1 respecto a condiciones basales ($36 \pm 7 \%$, $p < 0.01$). Esto mismo ocurre con el transportador GAT-3 cuya expresión en membrana también disminuye en hiperamonemia ($48 \pm 7 \%$; $H = 13.5$, $p < 0.01$). El GMPc extracelular revierte esta alteración, aumentando la expresión en membrana de GAT-3 ($132 \pm 27 \%$, $p < 0.05$) (Figura 36 D). Sin embargo, el GMPc extracelular no altera la expresión en membrana de GAT-3 en el grupo control.

1.2.6. Efecto la hiperamonemia y el GMPc extracelular sobre la expresión en membrana de transportadores de Cl⁻

Los transportadores de Cl⁻ juegan un papel fundamental en la modulación de la neurotransmisión GABAérgica, ya que van a regular la homeostasis de Cl⁻. KCC2 extrae Cl⁻ desde el interior celular al medio extracelular, mientras que NKCC1 capta Cl⁻ del medio extracelular para incorporarlo principalmente en astrocitos. La salida del ión Cl⁻ desde el interior hacia el exterior celular produce una disminución de los niveles intracelulares de Cl⁻, de manera que la activación del receptor GABA producirá una hiperpolarización de la membrana. En estas condiciones, cuando el receptor GABA_A es activado, el ión cloro fluye hacia el interior celular produciendo la clásica hiperpolarización postsináptica. Por ello se ha analizado la expresión en membrana de los dos principales transportadores de Cl⁻ en el hipocampo: NKCC1, que se expresa principalmente en glía, pero también en neuronas, y KCC2, cuya expresión queda restringida a neuronas piramidales e interneuronas en el hipocampo.

La hiperamonemia induce un aumento de la expresión en membrana de NKCC1 ($138 \pm 13 \%$; $H = 22.89$, $p < 0.05$) y el GMPc extracelular revierte esta alteración ($67 \pm 17 \%$, $p < 0.01$). El GMPc en el grupo control también tiende a disminuir la expresión en membrana de NKCC1, sin embargo, las diferencias no son significativas ($50 \pm 13 \%$) (Figura 37 A).

En el caso de KCC2, la hiperamonemia disminuye la expresión en membrana ($55 \pm 7 \%$; $F = 15.27$, $p < 0.0001$) y el GMPc extracelular aumenta la expresión de KCC2 hasta niveles similares a los observados en el grupo control basal ($87 \pm 10 \%$, $p < 0.01$). El GMPc extracelular en el grupo control disminuye la expresión en membrana de KCC2 ($67 \pm 12 \%$, $p < 0.05$) (Figura 37 B).

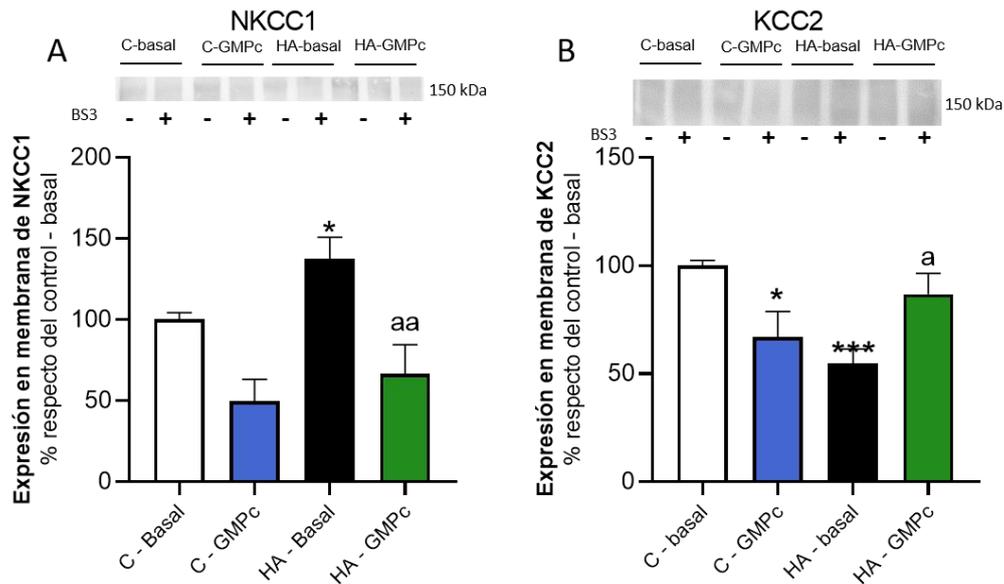


Figura 37. La hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de NKCC1 y disminuye la de KCC2 en hipocampo y el GMPc extracelular revierte estas alteraciones. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin GMPc extracelular. Se analizó la expresión en membrana de NKCC1 (A) y KCC2 (B) mediante el crosslinker BS3, como se describe en Métodos. Las muestras incubadas en ausencia o presencia de BS3 se analizaron por western blot empleando los anticuerpos contra las subunidades correspondientes. Se muestran imágenes representativas de las bandas, en las que las muestras no tratadas con BS3 (-) representan la cantidad total de proteína en el homogenado y las muestras tratadas con BS3 (+) representan el contenido citosólico de la proteína. Se cuantificó la intensidad de cada banda y se obtuvo la expresión en membrana como la resta de la banda sin BS3 menos la banda con BS3. Los valores son el porcentaje de la media \pm SEM de 10-15 ratas por grupo respecto a las ratas control tratadas con vehículo. En A los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. En B los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

DISCUSIÓN

La segunda parte de esta tesis doctoral se ha centrado en dilucidar cómo la hiperamonemia crónica afecta la función de la neurotransmisión mediada por los receptores GABA_A. Para intentar entender los mecanismos responsables de las alteraciones encontradas hemos analizado la expresión en membrana de las diferentes subunidades que conforman el receptor GABA_A y algunas de las proteínas que modulan la neurotransmisión GABAérgica.

EFFECTO DE LA HIPERAMONEMIA Y EL GMPc EXTRACELULAR SOBRE LA FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES GABAA

Los resultados obtenidos en esta parte de la tesis permiten conocer mejor cómo la hiperamonemia crónica altera las respuestas sinápticas inhibitorias mediadas por los receptores GABA_A en el hipocampo, así como del efecto del GMPc extracelular sobre dichas respuestas tanto en ratas control como hiperamonémicas. Los resultados obtenidos muestran que la hiperamonemia crónica aumenta la amplitud de los IPSPs mediados por receptores GABA_A en las colaterales de Schäffer, así como el área de despolarización (componente negativo) y el área de hiperpolarización (componente positivo), lo que es indicativo de una mayor activación y respuesta inhibitoria GABAérgica. Por otra parte, el GMPc extracelular normaliza tanto la amplitud como el componente positivo de los IPSPs mediados por receptores GABA_A en ratas hiperamonémicas. Aunque también tiende a revertir el aumento del componente negativo, las diferencias no llegan a ser significativas.

El aumento del tono GABAérgico en diferentes áreas cerebrales se ha relacionado con la etiopatología de la encefalopatía hepática (Schafer y Jones, 1982; Cauli et al., 2009). El aumento del tono GABAérgico puede ser resultado de diferentes factores: aumento del GABA extracelular en cerebro, aumento de la cantidad de receptores GABA_A, aumento de la concentración de compuestos endógenos análogos a la benzodiazepina que aumentan la activación de los receptores GABA_A, por un aumento de la concentración de neuroesteroides que también aumentan la activación de los receptores GABA_A o directamente por un aumento de la activación de los receptores GABA_A por amonio (Cauli et al., 2009). Como se ha visto en los resultados de esta tesis, en hiperamonemia crónica hay una disminución del contenido total de GABA en el hipocampo. Sin embargo, la concentración extracelular de GABA está aumentada. Esto sería debido a la disminución de la expresión en membrana de los transportadores GABA, GAT-1 y GAT-3, conduciendo a una menor recaptación de GABA del medio extracelular y a un aumento de su concentración extracelular, aunque el contenido total de GABA en hipocampo esté

disminuido en hiperamonemia. Hasta el momento únicamente se sabía que en hiperamonemia crónica in vivo hay un aumento en hipocampo de la expresión en membrana de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A y una disminución de $\alpha 5$ (subunidad que se expresa principalmente extrasinápticamente). En esta tesis hemos demostrado que en cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas hay también un aumento de la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ y δ . Se ha descrito que las subunidades $\gamma 2$ y $\beta 3$ son esenciales para la modulación de la expresión en membrana de los receptores GABA_A (Jacob et al., 2008), como se verá en mayor detalle más adelante en la discusión. Este aumento de la expresión en membrana de todas las subunidades sinápticas del receptor GABA_A, junto con la disminución de la expresión en membrana de los transportadores de GABA y el aumento del GABA extracelular, podría ser responsable del aumento observado en la respuesta mediada por los receptores GABA_A. Esto explicaría el aumento tanto de la amplitud como del área de despolarización de los IPSPs. Existen estudios que relacionan directamente el aumento de receptores GABA_A con aumentos en la amplitud de la respuesta GABA y en la eficacia sináptica inhibitoria (Nusser et al., 1998). Mizoguchi et al., (2003) demostraron que el BDNF promueve un aumento de la expresión en membrana de receptores GABA_A en corteza cerebral y esto da lugar a un aumento en las amplitudes de los IPSC.

Entre los mecanismos de modulación de la expresión en membrana de los receptores GABA_A, destaca la fosforilación. La endocitosis de receptores GABA_A se regula mediante la unión directa de motivos específicos de endocitosis a la proteína adaptadora de clatrina AP2 en los dominios intracelulares de subunidades concretas, entre ellas $\beta 3$ y $\gamma 2$ del receptor (Vithlani and Moss, 2009). Al menos una de estas dos subunidades o las dos al mismo tiempo están presentes en todos los receptores GABA_A del hipocampo. Los motivos de unión de AP2 contienen los principales sitios de fosforilación en serina y tirosina de los receptores GABA_A. Su fosforilación evita la unión a AP2 y la consiguiente endocitosis. Jacob et al., (2008) demostraron que la mutación en el residuo de fosforilación de S408/9 de la subunidad $\beta 3$, reduce la unión de la subunidad a AP2, lo que produce un aumento de la expresión en membrana de los receptores GABA_A. Como consecuencia el tamaño y el número de sinapsis inhibitorias aumentan, lo que da lugar a un aumento tanto de la amplitud como de la frecuencia de los mIPSCs, lo que se traduce en una mayor inhibición GABAérgica. En hiperamonemia hemos observado que se produce un aumento de la fosforilación de $\beta 3$ en el residuo S408/9, lo que estaría aumentando la expresión en membrana de receptores GABA_A. El GMPc extracelular revierte el aumento de la fosforilación de la subunidad $\beta 3$, lo que podría contribuir a la normalización de la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ y δ del receptor GABA_A.

La subunidad $\gamma 2$ es especialmente importante tanto en el tráfico de receptores GABA_A hacia la membrana (Lorenz-Guertin et al., 2018) como para las respuestas mediadas por los receptores GABA_A (Eugène et al., 2007). Alldred et al. (2005) demostraron que, en las neuronas deficientes en $\gamma 2$, sólo con la transfección de la subunidad $\gamma 2$ exógena, pero no con subunidades α , como por ejemplo la $\alpha 2$, se normaliza el reclutamiento sináptico de receptores GABA_A a la membrana, en un proceso dependiente de gephyrin y, como consecuencia, la amplitud y frecuencia de los mIPSC. En esta tesis describimos que la hiperamonemia da lugar a un aumento del contenido de gephyrin, lo que contribuiría al aumento de la expresión en membrana de receptores GABA_A. La palmitilación de gephyrin constituye uno de los principales mecanismos de regulación de la misma. Dejanovic et al., (2014) demostraron que la palmitilación de gephyrin potencia la transmisión sináptica GABAérgica, aumentando la amplitud de las corrientes postsinápticas inhibitorias en miniatura; mientras que la inhibición de la palmitilación de gephyrin, ya sea farmacológicamente o mediante la expresión de gephyrin deficiente en palmitilación, reduce la expresión en membrana de receptores GABA_A y la respuesta GABAérgica. Gephyrin contribuye a la modulación dinámica y funcional de las sinapsis GABAérgicas. El aumento de la expresión de gephyrin junto con el aumento de la fosforilación de la subunidad $\beta 3$ contribuirían al aumento de la expresión en membrana de receptores GABA_A y esto produciría un aumento de la respuesta mediada por receptores GABA_A, lo que produce una situación de “hiperinhibición” en ratas hiperamonémicas.

Por otro lado, la activación de los receptores GABA_A induce la hiperpolarización a través de la apertura de su canal aniónico, permitiendo que el Cl⁻ se mueva hacia el interior celular, al mismo tiempo que el HCO₃⁻ se mueve hacia el exterior celular en condiciones fisiológicas, lo que conduce a la hiperpolarización de la membrana plasmática. El Cl⁻ es transportado hacia el interior celular a favor de gradiente gracias a su baja concentración intracelular, la cual se mantiene gracias a los cotransportadores de Cl⁻. Por tanto, los cotransportadores de Cl⁻ van a jugar un papel fundamental en la modulación y mantenimiento de las concentraciones de cloruro (ver Introducción apartado 6.1.1) (Zhu et al., 2008). El gradiente de concentración de Cl⁻ (la diferencia entre las concentraciones intra- y extracelulares) va a determinar el potencial de equilibrio del cloruro (ECl). De hecho, dependiendo de la relación entre el ECl y el potencial de membrana (Vm), el GABA va a actuar como excitador o inhibidor cuando se une a su receptor (Ben-Ari, 2002; Kaila, 1994). En el SNC son especialmente importantes dos transportadores de Cl⁻: KCC2 y NKCC1. El KCC2 (no se expresa en glía) va a transportar Cl⁻ hacia el exterior de las neuronas, mientras que el NKCC1 va a transportar Cl⁻ hacia el interior celular. La expresión de NKCC1 (principalmente en células gliales), es alta durante el desarrollo y se regula a la baja durante el desarrollo postnatal (Dzhala, et al., 2005; Wang, et al., 2002), mientras que la expresión de KCC2 es baja durante el desarrollo y aumenta en la etapa adulta. En esta tesis hemos demostrado que en

el hipocampo de ratas hiperamonémicas hay una disminución de la expresión en membrana de KCC2 y un aumento de NKCC1, lo que daría lugar a una mayor concentración de Cl⁻ en las neuronas y en astrocitos lo que tendría que dar lugar a una disminución de la respuesta inhibitoria GABAérgica. Sin embargo, nosotros encontramos una mayor respuesta de los receptores GABA_A. Rabeé (1993) demostró que en condiciones de hiperamonemia se produce una disminución de la extrusión de Cl⁻ y, sin embargo, la eficacia de la inhibición postsináptica no mostraba ningún deterioro significativo. Cabe señalar que tanto la expresión en membrana como la función de KCC2 puede estar modulada por otros mecanismos como por ejemplo la fosforilación. En este estudio encontramos que en hiperamonemia se produce una mayor respuesta inhibitoria mediada por los receptores GABA_A. Como se ha comentado anteriormente, probablemente el aumento de la respuesta inhibitoria mediada por receptores GABA_A es debida al aumento de la expresión en membrana de receptores GABA_A; hemos demostrado que en hiperamonemia aumenta la expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ y δ del receptor GABA_A; junto con el aumento de la concentración extracelular de GABA.

Al aumento de la neurotransmisión GABAérgica pueden contribuir también el aumento en los niveles cerebrales de benzodiazepinas endógenas o la interacción directa del amonio con el complejo receptor de GABA_A-benzodiazepinas (Cauli et al., 2009). Se ha demostrado que el amonio a concentraciones elevadas, aumenta las corrientes de Cl⁻ mediadas por los receptores GABA en cultivos neuronales, al parecer al aumentar la afinidad del receptor GABA_A por el GABA (Jones, 2002). Además, el amonio también aumenta la unión de agonistas del GABA, así como de un agonista de la benzodiazepina (BZ) al receptor del GABA_A, lo que también potenciaría los efectos neuroinhibitorios de estos ligandos (Jones, 2002). En este estudio también demostraron que el amonio inhibe la captación astrocítica de GABA en un 30%-50%, un efecto que aumentaría la disponibilidad sináptica de GABA extracelular en los receptores GABA_A. Sin embargo, no se sabía por qué mecanismo, una explicación plausible sería la disminución de la expresión en membrana de GAT-3 y GAT-1 como hemos demostrado en la presente tesis.

El GMPc extracelular normaliza la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ y δ del receptor GABA_A y de los transportadores de GABA GAT-1 y GAT-3 y el contenido total de GABA en hiperamonemia, lo que podría explicar la normalización de la amplitud de los IPSPs mediados por receptores GABA_A por el GMPc extracelular. Además, el GMPc extracelular también normaliza la expresión en membrana de KCC2 y NKCC1, lo que contribuiría a la normalización del gradiente de Cl⁻.

En cuanto al efecto del GMPc extracelular en el grupo control, aumenta tanto la amplitud como el componente negativo, es decir, induce una mayor respuesta de los receptores GABA_A. Se sabe que los receptores GABA_A son uno de los principales moduladores de los niveles de GMPc

extracelular. Agonistas del receptor GABA_A previenen el aumento en la producción de GMPc mediado por la activación de los receptores NMDA en condiciones de hiperamonemia (Cauli et al., 2009) o fisiológicas (Fedele et al., 2000). Sin embargo, no sabemos cómo el GMPc extracelular está aumentando la respuesta mediada por receptores GABA_A en ratas control, ya que no se producen cambios en la expresión en membrana ni de receptores GABA_A ni de transportadores GABA. Una posibilidad sería que existiese un *feedback* negativo y ante aumentos de GMPc extracelular se produjese una mayor activación de los receptores GABA_A con el fin de reducir la producción de GMPc dependiente de receptores NMDA. Sin embargo, no conocemos los mecanismos implicados.

Por otro lado, en el estudio de los IPSPs mediados por receptores GABA_A por rangos de intensidad de estimulación, pudimos comprobar que el aumento de la respuesta inhibitoria en hiperamonemia es evidente ya a intensidades de estimulación bajas (rango 1, 1250-2500 mV) y permanece a estimulaciones de mayor intensidad. A estas estimulaciones la hiperamonemia induce un aumento de la amplitud de los IPSPs, de la anchura y, como consecuencia, del área, lo que encaja con los resultados obtenidos en el primer análisis. Sin embargo, aunque la hiperamonemia aumente la respuesta de los receptores GABA_A, hace que éstos respondan más tarde en el tiempo (posición temporal, figura 26 A), lo que podría deberse a la combinación de dos factores: la disminución de la expresión en membrana de KCC2, lo que disminuiría la extrusión de Cl⁻ y ralentizaría la respuesta, y al hecho de que se tomó como medida de la posición temporal el momento en el que se alcanza la amplitud máxima; puesto que la amplitud máxima es mayor en condiciones de hiperamonemia, sería coherente que se necesitase más tiempo para alcanzarla. No obstante, la hiperamonemia aumenta τ_1 , por lo que esta explicación parece poco probable. Por su parte, el GMPc extracelular revierte tanto el aumento de la amplitud, como la anchura y el área. Sin embargo, cabe señalar que la normalización de la anchura del IPSP en hiperamonemia por GMPc extracelular es estadísticamente significativa únicamente a intensidades de estimulación altas (rango 2: 2750-4000 mV y rango 3: 4250-5000 mV). La normalización de la anchura de los IPSPs por GMPc extracelular al parecer estaría mediada por cambios en τ_1 . Además, el GMPc extracelular también normaliza la posición temporal del IPSP, es decir, el momento de la respuesta, posiblemente al normalizar la extrusión de Cl⁻ por la normalización de la expresión en membrana tanto de KCC2 como de NKCC1.

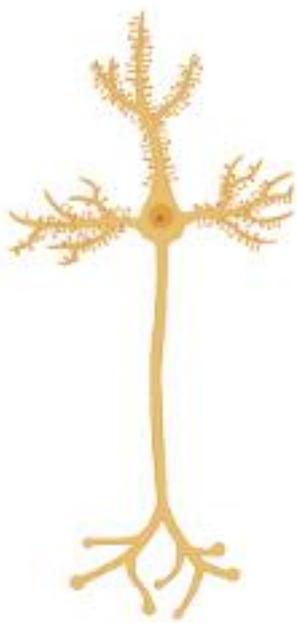
Finalmente, el GMPc extracelular en el grupo control produce un aumento de la anchura, lo cual sería coherente con el incremento del componente negativo del primer análisis, pero este aumento es estadísticamente significativo únicamente a partir de intensidades de estimulación altas (rango 2: 2750-4000 mV). Esto daría lugar también a un aumento del área. En el caso de la amplitud, en

este análisis se ve una clara tendencia del GMPc a aumentar la misma en el grupo control; no obstante, las diferencias no llegan a ser significativas.

La neurotransmission GABAérgica es clave tanto para la memoria como para el aprendizaje. Johanson et al., (2015) demostraron que el compuesto GR3207, un neuroesteroide que reduce la actividad del receptor GABA_A interfiriendo la potenciación de la misma por neuroesteroides como la alopregnanolona y THDOC, restaura tanto la coordinación motora como el aprendizaje y la memoria espacial en ratas hiperamonemias. El aprendizaje y la memoria espacial se modulan esencialmente en hipocampo. Estos resultados apoyan que un aumento de la neurotransmission GABAérgica contribuye al deterioro del aprendizaje y memoria especial en hiperamonemia y que el GMPc extracelular estaría restaurando algunas de las alteraciones en el aprendizaje y la memoria mediante la normalización de la neurotransmission GABAérgica.

También, se ha demostrado que el tratamiento con bicuculina, un antagonista de los receptores GABA_A, en ratas hiperamonemias revierte las alteraciones en el aprendizaje especial y la memoria de trabajo y, además, reduce la ansiedad en este modelo animal.

Tomando todos estos resultados en conjunto podemos decir que la hiperamonemia aumenta la respuesta de los receptores GABA_A al aumentar tanto la amplitud como el área y la anchura de los IPSPs y que el GMPc extracelular normaliza esta respuesta inhibitoria. Además, el GMPc extracelular aumenta el tono GABAérgico en el grupo control, por lo que tendría efectos opuestos en ratas hiperamonémicas y en ratas controles.



CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

1. PAPEL DE LA NEUROINFLAMACIÓN EN LAS ALTERACIONES DE LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA EN HIPOCAMPO DE RATAS HIPERAMONÉMICAS

Los resultados del capítulo 2 demuestran que la hiperamonemia altera la neurotransmisión GABAérgica, tanto la expresión en membrana de receptores GABAA como su funcionalidad. Con el fin de esclarecer los mecanismos moleculares por los que se altera la neurotransmisión GABAérgica en el hipocampo de ratas hiperamonémicas, llevamos a cabo experimentos ex vivo con rodajas frescas de hipocampo para analizar el papel de la neuroinflamación en dichos mecanismos.

1.1. Efecto del bloqueo del receptor de la IL-1 β sobre la neuroinflamación y la neurotransmisión GABAérgica

La IL-1 β es una de las principales citocinas involucradas en procesos neuroinflamatorios. En ratas con hiperamonemia crónica los niveles de esta citocina se encuentran aumentados y se ha demostrado que juega un papel clave en el desarrollo del proceso neuroinflamatorio y en las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica y de la memoria y el aprendizaje (Hernández-Rabaza et al., 2016; Viviani et al., 2006; Taoro-González et al., 2018).

Para evaluar el papel del aumento de IL-1 β y de la activación de su receptor en la inducción de la neuroinflamación y de las alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica en hipocampo de ratas hiperamonémicas, estudiamos el efecto sobre las mismas del bloqueo del receptor de IL-1 con su antagonista endógeno IL-1Ra.

1.1.1. Efecto del bloqueo del receptor de la IL-1 sobre la activación de microglía y astrocitos

La hiperamonemia induce activación de microglía, lo que se traduce en un menor perímetro celular ($100 \pm 5 \mu\text{m}$) respecto al grupo control basal ($159 \pm 4 \mu\text{m}$) ($p < 0.001$). El tratamiento de cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas con IL-1Ra revierte esta activación ($p < 0.001$), aumentando el perímetro de las células teñidas con Iba1 ($201 \pm 20 \mu\text{m}$). En el grupo control, el bloqueo del receptor de la IL-1 activa la microglía ($p < 0.05$), disminuyendo el perímetro ($140 \pm 6 \mu\text{m}$) (Figura 38).

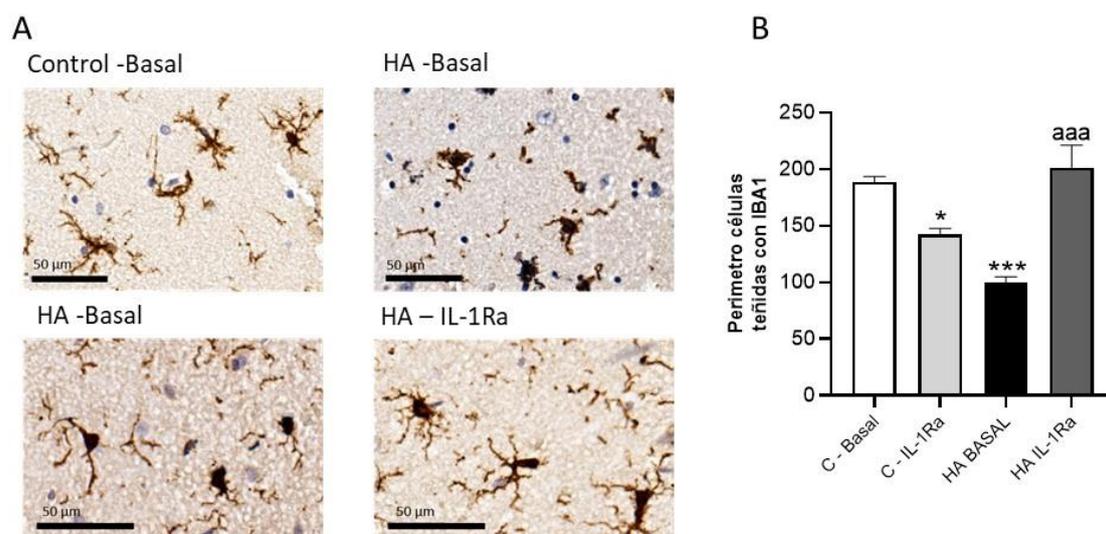


Figura 38. La hiperamonemia induce activación de la microglía en el hipocampo y el tratamiento con IL-1Ra revierte dicha activación. Se tiñó la microglía con un anticuerpo contra Iba1 en cortes de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas (HA) tratadas o no ex vivo con IL-1Ra. Se analizó el perímetro de las células teñidas con Iba1. Se muestran imágenes representativas, la escala mostrada es de 50µm. Los valores son la media ± SEM de 4 ratas por grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a los cortes de hipocampo de ratas con hiperamonemia crónica (^{aaa} $p < 0.01$).

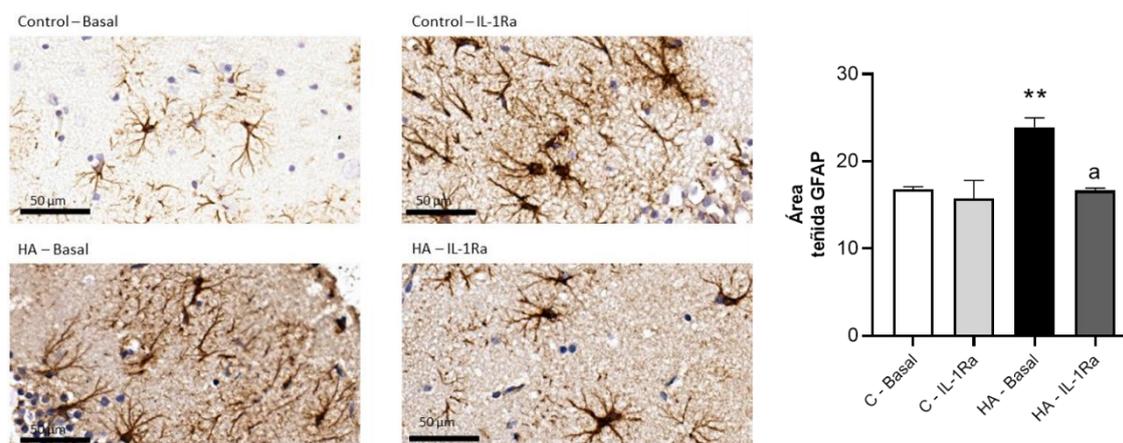


Figura 39. La hiperamonemia induce activación de astrocitos en el hipocampo y el tratamiento con IL-1Ra revierte dicha activación. Se tiñeron los astrocitos con un anticuerpo contra GFAP en cortes de hipocampo de ratas controles e hiperamonémicas (HA) tratadas o no con IL-1Ra. Se analizó el porcentaje de área teñida por anti-GFAP. Se muestran imágenes representativas, la escala mostrada es de 50 µm de longitud. Los valores son la media ± SEM de 4-5 ratas por grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a los cortes de hipocampo de ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

En el proceso de activación los astrocitos emiten prolongaciones que hacen que aumente tanto el perímetro como el área. La hiperamonemia activa los astrocitos, aumentando el porcentaje del área teñida con GFAP ($24 \pm 1\%$; $p < 0.001$) respecto al grupo control ($16 \pm 0.3\%$). El tratamiento con IL-1Ra revierte la activación de astrocitos ($p < 0.01$), disminuyendo el porcentaje de área teñida con GFAP ($17 \pm 0.3\%$). El bloqueo del receptor de IL-1 en el grupo control no afecta a la

activación de astrocitos, manteniendo el porcentaje de área teñida con GFAP ($16 \pm 2\%$), que no es diferente del grupo control basal ($p > 0.05$) (Figura 39).

1.2. Efecto del bloqueo del receptor de la IL-1 β sobre los niveles de GABA, GAD-65 y GAD-67

Puesto que se ha visto que la IL-1 β es clave en algunas de las alteraciones observadas en la neurotransmisión glutamatérgica en el hipocampo de ratas hiperamonémica, estudiamos si esta citocina también juega un papel en la modulación de la neurotransmisión GABAérgica. Con el fin de estudiar si la IL-1 β tiene algún efecto sobre los niveles totales de GABA, se analizó el efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre el contenido de GABA en rodajas de hipocampo.

El bloqueo del receptor de la IL-1 normaliza el contenido total de GABA en cortes de hipocampo procedentes de ratas hiperamonémicas aumentándolo del $65 \pm 8\%$ al $132 \pm 13\%$ respecto del de ratas control ($F = 8.4$; $p < 0.01$) (Figura 40 A).

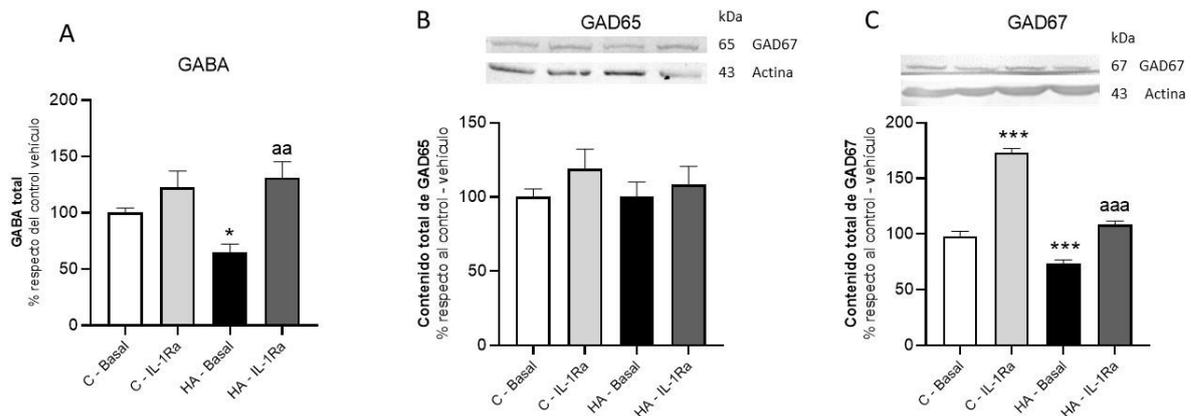


Figura 40. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre el contenido de GABA (A), GAD65 (B) y GAD67 (C) en hipocampo. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin IL-1Ra. El contenido de GABA se analizó por HPLC y el de GAD65 y GAD67 por western blot, como se describe en métodos. En A y B los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía. En C los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los valores son la media \pm SEM de 7-14 ratas por grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$; ^{aaa} $p < 0.01$).

También se estudió el efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre el contenido total de GAD-65 y GAD-67, analizados por inmunoblot. La hiperamonemia no altera el contenido total de GAD-65 y el bloqueo del receptor de la IL-1 mediante el tratamiento con IL-1Ra no afecta su contenido ni en cortes de hipocampo de ratas control ($119 \pm 13\%$ respecto a las ratas control) ($F = 0.7872$, $p > 0.05$) ni de ratas hiperamonémicas ($108 \pm 12\%$) (Figura 40 B). Sin embargo, en el caso de GAD-67 la hiperamonemia disminuye el contenido y el tratamiento con IL-1Ra lo normaliza, aumentándolo hasta valores similares a los observados en el grupo control basal ($H =$

20.64, $p < 0.05$; $109 \pm 3 \%$). En el grupo control el bloqueo del receptor de la IL-1 aumenta el contenido de GAD-67 ($173 \pm 4 \%$) (Figura 40 C).

1.3. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A en hipocampo.

La hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A ($126 \pm 9 \%$) y el bloqueo del receptor de la IL-1 revierte este aumento ($87 \pm 17 \%$, $p < 0.05$). En el grupo control el tratamiento con IL-1Ra aumenta la expresión en membrana de $\alpha 1$ ($147 \pm 23 \%$) (Figura 41 A). En el caso de la subunidad $\alpha 2$ del receptor GABA_A el bloqueo del receptor de la IL-1 normaliza la expresión en membrana en ratas hiperamonémicas desde $197 \pm 34 \%$ hasta valores similares a los del grupo control ($61 \pm 15 \%$; $F = 9.129$, $p < 0.01$). En el grupo control, el tratamiento con IL-1Ra no altera la expresión en membrana de la subunidad $\alpha 2$ ($71 \pm 18 \%$) (Figura 41 B). En el caso de la subunidad $\alpha 5$ del receptor GABA_A, el bloqueo del receptor de la IL-1 en el grupo hiperamonemia no revierte la disminución de la expresión en membrana ($78 \pm 15 \%$; $H = 27.74$, $p > 0.05$). El tratamiento con IL-1Ra en el grupo control no altera la expresión en membrana de $\alpha 5$ ($126 \pm 12 \%$, $p > 0.05$) (Figura 41 C).

La hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A ($180 \pm 22 \%$) y el tratamiento con IL-1Ra lo normaliza ($45 \pm 16 \%$; $H = 20.99$, $p < 0.01$). El bloqueo del receptor de IL-1 en las ratas control aumenta la expresión en membrana de la subunidad $\gamma 2$ ($203 \pm 29 \%$, $p < 0.05$) (Figura 41 D). En el caso de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A el tratamiento con IL-1Ra reduce la expresión en membrana en ratas hiperamonémicas ($79 \pm 16 \%$; $H = 14.12$, $p < 0.05$), revirtiendo su aumento ($150 \pm 13 \%$). En el caso del grupo control, el tratamiento con IL-1Ra tiende a disminuir la expresión en membrana de la subunidad $\beta 3$, pero las diferencias no llegan a ser significativas ($74 \pm 13 \%$) (Figura 41 E). Además, el bloqueo del receptor de IL-1 disminuye la expresión en membrana de la subunidad δ del receptor GABA_A ($74 \pm 13 \%$; $F = 5.164$, $p < 0.05$), revirtiendo el aumento producido por la hiperamonemia ($197 \pm 24 \%$). El tratamiento con IL-1Ra en el grupo control no altera la expresión en membrana de la subunidad δ ($143 \pm 32 \%$).

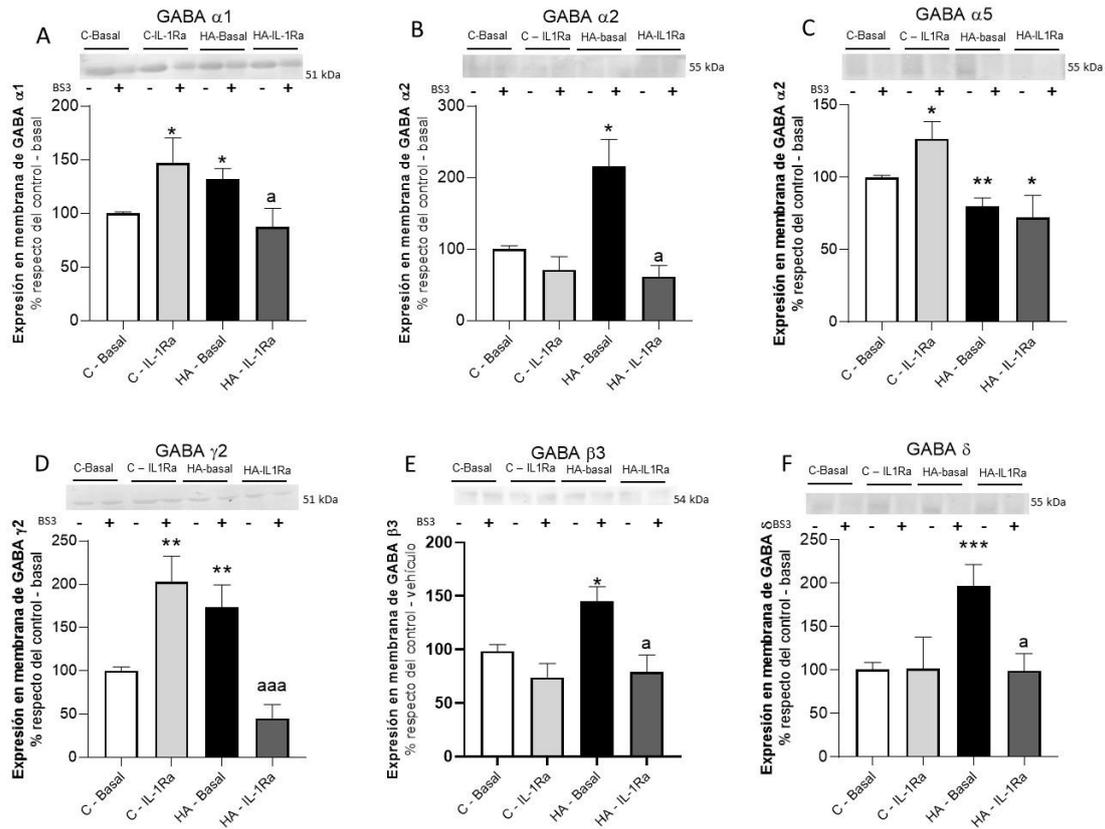


Figura 41. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A: $\alpha 1$ (A), $\alpha 2$ (B), $\alpha 5$ (C), $\gamma 2$ (D), $\beta 3$ (E) y δ (F). Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin IL-1Ra. La expresión en membrana se analizó por western blot como se describe en métodos. Todos los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los valores son la media \pm SEM de 7-10 ratas por grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$; ^{aaa} $p < 0.001$).

En resumen, el bloqueo del receptor de IL-1 revierte los aumentos de la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ y δ inducidos por la hiperamonemia, pero no revierte la disminución de la expresión en membrana de $\alpha 5$. En las ratas control el bloqueo del receptor de IL-1 aumenta la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 5$ y $\gamma 2$ y no afecta a la de $\alpha 2$, $\beta 3$ y δ .

1.4. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre la fosforilación de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A en los residuos S408/S409

El tratamiento con IL-1Ra revierte el aumento en la fosforilación en los residuos de serina 408 y 409 de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A (81 ± 11 % de las ratas control; $H = 12.24$, $p < 0.05$). El bloqueo del receptor de IL-1 en el grupo control tiende a aumentar la fosforilación de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A, pero las diferencias no son estadísticamente significativas (158 ± 52 %) (Figura 42).

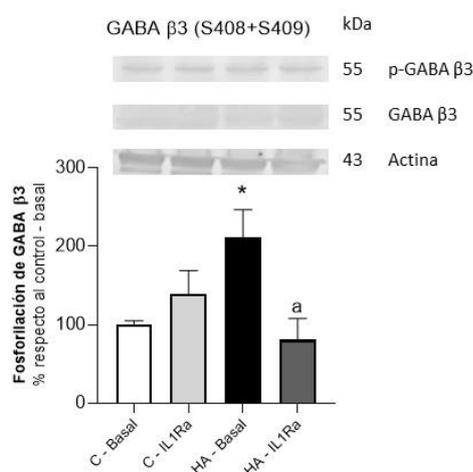


Figura 42. El bloqueo del receptor de la IL-1 β disminuye la fosforilación de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A en hipocampo de ratas hiperamonémicas. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin IL-1Ra. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 4-6 ratas por grupo. Los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

1.5. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre el contenido total gephyrin

El bloqueo del receptor de IL-1 revierte el aumento producido por la hiperamonemia (121 ± 5 %) en el contenido de gephyrin normalizándolo al 107 ± 3 % ($F = 7.357$, $p < 0.05$) de las ratas control. En el grupo control, el tratamiento con IL-1Ra aumenta el contenido de gephyrin (127 ± 9 %, $p < 0.05$) (Figura 43).

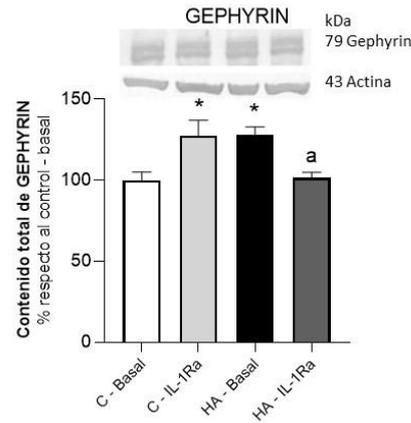


Figura 43. Efecto del bloqueo del receptor de la IL-1 sobre el contenido total de gephyrin en hipocampo de ratas control e hiperamonémicas. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin IL-1Ra. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 6-10 ratas por grupo. Los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control ($* p < 0.05$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica ($^a p < 0.05$).

1.6. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre el contenido y la expresión en membrana de transportadores GABA

El contenido total tanto de GAT-1 como de GAT-3 aumentan en hiperamonemia crónica y el tratamiento con IL-1Ra normaliza el contenido total de GAT-1 ($F = 6.766$, $p < 0.05$), disminuyendolo hasta valores similares a los del grupo control (87 ± 13 %). El bloqueo del receptor de la IL-1 en el grupo control no altera el contenido de GAT-1 (80 ± 9 %, $p > 0.05$) (Figura 44 A). El tratamiento con IL-1Ra revierte el aumento del contenido de GAT-3 producido por la hiperamonemia ($F = 10.17$, $p < 0.05$), disminuyendolo hasta valores similares a los del grupo control (83 ± 9 %). El bloqueo del receptor de IL-1 en el grupo control disminuye el contenido de GAT-3 respecto a condiciones basales (65 ± 8 %, $p < 0.05$) (Figura 44 B).

El tratamiento con IL-1Ra en cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas normaliza la expresión en membrana de GAT-1 ($H = 17.68$, $p < 0.05$), aumentandola hasta valores similares a los del grupo control (115 ± 22 %). En el grupo control el bloqueo del receptor de la IL-1 aumenta la expresión en membrana de GAT-1 (176 ± 33 %) (Figura 44 C). El bloqueo del receptor de IL-1 normaliza la expresión en membrana de GAT-3 en cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas ($F = 5.921$, $p < 0.05$), aumentandola hasta un 118 ± 24 %. En el grupo control el tratamiento con IL-1Ra disminuye la expresión en membrana de GAT-3 (45 ± 12 %) (Figura 44 D).

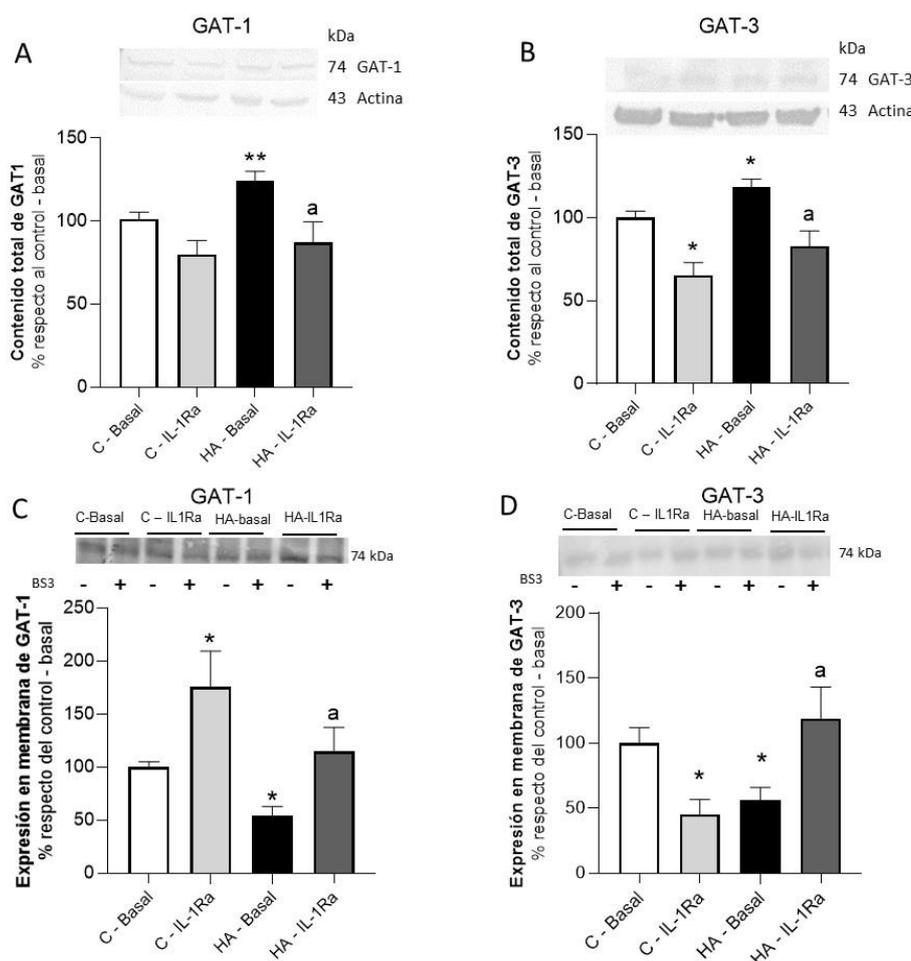


Figura 44. Efecto del bloqueo del receptor de la IL-1 sobre el contenido total de GAT-1 (A) y GAT-3 (B) y sobre la expresión en membrana (C, D) de GAT-1 y GAT-3. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin IL-1Ra. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. Los valores son la media \pm SEM de 4-8 ratas por grupo. En D los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. En el resto de casos los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

1.7. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre la expresión en membrana de transportadores de Cl⁻

La hiperamonemia disminuye la expresión en membrana de KCC2 ($55 \pm 7\%$) y el bloqueo del receptor de IL-1 revierte esta alteración, aumentando la expresión en membrana hasta valores similares a los del grupo control ($107 \pm 24\%$; $F = 12.84$, $p < 0.05$). En el grupo control el bloqueo del receptor de IL-1 no altera la expresión en membrana de KCC2 ($115 \pm 14\%$, $p > 0.05$) (Figura 45 A). En el caso de NKCC1, el tratamiento con IL-1Ra en cortes de ratas hiperamonémicas no revierte el aumento de la expresión en membrana ($H = 10.41$, $p > 0.05$), manteniendo los niveles de expresión de NKCC1 ($137 \pm 11\%$ de las ratas control). En el grupo control el bloqueo del

receptor de la IL-1 no altera la expresión en membrana de NKCC1 ($103 \pm 19 \%$, $p > 0.05$) (Figura 45 B).

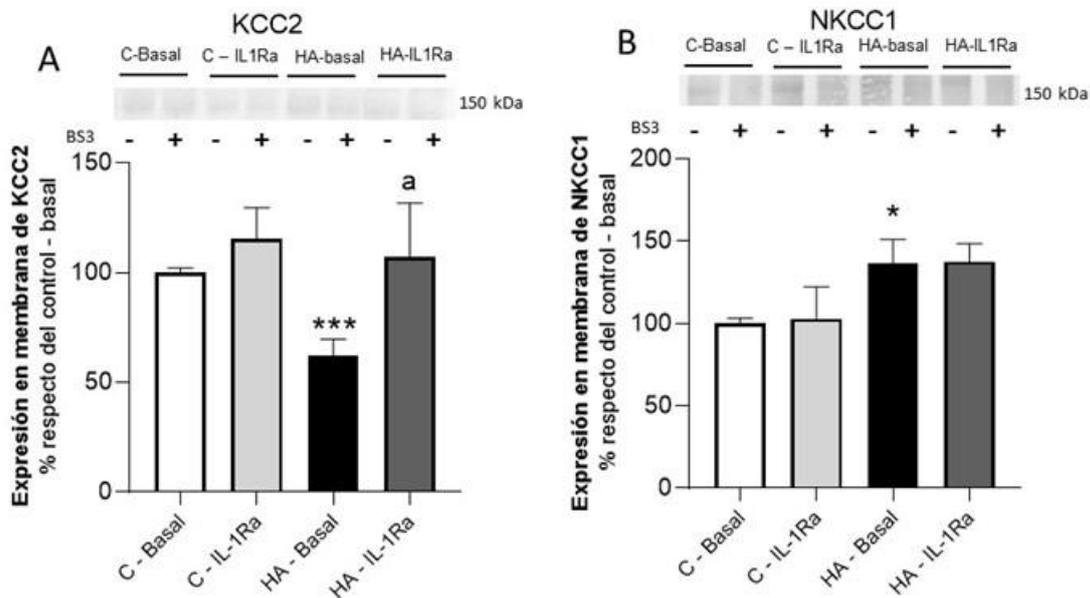


Figura 45. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre la expresión en membrana de KCC2 (A) y NKCC1 (B). Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin IL-1Ra. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. Los valores son la media \pm SEM de 6-10 ratas por grupo. En A los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. En B los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

1.8. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre el contenido total de IL-1 β , CC12 y BDNF

Puesto que la hiperamonemia crónica induce neuroinflamación y aumenta la IL-1 β que, a través de su receptor, media algunas de las alteraciones en la neurotransmisión y en la memoria y aprendizaje (Taoro-González et al., 2019) analizamos si el bloqueo del receptor de IL-1 reduce también la neuroinflamación y normaliza el contenido en hipocampo de IL-1 β , CC12 y/o BDNF.

El bloqueo del receptor de IL-1 revierte los aumentos producidos por la hiperamonemia en el contenido total de IL-1 β (Figura 46 A) BDNF (Figura 46 B) y CC12 (Figura 46 C) disminuyendo su contenido hasta valores similares a los del grupo control ($82 \pm 8 \%$, $88 \pm 7 \%$ y $102 \pm 10 \%$, respectivamente). En el grupo control el bloqueo del receptor de IL-1 no tiene ningún efecto sobre el contenido de IL-1 β , CC12 y BDNF.

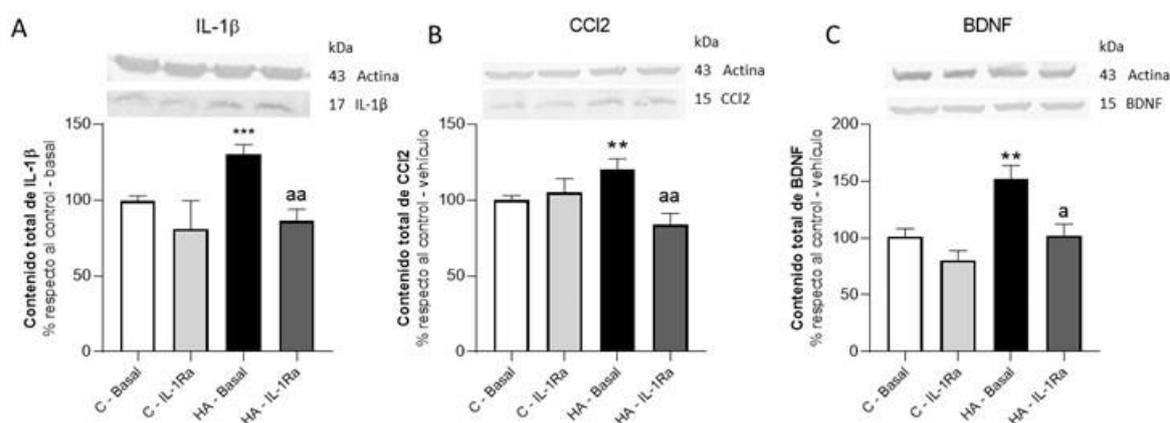


Figura 46. El bloqueo del receptor de la IL-1 revierte los aumentos inducidos por la hiperamonemia en el contenido de IL-1 β (A), CCL2 (B) y BDNF (C). Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin IL-1Ra. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. Los valores son la media \pm SEM de 6-10 ratas por grupo. En A los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. En B y C los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

1.9. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre la fosforilación de Src, Akt, CREB y p38

Taoro-González et al., (2018) demostraron que en el hipocampo de ratas hiperamonémicas la activación del receptor de la IL-1 lleva a la activación de Src, lo que aumenta su fosforilación en el residuo de tirosina 418, y activa una cascada de señalización que modula la expresión en membrana de algunas subunidades de los receptores AMPA y NMDA. En la presente tesis hemos estudiado el efecto de diferentes tratamientos sobre la fosforilación de Src, que podría estar mediando algunas de las alteraciones observadas en la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

Entre las cascadas de señalización activadas por el receptor de la IL-1, encontramos la de la PI3K/Akt. Algunos estudios han demostrado que la activación de esta vía modula la inserción de receptores GABA_A en membrana, en un proceso dependiente de fosforilación, y que esta vía se encuentra alterada en encefalopatía (Serantes et al., 2006). La proteinquinasa Akt se activa cuando se fosforila en el residuo de serina 478, estudiamos los niveles de fosforilación de Akt en hipocampo de ratas hiperamonémicas; con el fin de analizar su posible papel en las alteraciones en la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A en hiperamonemia y en su reversión por el bloqueo del receptor de IL-1.

En hipocampo de ratas hiperamonémicas hay un aumento de BDNF, cuya producción por la microglía activada implica la activación de la proteína quinasa MAPK p38 por la fosforilación en

los residuos Thr180/Tyr182 (Katoh-Semba et al., 2009). Analizamos también dicha fosforilación en el hipocampo de ratas control e hiperamonémicas.

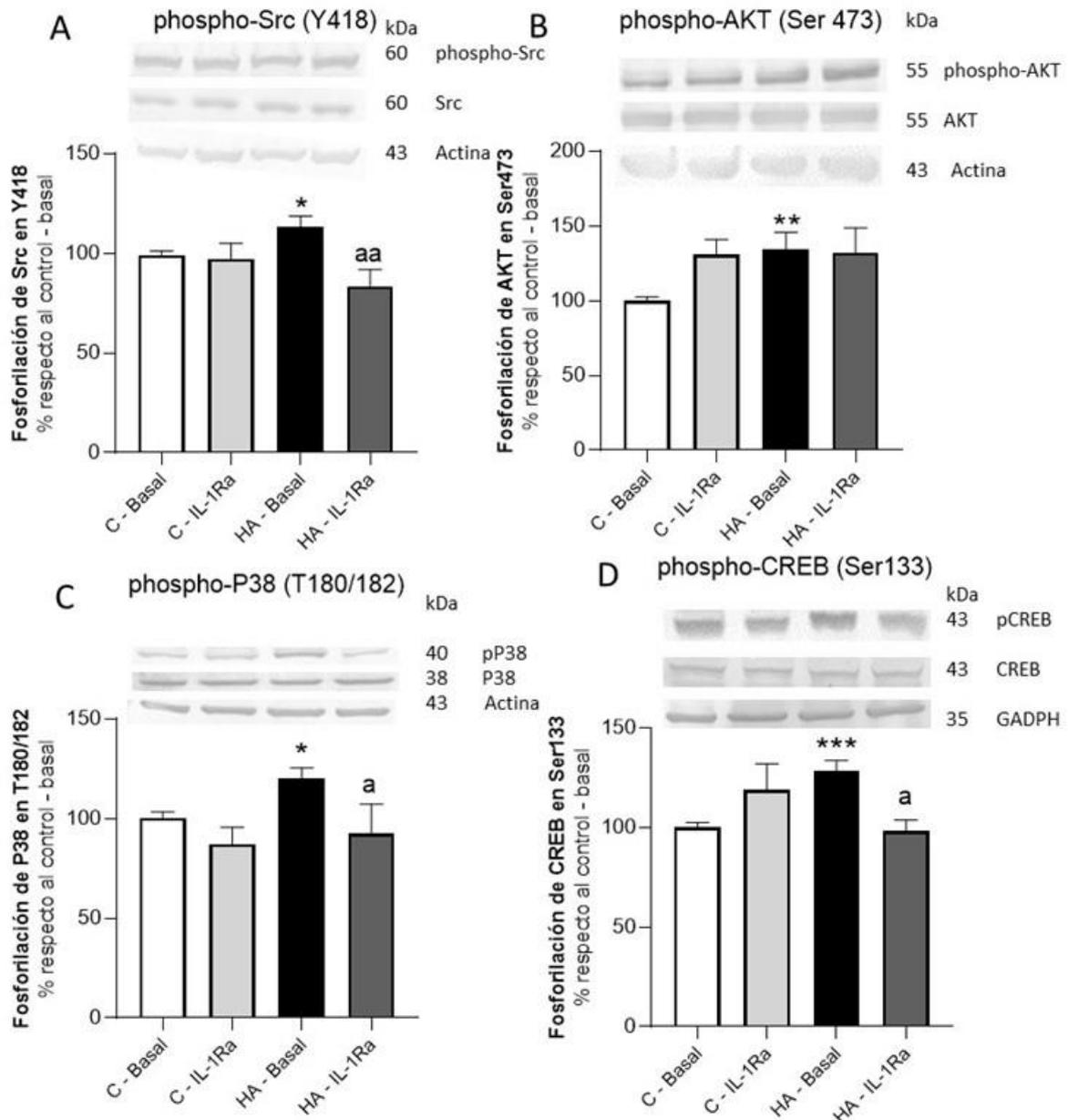


Figura 47. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre la fosforilación de Src en Y418 (A), de Akt en Ser473 (B), de CREB en Ser133 (C) y de P38 en T180/182 (D). Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin IL-1Ra. Los valores son la media \pm SEM de 5-8 ratas por grupo. En A, B y D los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. En C los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

Por otro lado, la activación del receptor de IL-1 activa cascadas de señalización que culminan con la fosforilación (en el residuo de serina 133) y activación del factor de transcripción CREB, que modula la expresión de diferentes genes. la neuroinflamación, la plasticidad sináptica, así como

el aprendizaje y la memoria (Sakamoto et al., 2011; Qin et al., 2016; Sharma et al., 2020). La vía PKC/CREB regula la expresión de diferentes subunidades del receptor GABA_A en neuronas del hipocampo. Por ello, también analizamos los niveles de fosforilación de CREB en hiperamonemia, así como el efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre los mismos,

Los resultados obtenidos muestran que la hiperamonemia aumenta la fosforilación de Src en el residuo Y418 ($123 \pm 8\%$; $F = 4.345$, $p < 0.05$) y el bloqueo del receptor de IL-1 revierte este aumento ($p < 0.05$), disminuyendo su fosforilación hasta niveles similares a los del grupo control ($84 \pm 8\%$). En el grupo control el tratamiento con IL-1Ra no altera la fosforilación de Src ($97 \pm 8\%$, $p > 0.05$) (Figura 47 A). En el caso de Akt, la hiperamonemia aumenta su fosforilación en el residuo de serina 473 ($134 \pm 11\%$; $F = 4.405$, $p < 0.01$) y el bloqueo del receptor de IL-1 no normaliza este aumento ($p > 0.05$), manteniendo niveles de fosforilación similares a los observados en hiperamonemia basal ($132 \pm 17\%$). En el grupo control el tratamiento con IL-1Ra no tiene ningún efecto sobre la fosforilación de Akt en el residuo Ser473 ($130 \pm 10\%$, $p > 0.05$) (Figura 47 B).

En el caso de p38, la hiperamonemia aumenta la fosforilación de su residuo T180/182 ($120 \pm 5\%$; $F = 23.26$, $p < 0.05$) respecto al grupo control y el bloqueo del receptor de IL-1 revierte este aumento ($p < 0.01$) reduciendo su fosforilación a valores similares a los observados en el grupo control ($92 \pm 14\%$). En el grupo control el tratamiento con IL-1Ra no altera la fosforilación de p38 en T180/182 ($93 \pm 14\%$) (Figura 47 C). La hiperamonemia aumenta la fosforilación del factor CREB en el residuo de serina 133 ($128 \pm 5\%$; $H = 20.85$, $p < 0.01$) respecto al grupo control y el tratamiento con IL-1Ra la normaliza ($98 \pm 6\%$, $p < 0.05$). En el grupo control el bloqueo del receptor de la IL-1 no altera la fosforilación de CREB ($119 \pm 13\%$) (Figura 47 D).

2. EFECTO DEL BLOQUEO DEL RECEPTOR DE LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN Y LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA

Algunos estudios demuestran que la esfingosina-1-fosfato a través de su receptor S1PR2 modula tanto la neurotransmisión como la neuroinflamación en diferentes patologías y modelos animales (Karunakaran et al., 2017). Sin embargo, hasta el momento no se sabe cuál es el efecto del receptor S1PR2 en la modulación de la neurotransmisión GABAérgica y la neuroinflamación en hiperamonemia crónica. Con el fin de estudiar el papel que juega el receptor S1PR2 en la modulación de la neuroinflamación y la neurotransmisión GABAérgica en condiciones de hiperamonemia crónica se incubaron cortes de hipocampo ex vivo de ratas control e hiperamonémicas con o sin JTE013, un antagonista del receptor S1PR2.

2.1. Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre la activación de microglía y astrocitos

El tratamiento de cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas con JTE013 revierte la activación de la microglía ($p < 0.001$), aumentando el perímetro de las células teñidas con Iba1 ($187 \pm 27 \mu\text{m}$; $F = 14.24$, $p < 0.01$). En el control, el bloqueo de S1PR2 no afecta a la activación de la microglía ($169 \pm 14 \mu\text{m}$; $p > 0.05$) (Figura 48).

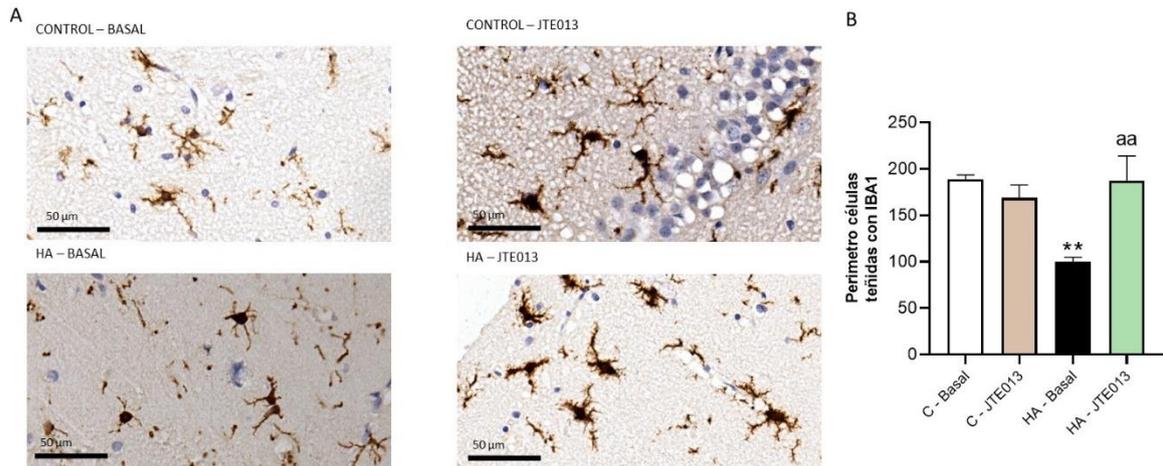


Figura 48. La hiperamonemia induce activación de la microglía en el hipocampo y el tratamiento con JTE013 revierte dicha activación. Se tiñó la microglía con un anticuerpo contra Iba1 en cortes de hipocampo de ratas controles e hiperamonémicas (HA) tratadas o no con JTE013. Se analizó el perímetro de las células teñidas con Iba1. Se muestran imágenes representativas, la escala mostrada es de $50 \mu\text{m}$. Los valores son la media \pm SEM de 5-8 ratas por grupo. Los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a los cortes de hipocampo de ratas con hiperamonemia crónica (aa $p < 0.01$).

En el caso de la activación de astrocitos, el tratamiento con JTE013 revierte la activación de astrocitos producida por la hiperamonemia, disminuyendo el porcentaje de área teñida con GFAP ($13 \pm 1 \%$; $F = 41$, $p < 0.001$). En el grupo control el bloqueo del receptor S1PR2 induce activación de astrocitos, aumentando el porcentaje de área teñida con GFAP ($23 \pm 0.1 \%$; $p < 0.05$) en comparación con el grupo control (Figura 49).

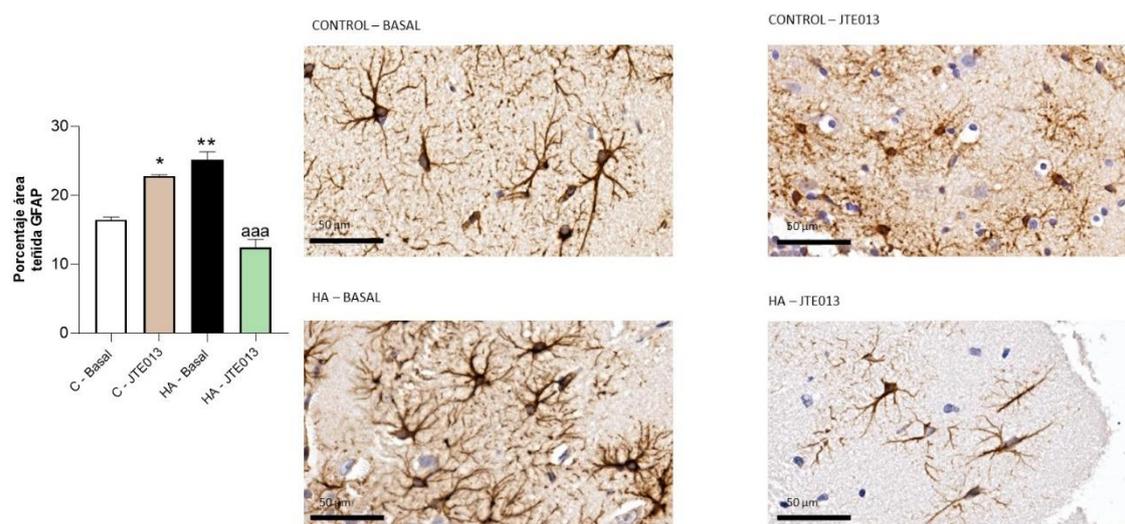


Figura 49. La hiperamonemia induce activación de astrocitos en el hipocampo y el tratamiento con JTE013 revierte dicha activación. Se tiñeron los astrocitos con un anticuerpo contra GFAP en cortes de hipocampo de ratas controles e hiperamonémicas (HA) tratadas o no con JTE013. Se analizó el porcentaje de área teñida con anti-GFAP. La escala mostrada es de 50µm de longitud. Los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los valores son la media \pm SEM de 5 ratas por grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a los cortes de hipocampo de ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

2.2. Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre los niveles de GABA, GAD-65 y GAD-67

El bloqueo del receptor S1PR2 con JTE013 revierte la disminución en el contenido de GABA en hipocampo producido por la hiperamonemia, aumentando el contenido total de GABA hasta niveles similares a los observados en el grupo control ($110 \pm 10 \%$; $F = 9.182$, $p < 0.05$). En el grupo control, el bloqueo del receptor S1PR2 disminuye el contenido de GABA hasta valores similares a los observados en ratas hiperamonémicas ($69 \pm 7 \%$, $p < 0.01$) (Figura 50 A).

El bloqueo del receptor S1PR2 no afecta al contenido de GAD65 en cortes de hipocampo de ratas hiperamonémicas ($103 \pm 7 \%$; $F = 0.09$, $p > 0.05$) ni en ratas control ($99 \pm 4 \%$, $p > 0.05$) (Figura 50 B). En el caso de GAD67, el bloqueo del receptor S1PR2 normaliza el contenido de GAD67 en ratas hiperamonémicas, aumentándolo hasta valores similares a los del grupo control ($97 \pm 3 \%$; $F = 6.63$, $p < 0.05$). En el grupo control el bloqueo del receptor S1PR2 no altera el contenido de GAD67 ($107 \pm 4 \%$, $p > 0.05$) (Figura 50 C).

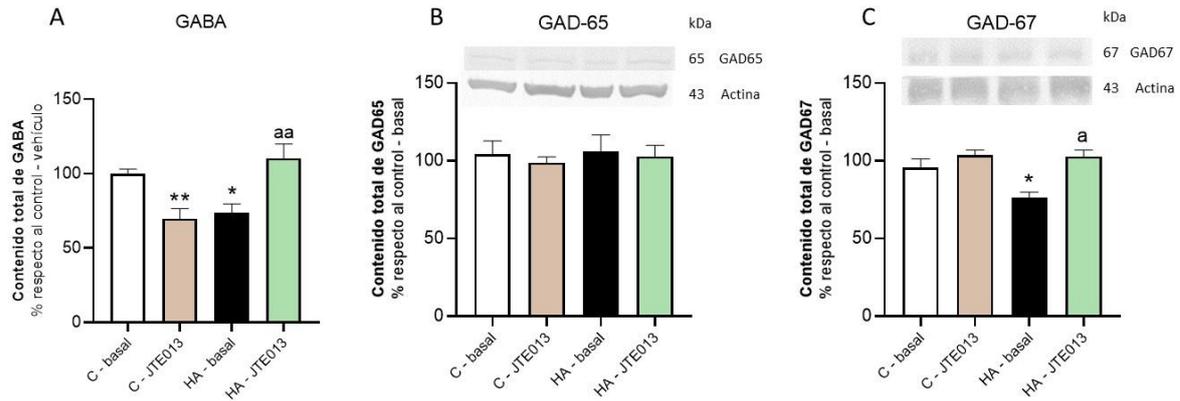


Figura 50. Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre el contenido total de GABA (A), GAD65 (B) y GAD67 (C) en hipocampo. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin JTE013. El contenido total de GABA se analizó por HPLC y el de GAD65 y GAD67 por western blot como se describe en el apartado de métodos. Los valores son la media \pm SEM de 4-8 ratas por grupo. Todos los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

2.3. Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A en hipocampo

El bloqueo del receptor S1PR2 revierte el aumento de la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$ ($91 \pm 9 \%$; $F = 6.93$, $p < 0.05$), $\alpha 2$ ($38 \pm 10 \%$; $H = 18.7$, $p < 0.01$), $\gamma 2$ ($101 \pm 16 \%$; $F = 7.29$, $p < 0.05$), $\beta 3$ ($104 \pm 12 \%$; $F = 7$, $p < 0.05$) y δ ($77 \pm 19 \%$; $F = 14.76$, $p < 0.05$) del receptor GABA_A, pero no revierte la disminución en la expresión en membrana de la subunidad $\alpha 5$ del receptor GABA_A observada en ratas con hiperamonemia ($81 \pm 17 \%$). En el grupo control el tratamiento con JTE013 no tiene ningún efecto sobre la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A (Figura 51).

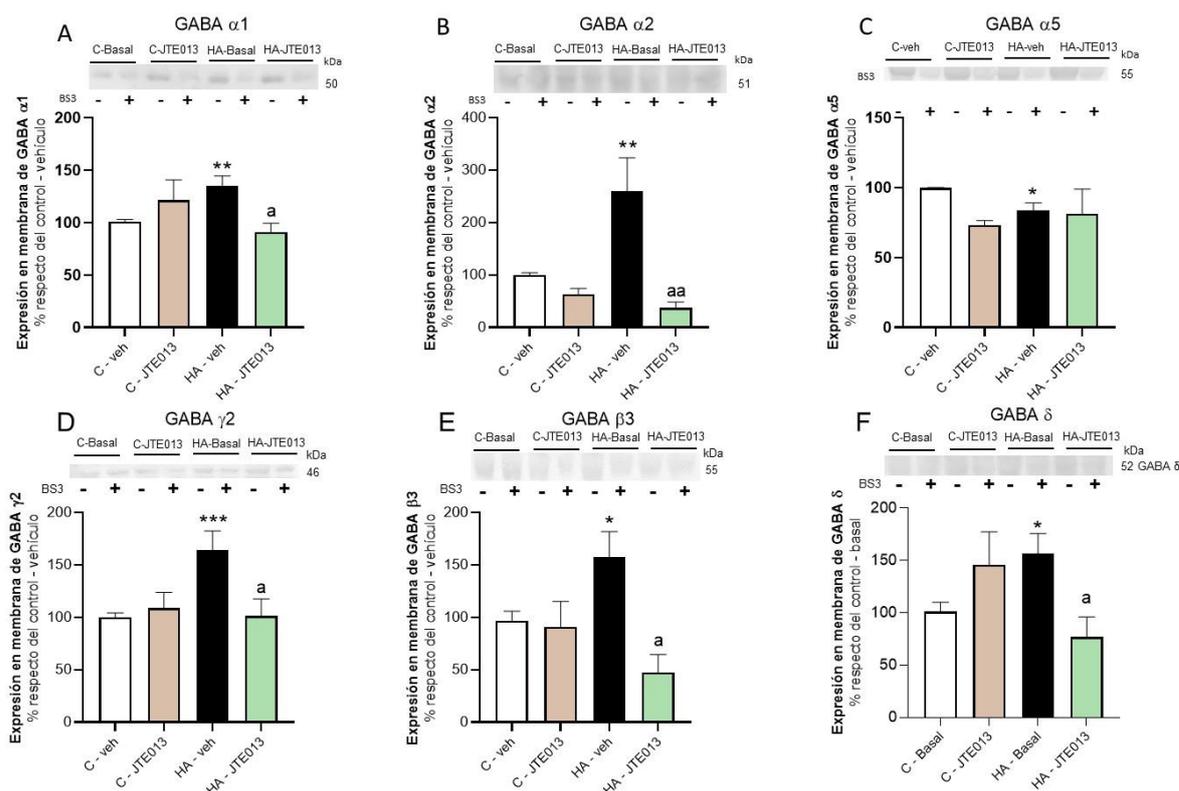


Figura 51. Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A: α 1 (A), α 2 (B), α 5 (C), γ 2 (D), β 3 (E) y δ (F). Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin JTE013. La expresión en membrana se analizó por western blot como se describe en métodos. En A, C, D, E y F los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. En B los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los valores son la media \pm SEM de 7-10 ratas por grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

2.4. Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre la fosforilación de la subunidad β 3 del receptor GABA_A en los residuos S408/S409

El tratamiento con JTE013 revierte el aumento en la fosforilación de los residuos de serina 408 y 409 de la subunidad β 3 del receptor GABA_A (77 ± 12 %; $H = 16.12$, $p < 0.01$). El bloqueo del receptor S1PR2 en el grupo control no altera la fosforilación de la subunidad β 3 del receptor GABA_A, manteniendo los niveles similares a los del grupo control (117 ± 16 %) (Figura 52).

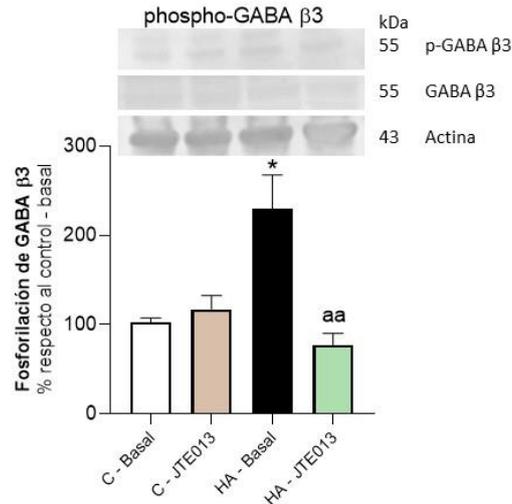
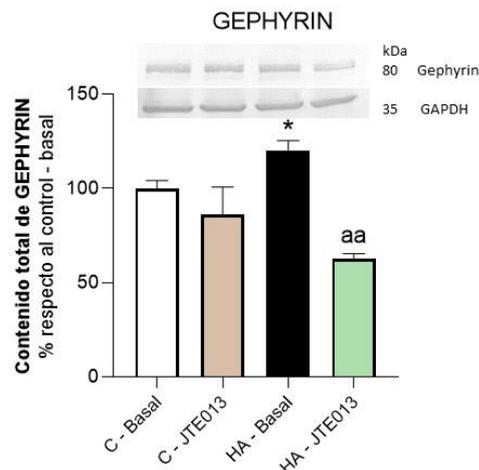


Figura 52. El bloqueo del receptor S1PR2 normaliza la fosforilación de la subunidad β3 del receptor GABA_A en hipocampo de ratas control e hiperamonémicas. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin JTE013. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. Los valores se representan en porcentaje respecto a las ratas control. Los valores son la media ± SEM de 4-6 ratas por grupo. Los datos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

2.5. Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre el contenido de gephyrin



3.

Figura 53. El bloqueo del receptor S1PR2 revierte el aumento del contenido de gephyrin en hipocampo de ratas hiperamonémicas. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin JTE013. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media ± SEM de 4-8 ratas por grupo. Los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.05$).

El tratamiento con JTE013 revierte (62 ± 3 % de las ratas control; $F = 7.9$, $p < 0.01$) el aumento de gephyrin producido por la hiperamonemia (120 ± 5 %). En el grupo control el bloqueo del receptor S1PR2 no tiene ningún efecto sobre el contenido de gephyrin (86 ± 14 %) (Figura 53).

2.6. Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre el contenido total y la expresión en membrana de transportadores GABA

El tratamiento con JTE013 revierte el aumento en el contenido de GAT-1 (96 ± 9 %; $F = 6.75$, $p < 0.05$) y GAT-3 (96 ± 9 %; $F = 5.5$, $p < 0.01$) producido por la hiperamonemia. En el grupo control el tratamiento con JTE013 no afecta al contenido total de GAT-1 y GAT-3 (Figura 54 A y B).

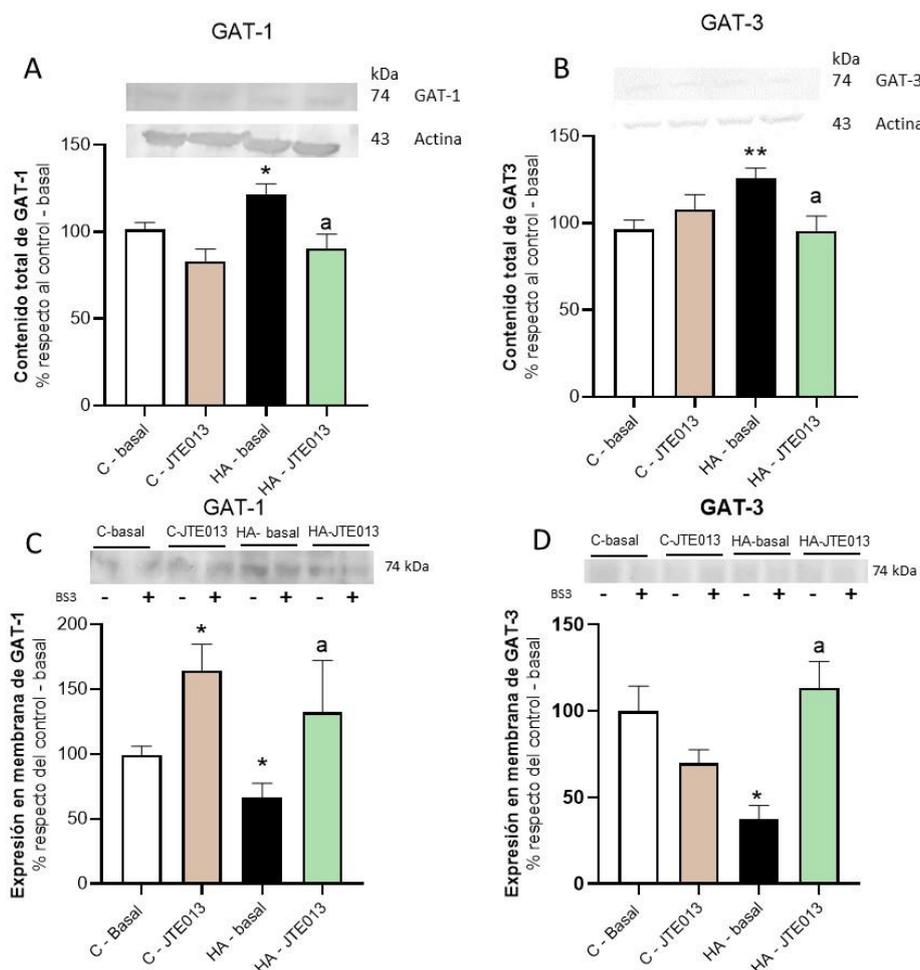


Figura 54. Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre el contenido total de GAT-1 (A) y GAT-3 (B) y sobre la expresión en membrana (C, D) de GAT-1 y GAT-3. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin JTE013. Las muestras se analizaron por western blot como se describe en métodos. Los datos representan en porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 5-8 ratas por grupo. Todos los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

El bloqueo del receptor S1PR2 revierte la disminución producida por la hiperamonemia en la expresión en membrana de GAT-1, aumentandola a un 132 ± 40 % de la de ratas control ($F = 8.16$, $p < 0.05$) y la de GAT-3, que aumenta hasta un 112 ± 12 % respecto a la de ratas control ($H = 12.17$, $p < 0.05$). En el grupo control el tratamiento con JTE013 aumenta la expresión en membrana de GAT-1 ($165 \pm 20\%$, $p < 0.05$) (Figura 54 D y E).

2.7. Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre la expresión en membrana de transportadores de Cl^-

El tratamiento con JTE013 en cortes de ratas hiperamonémicas revierte la disminución en la expresión en membrana de KCC2 (119 ± 26 %; $F = 32.43$, $p < 0.05$), revirtiendo los niveles de expresión de KCC2 a valores similares a los del grupo control basal. En el grupo control el bloqueo del receptor S1PR2 aumenta la expresión en membrana de KCC2 (266 ± 42 %, $p < 0.001$) (Figura 55 A). La hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de NKCC1 ($138 \pm 13\%$) y el bloqueo del receptor de la S1PR2 revierte esta alteración (57 ± 12 %; $F = 7.83$, $p < 0.05$). En el grupo control el tratamiento con JTE013 no altera significativamente la expresión en membrana de NKCC1 (57 ± 13 %, $p > 0.05$) (Figura 55 B).

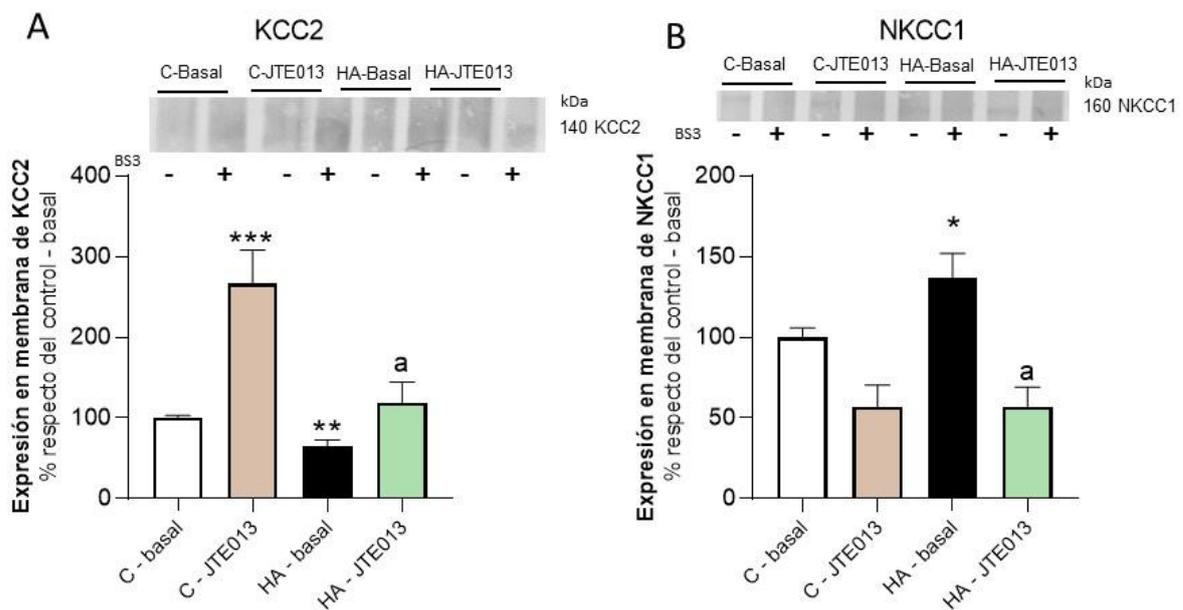


Figura 55. Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre la expresión en membrana de KCC2 (A) y NKCC1 (B). Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin JTE013. La expresión en membrana se analizó por western blot como se describe en métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 6 – 9 ratas por grupo. En A los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. En B los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

2.8. Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre el contenido de IL-1 β , CCI2 y BDNF

El bloqueo del receptor S1PR2 revierte el aumento producido por la hiperamonemia en el contenido total de IL-1 β (81 ± 17 %, Figura 56A), CCI2 (60 ± 23 %, Figura 54B) y BDNF (90 ± 11 %, Figura 54C). En el grupo control el tratamiento con JTE013 no tiene ningún efecto sobre el contenido de IL-1 β (89 ± 14 %, Figura 54A) o de BDNF (104 ± 20 %, Figura 56C), pero disminuye el contenido de CCI2 (37 ± 17 %, Figura 56 B).

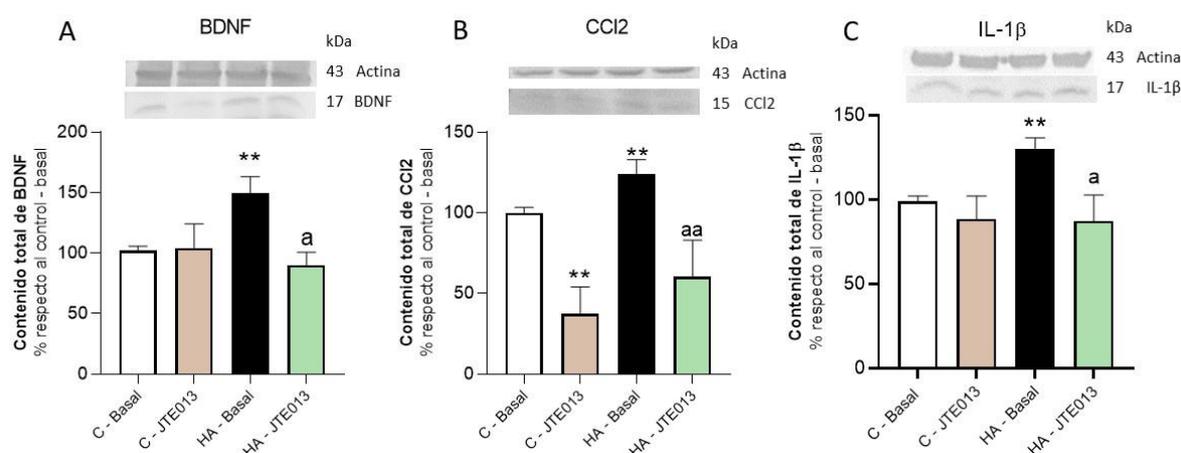


Figura 56. El bloqueo del receptor S1PR2 revierte los aumentos inducidos por la hiperamonemia en el contenido de IL-1 β (A), CCI2 (B) y BDNF (C). Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin JTE013. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 4-8 ratas por grupo. En A y C los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. En B los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

2.9. Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre la fosforilación de Src, Akt, CREB y p38

La hiperamonemia aumenta la fosforilación de Src en el residuo Y418 (123 ± 8 %) y el bloqueo del receptor S1PR2 revierte este aumento (84 ± 8 %; $F = 4.73$, $p < 0.05$). En el grupo control el tratamiento con JTE013 no altera la fosforilación de Src en el residuo de tirosina 418 (93 ± 11 %, $p > 0.05$) (Figura 57 A). En el caso de Akt, la hiperamonemia aumenta su fosforilación en el residuo de serina 473 (216 ± 40 %) y el tratamiento con JTE013 revierte este aumento (86 ± 11 %; $F = 5.97$, $p < 0.01$). En el grupo control el tratamiento con JTE013 no tiene ningún efecto sobre la fosforilación de Akt (100 ± 9 %, $p > 0.05$) (Figura 57 B).

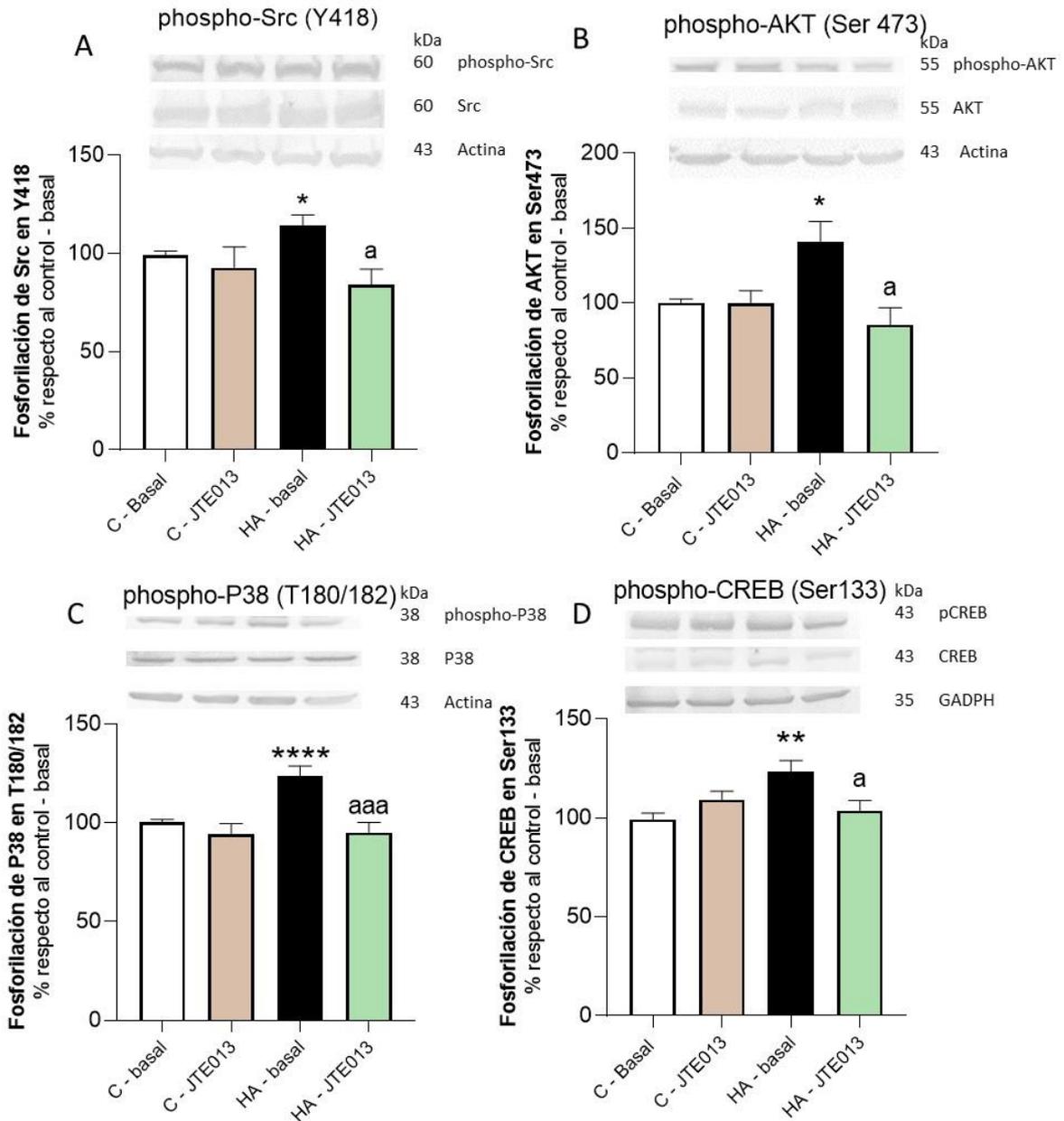


Figura 57. Efecto del bloqueo del receptor S1PR2 sobre la fosforilación de Src en Y418 (A), de Akt en Ser473 (B), de P38 en T180/182 (C) y de CREB en Ser133 (D). Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin JTE013. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en material y métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 4-8 ratas por grupo. En A, B y D los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. En C los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$; ; ^{aaa} $p < 0.001$).

En el caso de p38, la hiperamonemia aumenta la fosforilación de su residuo T180/182, (120 ± 5 %) respecto al grupo control, y el bloqueo del receptor S1PR2 revierte este aumento (95 ± 5 %; $H = 24.85$, $p < 0.05$) reduciendo su fosforilación a valores similares a los observados en el grupo

control. En el grupo control el tratamiento con JTE013 no altera la fosforilación de P38 en T180/182 ($94 \pm 5 \%$) (Figura 57 C). La hiperamonemia aumenta la fosforilación de CREB en el residuo de serina 133 respecto al grupo control y el tratamiento con JTE013 revierte este aumento, pero no llega a ser estadísticamente diferente del grupo hiperamonemia basal ($107 \pm 5 \%$, $p < 0.05$). En el grupo control el bloqueo del receptor S1PR2 no altera los niveles de fosforilación de CREB ($108 \pm 4 \%$) (Figura 57 D).

3. EFECTO DEL BLOQUEO DE TrkB, RECEPTOR DE BDNF, SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN Y LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA

Una de las moléculas clave en la regulación de la neurotransmisión GABAérgica en el SNC es el BDNF. El BDNF es sintetizado tanto por las neuronas como por la glía y es uno de los mediadores cruciales de la potenciación a largo plazo en las sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas del SNC (Korte et al., 1995; Figurov et al., 1996; Lu, 2003).

Algunos estudios han demostrado que el BDNF puede influir tanto positiva como negativamente en la neurotransmisión GABAérgica a través de diversas vías de señalización intracelulares asociadas a la activación del receptor TrkB. Para esclarecer el papel que juega el BDNF a través de la activación de su receptor TrkB en la modulación de la neuroinflamación y la neurotransmisión GABAérgica en hipocampo en ratas con hiperamonemia crónica, se realizaron experimentos ex vivo, en los que se analizó el efecto sobre los mismos del bloqueo de TrkB con su antagonista ANA-12.

3.1. Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre la activación de microglía y astrocitos

La hiperamonemia produce activación de microglía ($100 \pm 5 \mu\text{m}$) y el tratamiento con ANA-12 revierte esta activación ($180 \pm 3 \%$; $F = 17.8$, $p < 0.01$). En ratas control el bloqueo del receptor TrkB tiende a disminuir el perímetro de celular teñido con Iba-1, pero sin alcanzar diferencias significativas respecto a ratas control basal ($140 \pm 6 \%$) (Figura 58).

El tratamiento con ANA-12 revierte la activación de astrocitos producida por la hiperamonemia, disminuyendo el porcentaje de área teñida con GFAP ($16 \pm 2 \%$ respecto a ratas control; $F = 6.309$, $p < 0.05$). En el grupo control el bloqueo del receptor TrkB no altera la activación de astrocitos, permaneciendo el porcentaje de área teñida con GFAP similar al del grupo control basal ($14 \pm 3 \%$; $p > 0.05$) (Figura 59).

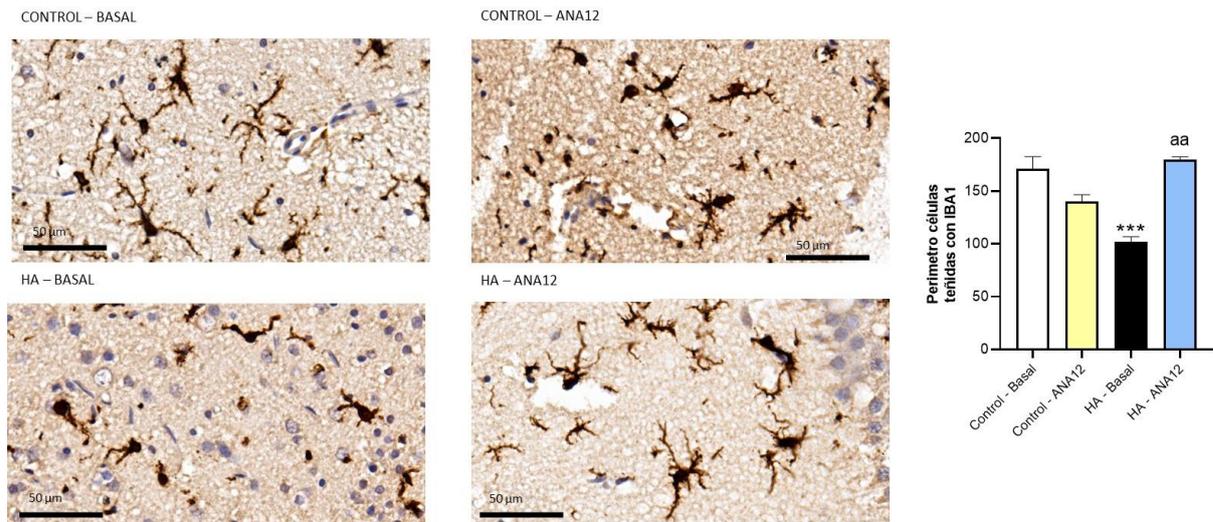


Figura 58. La hiperamonemia induce activación de la microglía en el hipocampo y el tratamiento con ANA-12 revierte dicha activación. Se tiñó la microglía con un anticuerpo contra Iba1 en cortes de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas (HA) tratadas o no con ANA-12. Se analizó el perímetro de las células teñidas con Iba1. Se muestran imágenes representativas, la escala mostrada es de 50 μm . Los valores son la media \pm SEM de 3-4 ratas por grupo. Los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a los cortes de hipocampo de ratas con hiperamonemia crónica (^{aa} $p < 0.01$).

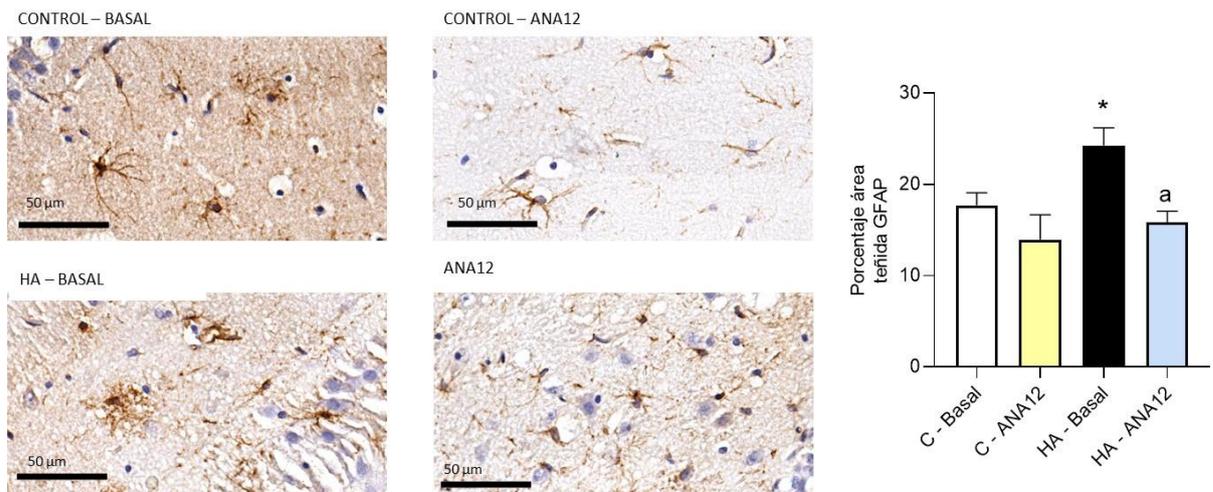


Figura 59. La hiperamonemia induce activación de astrocitos en el hipocampo y el tratamiento con ANA-12 revierte dicha activación. Se tiñeron los astrocitos con un anticuerpo contra GFAP en cortes de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas (HA) tratadas o no con ANA-12. Se analizó el porcentaje de área teñida con GFAP. Se muestran imágenes representativas, la escala mostrada es de 50 μm de longitud. Los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los valores son la media \pm SEM de 5 ratas por grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a los cortes de hipocampo de ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

3.2. Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre los niveles de GABA, GAD-65 y GAD-67

La hiperamonemia disminuye el contenido total de GABA ($63 \pm 8 \%$) respecto a las ratas control y el tratamiento con ANA-12 lo normaliza ($117 \pm 17 \%$; $F = 5.76$, $p < 0.01$). En el grupo control el bloqueo de TrkB no tiene ningún efecto sobre el contenido total de GABA ($85 \pm 6 \%$) (Figura 60 A)

Ni la hiperamonemia ni el tratamiento con ANA-12 tienen efecto sobre el contenido de GAD65 ($100 \pm 10 \%$; $H = 2.293$, $p > 0.05$). En el grupo control el bloqueo del receptor TrkB tampoco altera el contenido de GAD65 ($92 \pm 4 \%$; $p > 0.05$) (Figura 60 B). El bloqueo del receptor TrkB revierte la disminución en el contenido de GAD67 producido por la hiperamonemia de un $78 \pm 3 \%$ respecto a las ratas control a un $103 \pm 8 \%$ ($F = 6.17$, $p < 0.05$). En el grupo control el tratamiento con ANA-12 disminuye el contenido de GAD67, hasta valores similares a los observados en hiperamonemia ($72 \pm 11 \%$, $p < 0.05$) (Figura 60 C).

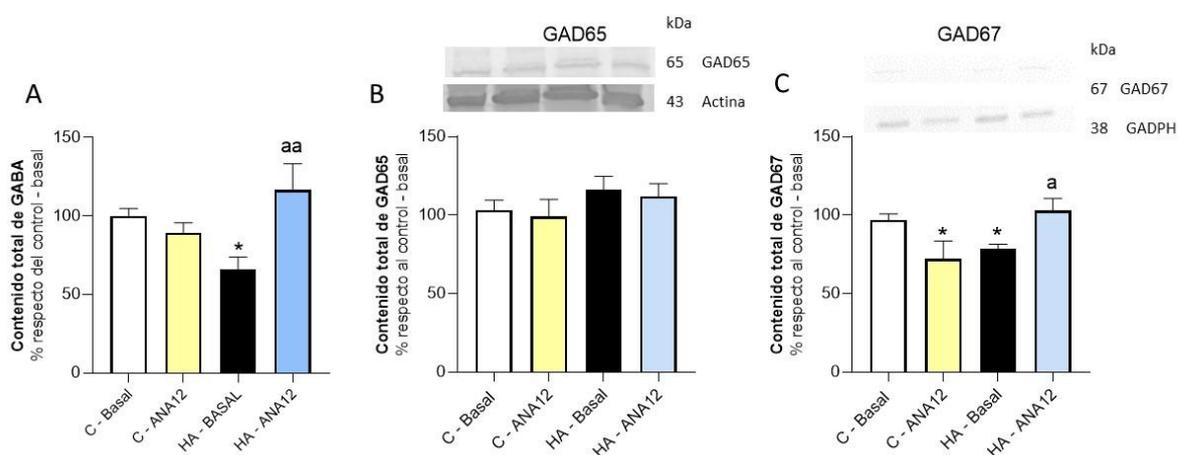


Figura 60. Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre el contenido de GABA (A), GAD65 (B) y GAD67 (C) en hipocampo. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin ANA-12. El contenido de GABA se analizó por HPLC y el de GAD65 y GAD67 por western blot, como se describe en métodos. En A y C los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía. En B los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los valores son la media \pm SEM de 7-14 ratas por grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$; ^{aaa} $p < 0.01$).

3.3. Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A en hipocampo.

La hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$ ($126 \pm 9 \%$), $\alpha 2$ ($198 \pm 34 \%$), $\gamma 2$ ($180 \pm 22 \%$), $\beta 3$ ($155 \pm 14 \%$) y δ ($146 \pm 11 \%$) del receptor GABA_A respecto al grupo control y el tratamiento con ANA-12 normaliza la expresión en membrana de las

subunidades $\alpha 1$ ($75 \pm 18 \%$; $H = 17.52$, $p < 0.01$), $\alpha 2$ ($100 \pm 5 \%$; $F = 1.045$, $p < 0.01$), $\gamma 2$ ($55 \pm 20 \%$; $H = 14.74$, $p < 0.05$), $\beta 3$ ($75 \pm 18 \%$; $H = 14.68$, $p < 0.05$) y δ ($79 \pm 18 \%$; $F = 7.015$, $p < 0.05$). En el caso de la subunidad $\alpha 5$, la hiperamonemia disminuye la expresión en membrana ($82 \pm 7 \%$ respecto a las ratas control) y el tratamiento con ANA-12 no la normaliza ($45 \pm 3 \%$). El bloqueo del receptor TrkB en el grupo control tiende a aumentar la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 2$ ($149 \pm 14 \%$), $\alpha 5$ ($131 \pm 19 \%$), $\beta 3$ ($145 \pm 25 \%$) y δ ($158 \pm 14 \%$), pero sólo en el caso de la subunidad δ las diferencias llegan a ser significativas ($p < 0.05$) (Figura 61).

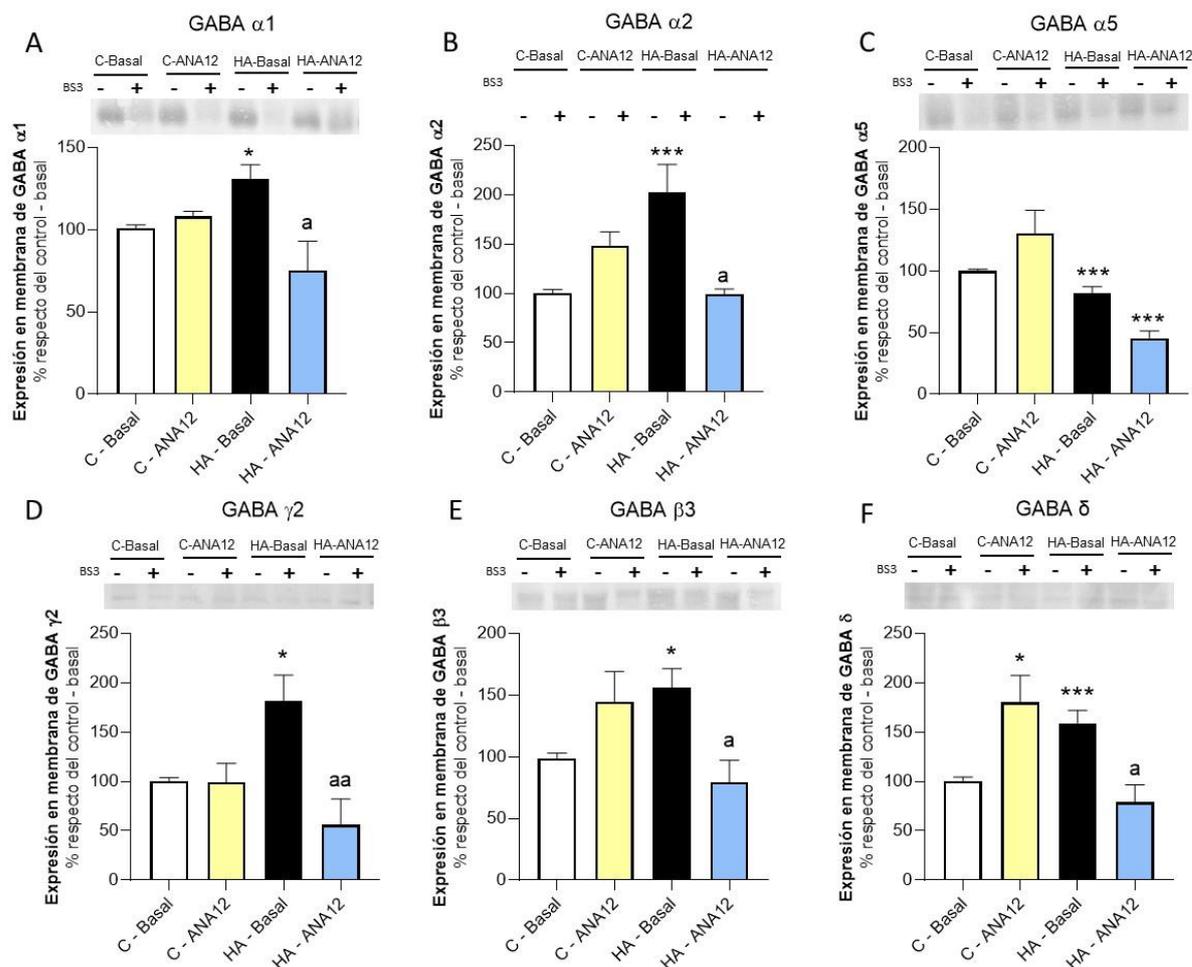


Figura 61. Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A: $\alpha 1$ (A), $\alpha 2$ (B), $\alpha 5$ (C), $\gamma 2$ (D), $\beta 3$ (E) y δ (F). Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin ANA-12. La expresión en membrana se analizó por western blot como se describe en métodos. En A y F los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. En B los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los valores son la media \pm SEM de 7-10 ratas por grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y "a" diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

3.4. Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre la fosforilación de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A en los residuos S408/S409

El tratamiento con ANA-12 revierte el aumento producido por la hiperamonemia en la fosforilación en los residuos de serina 408 y 409 de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A (63 ± 1 %; $H = 19.72$, $p < 0.01$). El bloqueo del receptor TrkB en el grupo control aumenta la fosforilación de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A (335 ± 2 %; $p < 0.05$) (Figura 62).

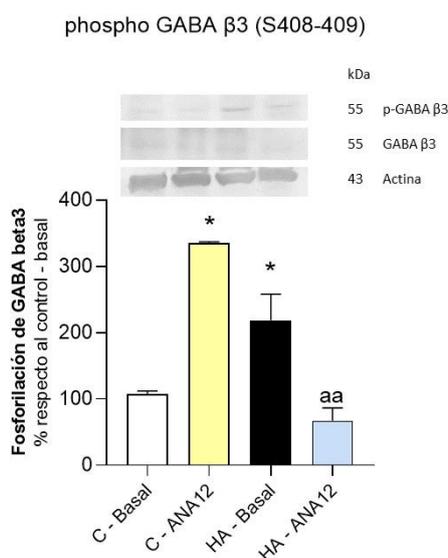


Figura 62. Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre la fosforilación de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A en hipocampo de ratas control e hiperamonémicas. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin ANA-12. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. Los valores se representan en porcentaje respecto a las ratas control y son la media \pm SEM de 4-6 ratas por grupo. Los datos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

3.5. Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre el contenido de gephyrin

La hiperamonemia aumenta el contenido de gephyrin (121 ± 5 %) y el tratamiento con ANA-12 lo normaliza (83 ± 7 %; $F = 9.883$, $p < 0.01$). En el grupo control el bloqueo de TrkB aumenta el contenido de gephyrin (135 ± 18 %, $p < 0.05$) (Figura 63).

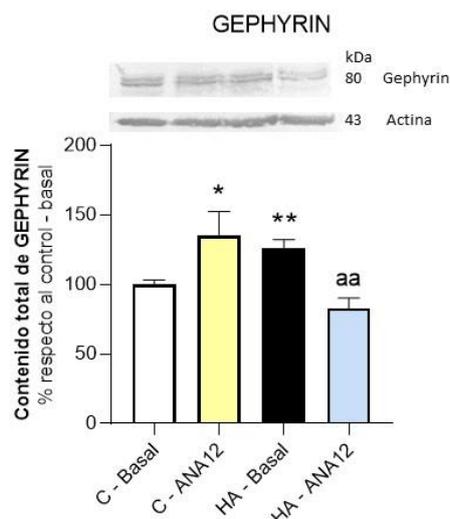


Figura 63. El bloqueo del receptor TrkB revierte el aumento del contenido de gephyrin en hipocampo de ratas hiperamonémicas. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin ANA-12. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 4-8 ratas por grupo. Los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.05$).

3.6. Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre el contenido total y la expresión en membrana de transportadores GABA

El tratamiento con ANA-12 revierte el aumento en el contenido de GAT-1 (81 ± 12 %; $F = 6.921$, $p < 0.05$) y GAT-3 (82 ± 3 %; $F = 7.142$, $p < 0.05$) producido por la hiperamonemia. En el grupo control el bloqueo del receptor TrkB no afecta al contenido total de GAT-1 (78 ± 13 %) y GAT-3 (74 ± 10 %) (Figura 64 A y B).

El bloqueo del receptor TrkB revierte la disminución en la expresión en membrana de GAT-1 (99 ± 8 %; $F = 9.809$, $p < 0.05$) observada en hiperamonemia y aunque tiende a aumentar la expresión en membrana de GAT-3, las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas (91 ± 30 %; $F = 8.538$, $p > 0.05$). En el grupo control el tratamiento con ANA-12 disminuye la expresión en membrana de GAT-1 (31 ± 9 %, $p < 0.01$) y aumenta la expresión en membrana de GAT-3 (153 ± 23 %, $p < 0.01$) (Figura 64 D y E).

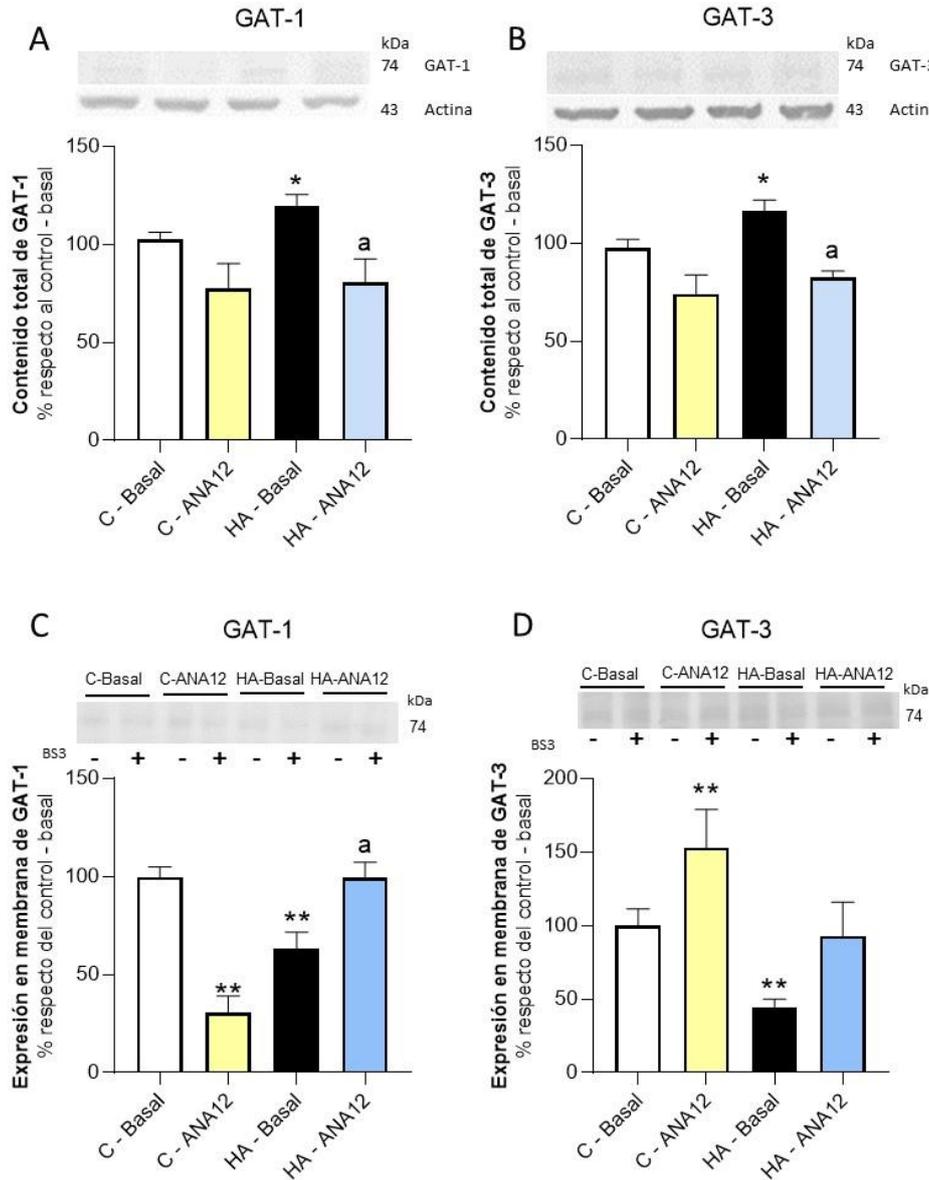


Figura 64. Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre el contenido total (A, B) y sobre la expresión en membrana (C, D) de GAT-1 y GAT-3. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin ANA-12. Las muestras se analizaron por western blot como se describe en métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 4 -8 ratas por grupo. Todos los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

3.7. Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre la expresión en membrana de transportadores de Cl⁻

La hiperamonemia disminuye la expresión en membrana de KCC2 ($55 \pm 7\%$) y aumenta la de NKCC1 ($138 \pm 13\%$) y el bloqueo del receptor TrkB revierte estas dos alteraciones, aumentando la expresión en membrana de KCC2 hasta un $127 \pm 19\%$ de la de ratas control ($H = 23.78$, $p <$

0.01) y disminuyendo la expresión en membrana de NKCC1 hasta un 84 ± 15 % ($F = 3.548$, $p < 0.05$) (Figura 65).

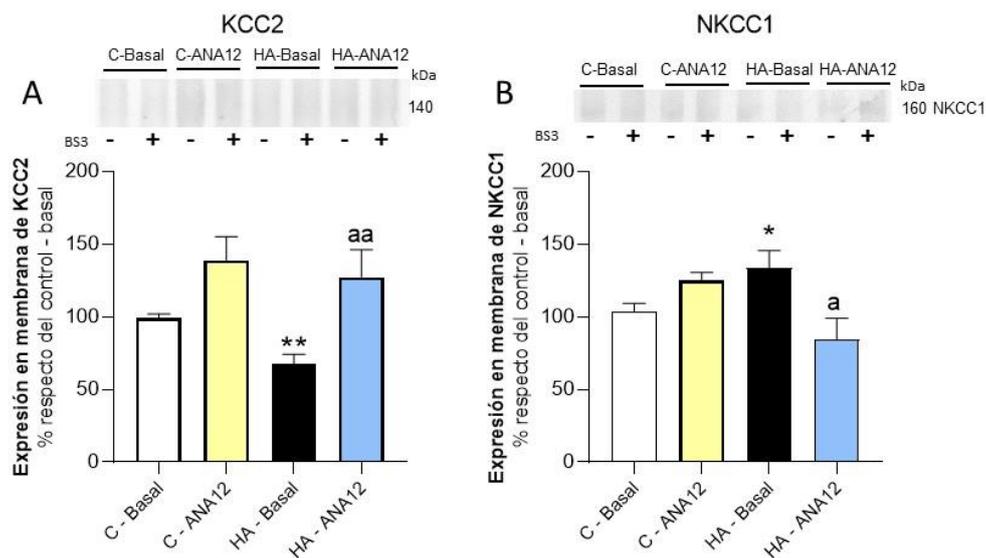


Figura 65. El bloqueo del receptor TrkB revierte las alteraciones en la expresión en membrana de KCC2 (A) y NKCC1 (B) en ratas hiperamonémicas. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin ANA-12. La expresión en membrana se analizó por western blot como se describe en métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 6 – 9 ratas por grupo. En B los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. En A los datos no siguieron una distribución normal y fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

3.8. Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre el contenido de IL-1 β , CCI2 y BDNF

El bloqueo del receptor TrkB no revierte el aumento producido por la hiperamonemia en el contenido total de IL-1 β (103 ± 7 %, Figura 66 A), CCI2 (105 ± 6 %, Figura 64B), pero sí el de BDNF (90 ± 17 %, Figura 64C). En el grupo control el tratamiento con ANA-12 no tiene ningún efecto sobre el contenido de IL-1 β (70 ± 19 %, Figura 64A), CCI2 (111 ± 7 %, Figura 66 B) o de BDNF (90 ± 17 %, Figura 66 C).

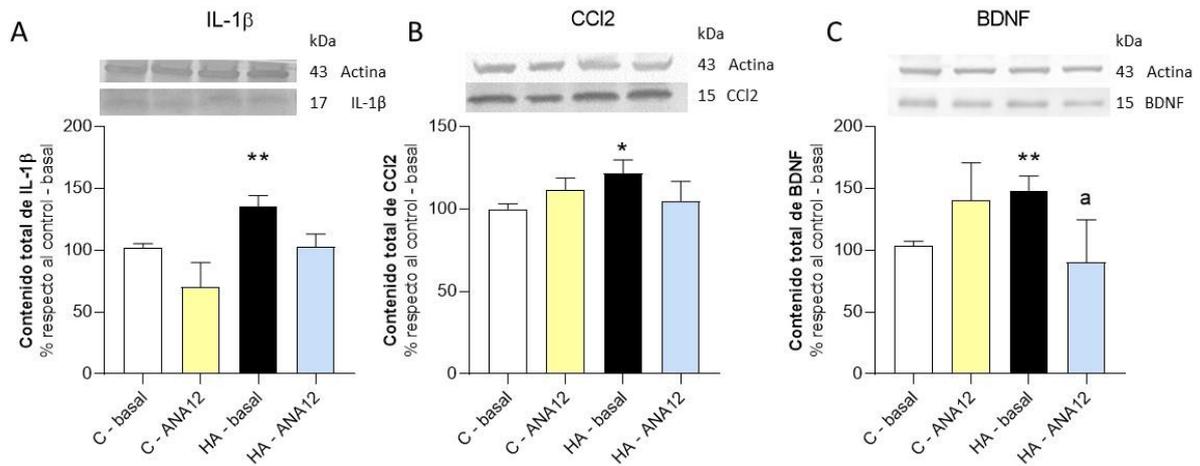


Figura 66. Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre los aumentos inducidos por la hiperamonemia en el contenido de IL-1 β (A), CCI2 (B) y BDNF (C). Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin ANA-12. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 4-8 ratas por grupo. En A y C los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. En B los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

3.9. Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre la fosforilación de Src, Akt, CREB y p38

La hiperamonemia aumenta la fosforilación de Src en el residuo Y418 ($123 \pm 8\%$) y el bloqueo del receptor TrkB no revierte este aumento ($129 \pm 9\%$; $F = 6.351$, $p < 0.05$). En el grupo control el tratamiento con ANA-12 no altera la fosforilación de Src ($109 \pm 8\%$, $p > 0.05$) (Figura 67 A). En el caso de Akt, la hiperamonemia aumenta su fosforilación en el residuo de serina 473 ($134 \pm 11\%$) y el bloqueo del receptor TrkB normaliza este aumento ($93 \pm 7\%$; $F = 5.377$, $p > 0.05$). En el grupo control el tratamiento con ANA-12 no tiene ningún efecto sobre la fosforilación de Akt en el residuo Ser473 ($114 \pm 19\%$, $p > 0.05$) (Figura 67 B).

En el caso de p38, la hiperamonemia aumenta la fosforilación de su residuo T180/182 ($120 \pm 5\%$) respecto al grupo control y el bloqueo del receptor TrkB revierte este aumento ($81 \pm 13\%$; $H = 25.18$, $p < 0.05$). En el grupo control el tratamiento con ANA-12 aumenta la fosforilación de p38 hasta valores similares a los encontrados en ratas hiperamonémicas ($143 \pm 16\%$ de la de ratas control) (Figura 67 C). La hiperamonemia aumenta la fosforilación de CREB en el residuo de serina 133 ($128 \pm 5\%$) respecto al grupo control y el tratamiento con ANA-12 la normaliza ($91 \pm 7\%$; $F = 9.379$, $p < 0.01$). En el grupo control el bloqueo del receptor TrkB no altera la fosforilación de CREB ($83 \pm 8\%$) (Figura 67 D).

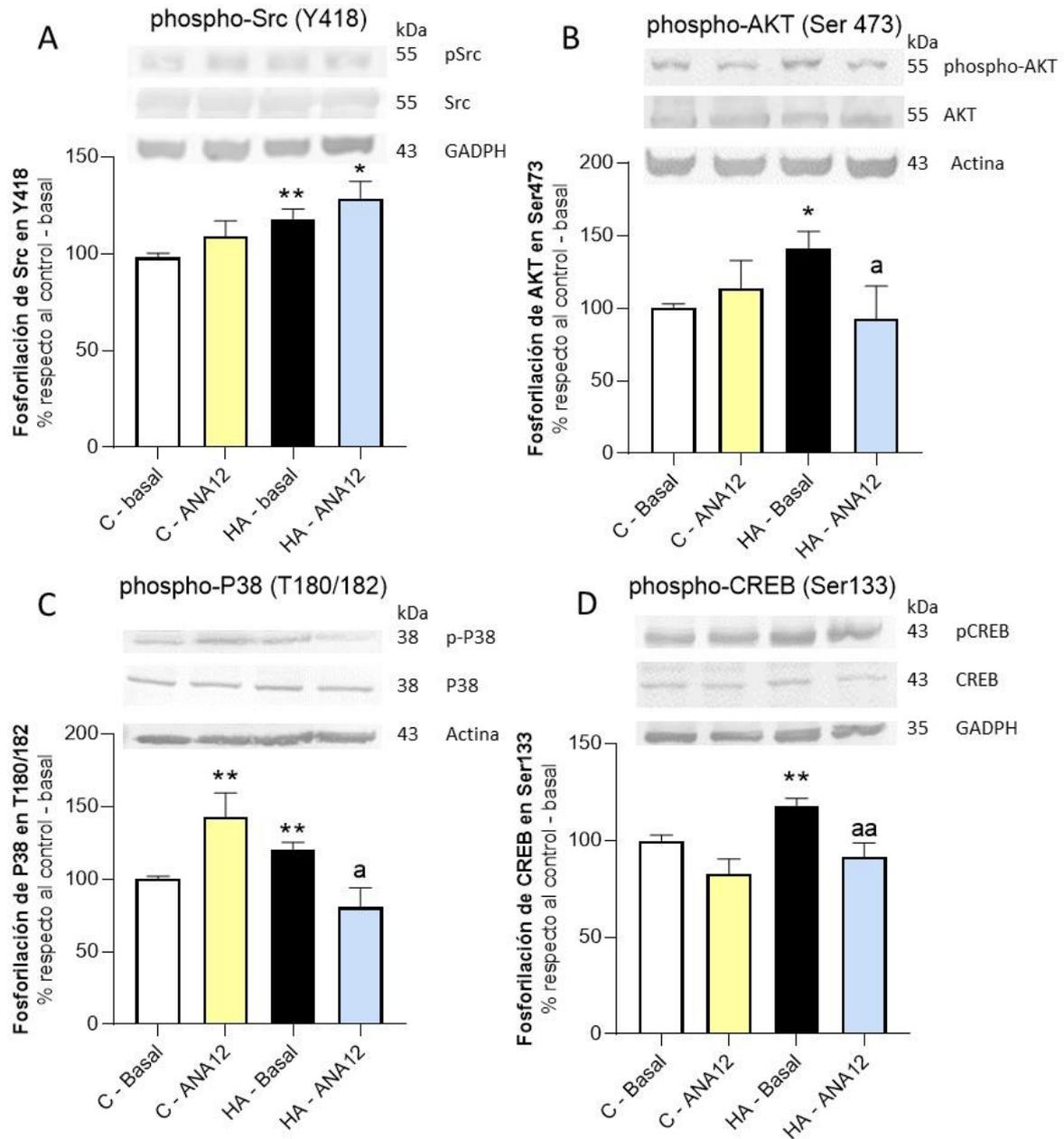


Figura 67. Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre las alteraciones en la fosforilación de Src en Y418 (A), de Akt en Ser473 (B), de P38 en T180/182 (C) y de CREB en Ser133 (D) producidas por la hiperamonemia. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin JTE013. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en material y métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 4-8 ratas por grupo. En A, B y D los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. En C los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

4. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA PI3 KINASA SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN Y LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA

A continuación, profundizamos en los mecanismos intracelulares que, tras la activación del receptor de IL-1, S1PR2 y TrkB conducirían a las alteraciones en la expresión en membrana de las distintas subunidades GABA_A, de los transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻. Para analizar el posible papel de la PI3K estudiamos los efectos de su inhibición por el tratamiento ex vivo con wortmanina (un inhibidor de la PI3 kinasa) en rodajas de hipocampo de ratas control e hiperamonemias.

4.1. Efecto de la inhibición de la PI3K sobre los niveles de GABA, GAD-65 y GAD-67

La inhibición de la PI3K revierte la disminución en el contenido total de GABA producida por la hipermonemia (126 ± 30 % del de ratas control; $F = 4.894$, $p < 0.01$). En el grupo control el tratamiento con wortmanina no altera el contenido total de GABA (87 ± 16 %) (Figura 68 A). El tratamiento con wortmanina no afecta al contenido de GAD65 ni en ratas control (68 ± 13 %; $H = 4.277$, $p > 0.05$) ni en ratas hiperamonemias (110 ± 14 % del de ratas control) (Figura 68 B). La inhibición de la PI3K normaliza el contenido GAD67, aumentandolo hasta valores similares a los de ratas control (113 ± 12 %; $F = 5.898$, $p < 0.01$). En el grupo control, la wortmanina no altera el contenido total de GAD67 (100 ± 8 %, $p > 0.05$) (Figura 68 C).

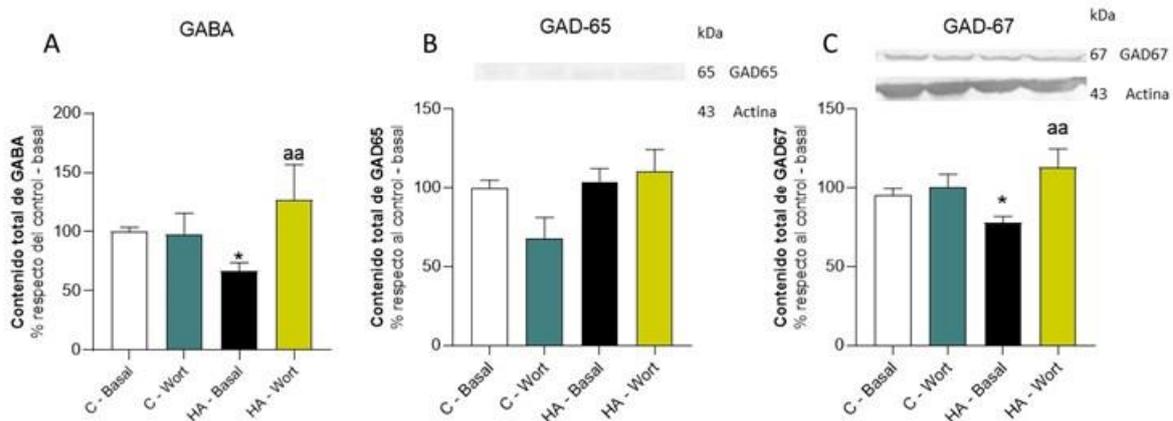


Figura 68. Efecto del bloqueo de la inhibición de la PI3K sobre el contenido total de GABA (A), GAD65 (B) y GAD67 (C) en hipocampo. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin wortmanina. El contenido total de GABA se analizó por HPLC y el de GAD65 y GAD67 por western blot como se describe en el apartado de métodos. Los valores son la media \pm SEM de 4-8 ratas por grupo. Todos los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (aa $p < 0.01$).

4.2. Efecto de la inhibición de la PI3K sobre la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A en hipocampo.

La hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$ ($126 \pm 9 \%$), $\alpha 2$ ($198 \pm 34 \%$), $\gamma 2$ ($180 \pm 22 \%$), $\beta 3$ ($155 \pm 14 \%$) y δ ($146 \pm 11 \%$) del receptor GABA_A respecto al grupo control y el tratamiento con wortmanina normaliza la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$ ($75 \pm 17 \%$; $F = 9.749$, $p < 0.01$), $\alpha 2$ ($82 \pm 2 \%$; $H = 18.15$, $p < 0.05$), $\gamma 2$ ($100 \pm 10 \%$; $F = 8.39$, $p < 0.05$), $\beta 3$ ($82 \pm 10 \%$; $F = 9.045$, $p < 0.01$) y δ ($80 \pm 15 \%$; $H = 18.65$, $p < 0.05$). En el caso de la subunidad $\alpha 5$, la hiperamonemia disminuye la expresión en membrana ($82 \pm 7 \%$ respecto a las ratas control) y la inhibición de la PI3K la normaliza ($45 \pm 3 \%$; $F = 17.92$, $p < 0.01$). En las ratas control la inhibición de la PI3K aumenta la expresión en membrana de la subunidad $\alpha 5$ ($176 \pm 35 \%$), pero no altera la expresión en membrana del resto de subunidades (Figura 69).

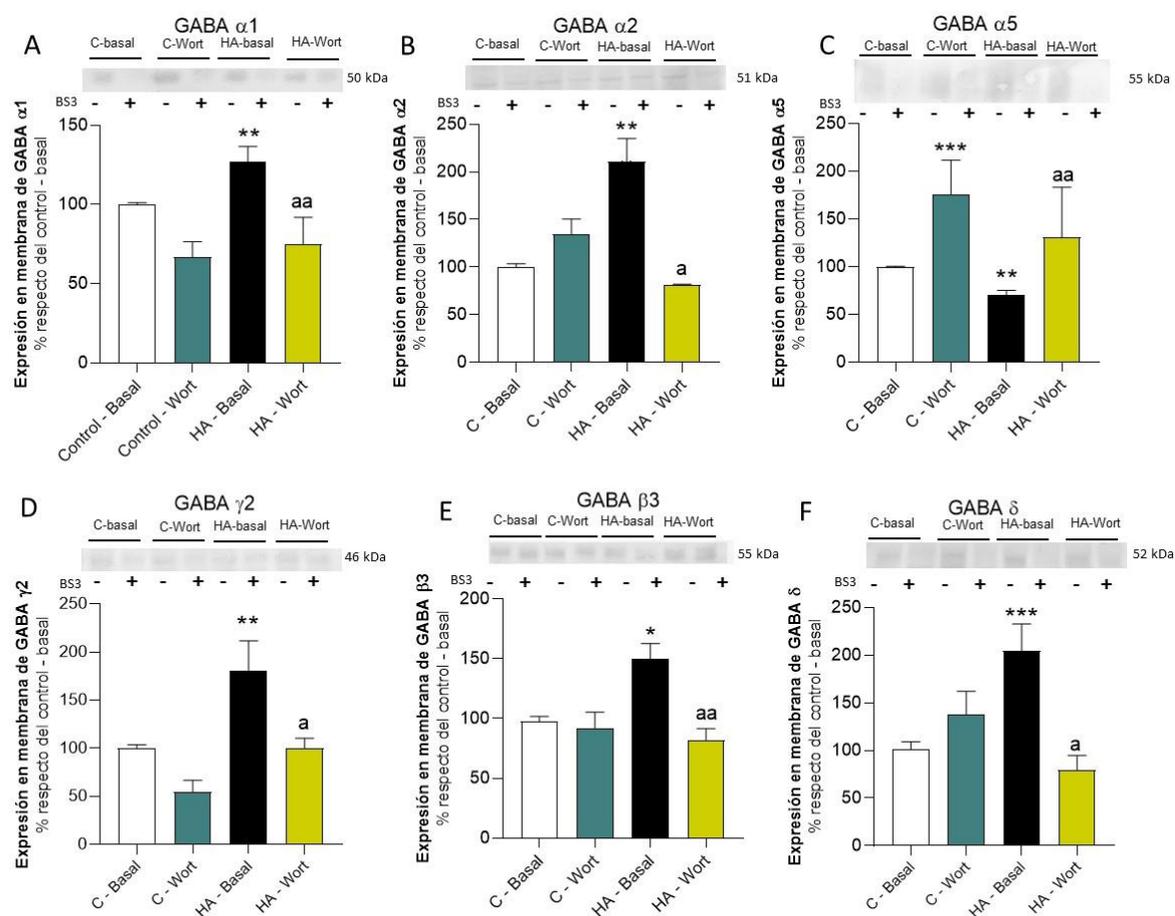


Figura 69. Efecto de la inhibición de la PI3K sobre la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A: $\alpha 1$ (A), $\alpha 2$ (B), $\alpha 5$ (C), $\gamma 2$ (D), $\beta 3$ (E) y δ (F). Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin wortmanina. La expresión en membrana se analizó por western blot como se describe en métodos. En A, B, C y D los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. En E y F los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones

múltiples de Dunn. Los valores son la media \pm SEM de 5-10 ratas por grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

4.3. Efecto de la inhibición de la PI3 kinasa sobre la fosforilación de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A en los residuos S408/S409

El tratamiento con wortmanina revierte el aumento en la fosforilación en los residuos de serina 408 y 409 de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A reduciéndolo por debajo de los niveles de las ratas control (43 ± 10 % de las ratas control; $H = 23.71$, $p < 0.05$). La inhibición de la PI3K en el grupo control tiende a disminuir la fosforilación de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A, pero las diferencias no son estadísticamente significativas (35 ± 12 %, $p > 0.05$) (Figura 70).

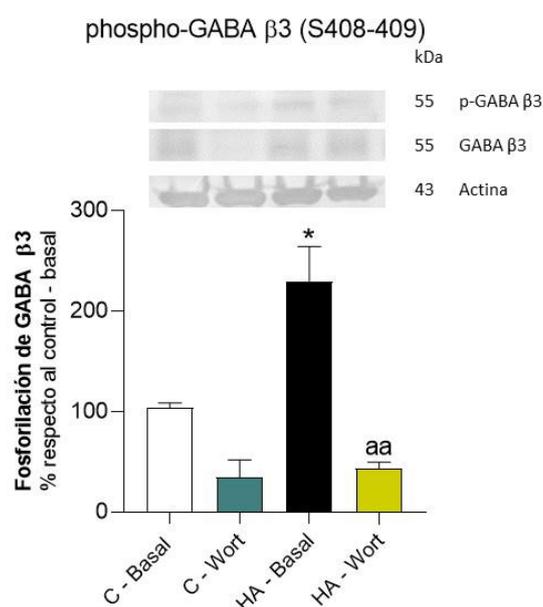


Figura 70. Efecto de la inhibición de la PI3K sobre la fosforilación de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A en hipocampo de ratas control e hiperamonemicas. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin wortmanina. Las muestras se analizaron por inmunobloto como se describe en métodos. Los valores se representan en porcentaje respecto a las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 3-5 ratas por grupo. Los datos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

4.4. Efecto de la inhibición de la PI3 kinasa sobre el contenido de gephyrin

La hiperamonemia aumenta el contenido de gephyrin y la inhibición de la PI3 kinasa lo normaliza, aumentándolo hasta valores similares a los de las ratas control (85 ± 6 %; $H = 19.4$, $p < 0.05$). En el grupo control el tratamiento con wortmanina tiende a disminuir el contenido total de gephyrin, pero las diferencias no llegan a ser significativas (40 ± 17 %, $p > 0.05$) (Figura 71).

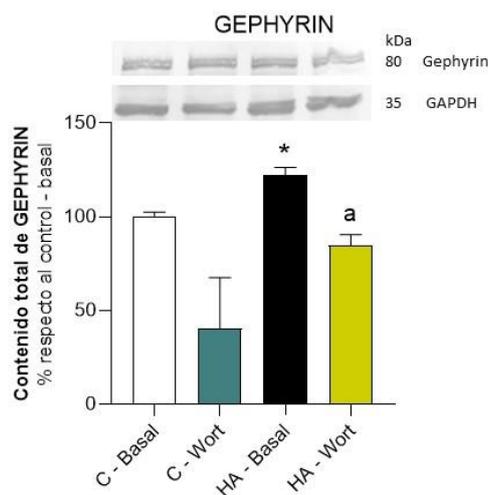


Figura 71. La inhibición de la PI3K revierte el aumento del contenido de gephyrin en hipocampo de ratas hiperamonémicas. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin wortmanina. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 3-5 ratas por grupo. Los datos no siguieron una distribución normal, por lo que fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

4.5. Efecto de la inhibición de la PI3 kinasa sobre el contenido total y la expresión en membrana de transportadores de GABA

La inhibición de la PI3K con wortmanina revierte el aumento en el contenido de GAT-1 (97 ± 7 %; $F = 4.355$, $p < 0.05$) y GAT-3 (88 ± 9 %; $F = 5.55$, $p < 0.05$) producido por la hiperamonemia. En el grupo control la wortmanina no afecta al contenido total de GAT-1 (91 ± 5 %) y GAT-3 (90 ± 6 %) (Figura 72 A y B).

La wortmanina no revierte la disminución en la expresión en membrana de GAT-1 (57 ± 13 %; $F = 9.758$, $p > 0.05$) observada en hiperamonemia y aunque tiende a aumentar la expresión en membrana de GAT-3, no logra revertir la disminución en la expresión en membrana producida por la hiperamonemia (85 ± 30 %; $H = 13.14$, $p > 0.05$). En el grupo control el tratamiento con wortmanina no altera la expresión en membrana de GAT-1 (72 ± 18 %, $p > 0.05$) ni de GAT-3 (134 ± 35 %, $p > 0.05$) (Figura 72 D y E).

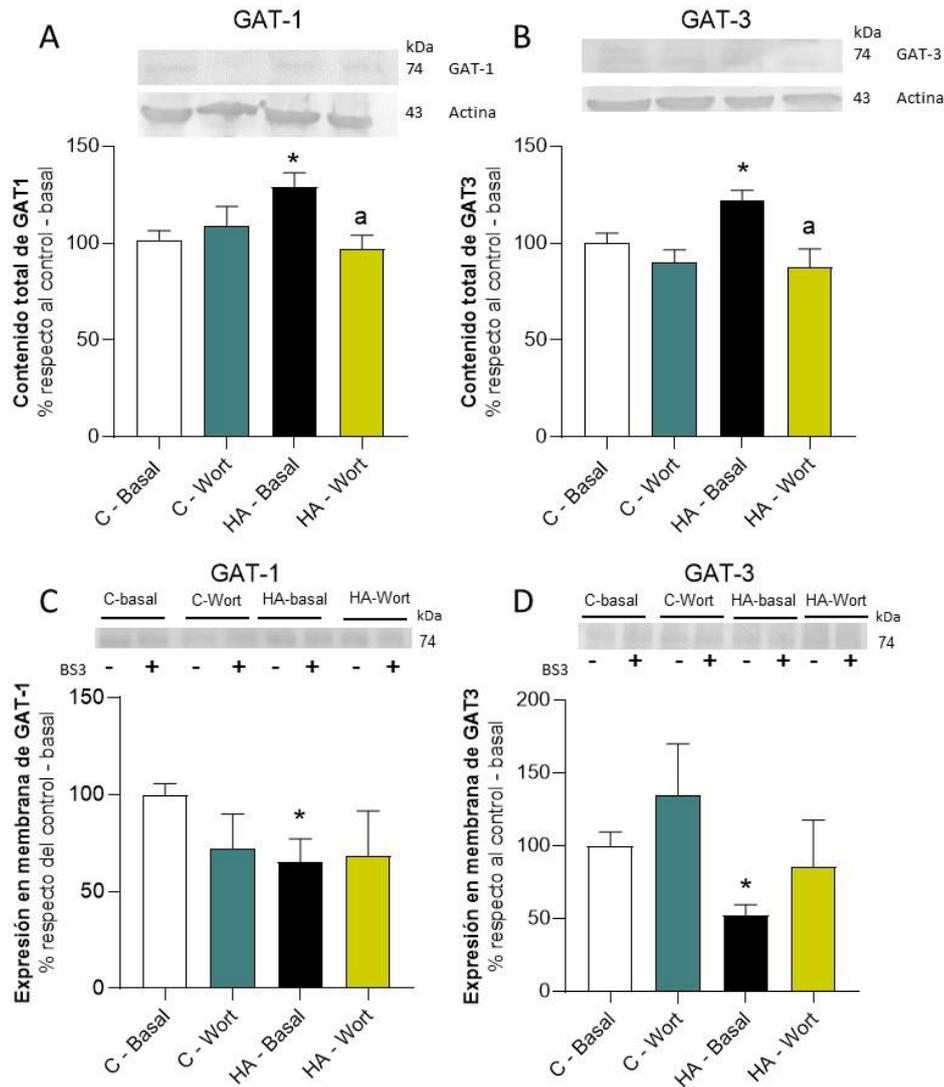


Figura 72. Efecto de la inhibición de la PI3K sobre el contenido total (A, B) y la expresión en membrana (C, D) de GAT-1 y GAT-3. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin wortmanina. Las muestras se analizaron por western blot como se describe en métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 3-6 ratas por grupo. Todos los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

4.6. Efecto de la inhibición de la PI3 kinasa sobre la expresión en membrana de transportadores de Cl⁻

El tratamiento con wortmanina en cortes de ratas hiperamonémicas revierte la disminución en la expresión en membrana de KCC2 (122 ± 24 %; $F = 5.498$, $p < 0.01$), revirtiendo los niveles de expresión de KCC2 a valores similares a los del grupo control basal. En el grupo control la inhibición de la PI3 kinasa no altera la expresión en membrana de KCC2 (81 ± 15 %, $p > 0.05$) (Figura 73 A). La hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de NKCC1 (138 ± 13 %) y la wortmanina revierte esta alteración (86 ± 21 %; $F = 6.899$, $p < 0.01$). En el grupo control el

tratamiento con wortmanina aumenta la expresión en membrana de NKCC1 ($163 \pm 17 \%$, $p > 0.05$) (Figura 73 B).

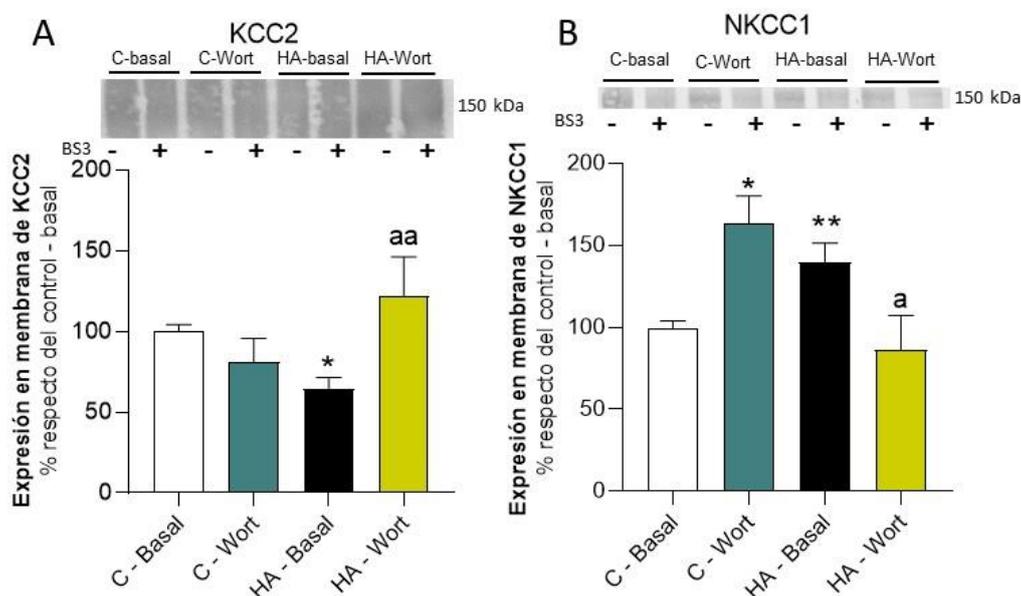


Figura 73. Efecto de la inhibición de la PI3 kinasa sobre la expresión en membrana de KCC2 (A) y NKCC1 (B). Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin wortmanina. La expresión en membrana se analizó por western blot como se describe en métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 6 – 8 ratas por grupo. Los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

4.7. Efecto de la inhibición de la PI3 kinasa sobre el contenido de IL-1 β , CC12 y BDNF

La inhibición de la PI3K no revierte el aumento producido por la hiperamonemia en el contenido de IL-1 β ($137 \pm 13 \%$; $H = 20.13$, $p < 0.05$) y aunque tiende a normalizar el contenido total de CC12, las diferencias no llegan a ser significativas ($106 \pm 5 \%$; $F = 8.626$; $p > 0.05$). Sin embargo, la wortmanina sí normaliza el contenido de BDNF, disminuyéndolo hasta valores similares a los observados en ratas control ($105 \pm 17 \%$; $F = 9.399$, $p < 0.05$). En el grupo control la inhibición de la PI3K no afecta al contenido de IL-1 β ($72 \pm 44 \%$) ni de CC12 ($89 \pm 9 \%$) ni de BDNF ($99 \pm 12 \%$) (Figura 74).

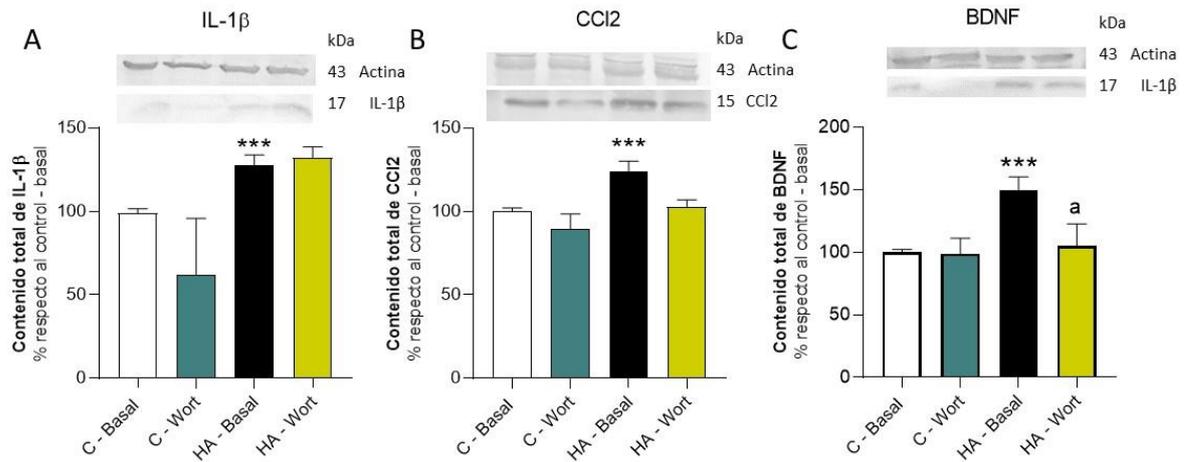


Figura 74. La inhibición de la PI3K revierte el aumento inducido por la hiperamonemia en el contenido de BDNF (C), pero no el de IL-1β (A) y CCI2 (B). Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin wortmanina. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 4-6 ratas por grupo. En B y C los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. En A los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

4.8. Efecto de la inhibición de la PI3 kinasa sobre la fosforilación de Src, Akt, CREB y p38

La hiperamonemia aumenta la fosforilación de Src en el residuo Y418 ($123 \pm 8\%$) y la inhibición de la PI3K revierte este aumento ($92 \pm 10\%$; $F = 4.819$, $p < 0.05$). En el grupo control el tratamiento con wortmanina tiende a aumentar la fosforilación de Src pero las diferencias no llegan a ser significativas ($116 \pm 10\%$, $p > 0.05$) (Figura 75 A). En el caso de Akt, la hiperamonemia aumenta su fosforilación en el residuo de serina 473 y la wortmanina revierte este aumento ($70 \pm 12\%$; $F = 5.97$, $p < 0.01$). En el grupo control la inhibición de la PI3K disminuye la fosforilación de Akt ($48 \pm 8\%$, $p < 0.01$) (Figura 75 B).

En el caso de la fosforilación de p38 en los residuos de tirosina 180-182, la wortmanina la normaliza en ratas hiperamonémicas ($91 \pm 8\%$; $H = 24.43$, $p < 0.05$), mientras que en ratas control la inhibición de la PI3K aumenta la fosforilación de p38 hasta valores similares a los observados en ratas hiperamonémicas ($157 \pm 22\%$, $p < 0.05$) (Figura 75 C). La hiperamonemia también aumenta la fosforilación de CREB en el residuo de serina 133 y la wortmanina revierte este aumento, disminuyendo su fosforilación hasta valores similares a los del grupo control ($94 \pm 5\%$; $F = 6.079$, $p < 0.01$) (Figura 75 D).

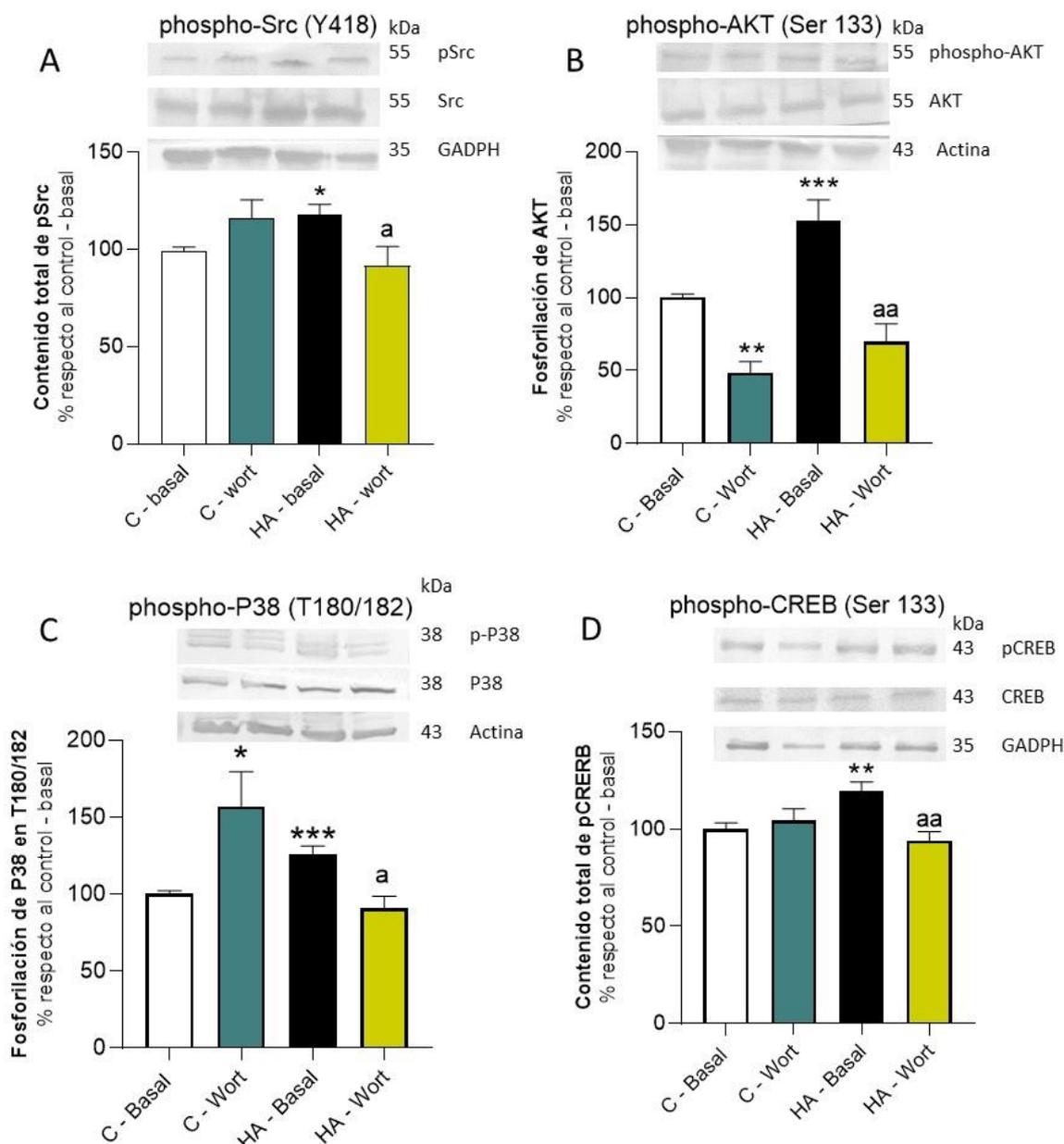


Figura 75. La inhibición de la PI3K revierte el aumento de la fosforilación observada en ratas hiperamonémicas de Src en Y418 (A), de Akt en Ser473 (B), de CREB en Ser133 (C) y de P38 en T180/182 (D). La fosforilación de las proteínas se analizó por western blot como se describe en métodos. Se representa en porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 5-8 ratas por grupo. En A y D los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. En B y C los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

5. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA QUINASA Src SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN Y LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA

Continuamos estudiando los mecanismos intracelulares que, tras la activación de los receptores de IL-1, S1PR2 y TrkB, podrían conducir a las alteraciones en la expresión en membrana de las distintas subunidades del receptor GABA_A, de transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻. La proteína quinasa Src está involucrada en numerosas cascadas de señalización tras la activación de receptores, entre ellos el receptor de la IL-1 y se ha comprobado que modula la expresión en membrana de subunidades de los receptores AMPA y NMDA (Taoro-González et al., 2018). Para analizar el posible papel de Src en las alteraciones observadas en hiperamonemia, realizamos experimentos ex vivo en los que evaluamos los efectos de PP2, un inhibidor de Src.

5.1. Efecto de la inhibición de Src sobre los niveles de GABA, GAD-65 y GAD-67

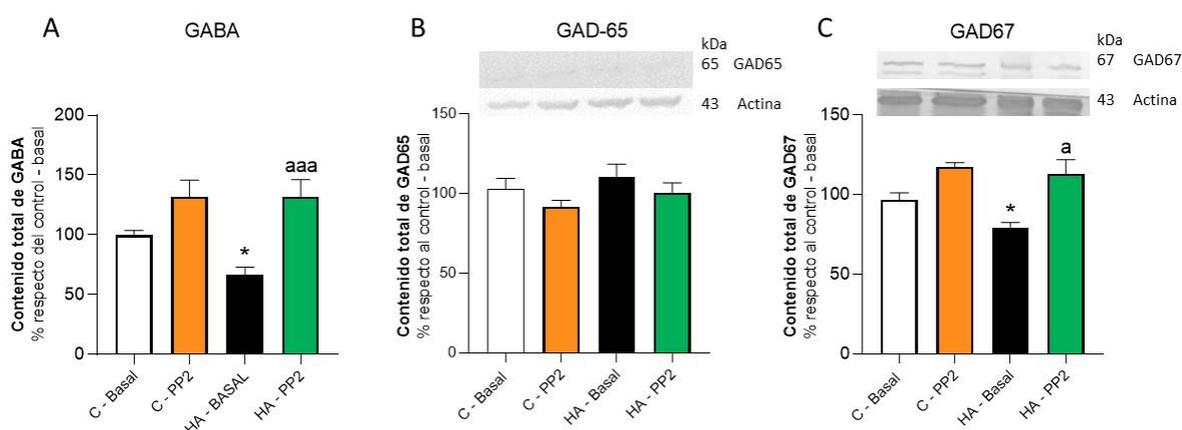


Figura 76. Efecto de la inhibición de Src sobre el contenido total de GABA, GAD65 y GAD67 en hipocampo. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin PP2. El contenido total de GABA se analizó por HPLC y el de GAD65 y GAD67 por western blot como se describe en el apartado de métodos. Los valores son la media \pm SEM de 4-8 ratas por grupo. Todos los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^{aa} $p < 0.01$).

La inhibición de Src revierte la disminución en el contenido total de GABA observada en hiperamonemia (132 ± 14 %; $F = 10.47$, $p < 0.001$). En el grupo control, el tratamiento con PP2 no altera el contenido total de GABA (131 ± 14 %, $p > 0.05$) (Figura 76 A). El tratamiento con PP2 no tienen ningún efecto sobre el contenido de GAD65 ni en ratas control (92 ± 4 %; $F = 1.447$, $p > 0.05$), ni en ratas hiperamonémicas (100 ± 6 %, $p > 0.05$) (Figura 76 B). La inhibición de Src normaliza el contenido de GAD67, aumentándolo hasta niveles similares a los de las ratas

control ($113 \pm 8 \%$; $F = 7.771$, $p < 0.01$). No encontramos ningún efecto de PP2 sobre el contenido de GAD67 en el grupo control ($118 \pm 3 \%$, $p > 0.05$) (Figura 76 C).

5.2. Efecto de la inhibición de Src sobre la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A en hipocampo

La inhibición de Src, mediante el tratamiento ex vivo con PP2, normaliza la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$ ($82 \pm 17 \%$; $H = 11.58$, $p < 0.05$), $\alpha 2$ ($98 \pm 20 \%$; $F = 6.088$, $p < 0.05$), $\gamma 2$ ($77 \pm 16 \%$; $F = 5.335$, $p < 0.01$), $\beta 3$ ($70 \pm 14 \%$; $H = 7.254$, $p < 0.01$) y δ ($92 \pm 20 \%$; $H = 20.33$, $p < 0.05$) del receptor GABA_A. Sin embargo, PP2 no revierte la disminución de la expresión en membrana de la subunidad $\alpha 5$ del receptor GABA_A ($77 \pm 10 \%$; $H = 26.19$, $p > 0.05$) (Figura 77). En ratas control el tratamiento con PP2 no tiene ningún efecto sobre la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A estudiadas.

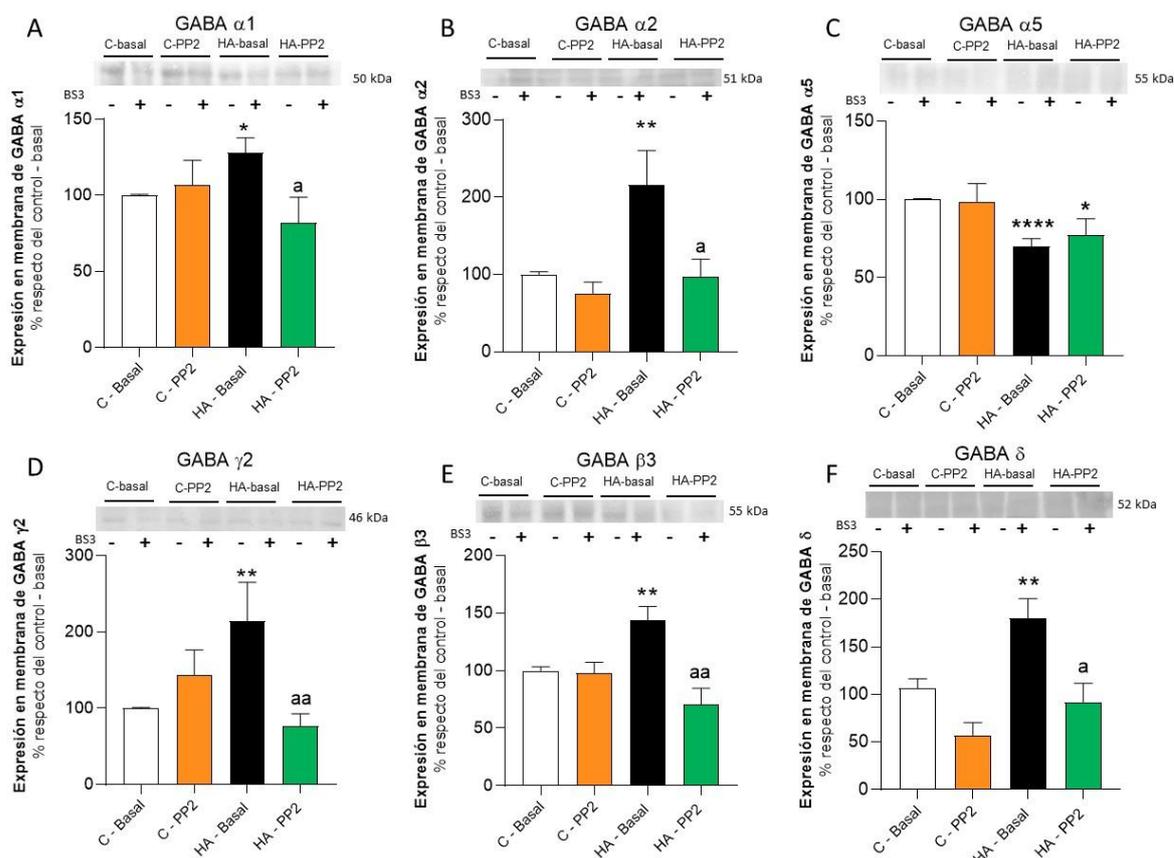


Figura 77. Efecto de la inhibición de Src sobre la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A: $\alpha 1$ (A), $\alpha 2$ (B), $\alpha 5$ (C), $\gamma 2$ (D), $\beta 3$ (E) y δ (F). Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin PP2. La expresión en membrana se analizó por western blot como se describe en métodos. En B, D y E los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. En A, C y F los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los valores son la media \pm SEM de 5-10 ratas por grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

5.3. La inhibición de Src revierte el aumento en la fosforilación de la subunidad β_3 del receptor GABA_A en los residuos S408/S409 en ratas hiperamonémicas

El tratamiento con PP2 revierte el aumento producido por la hiperamonemia en la fosforilación en los residuos de serina 408 y 409 ($211 \pm 34\%$, $p < 0.05$) de la subunidad β_3 del receptor GABA_A ($64 \pm 8\%$; $H = 19.88$, $p < 0.01$). La inhibición de Src en el grupo control no altera la fosforilación de la subunidad β_3 del receptor GABA_A ($77 \pm 3\%$; $p > 0.05$) (Figura 78).

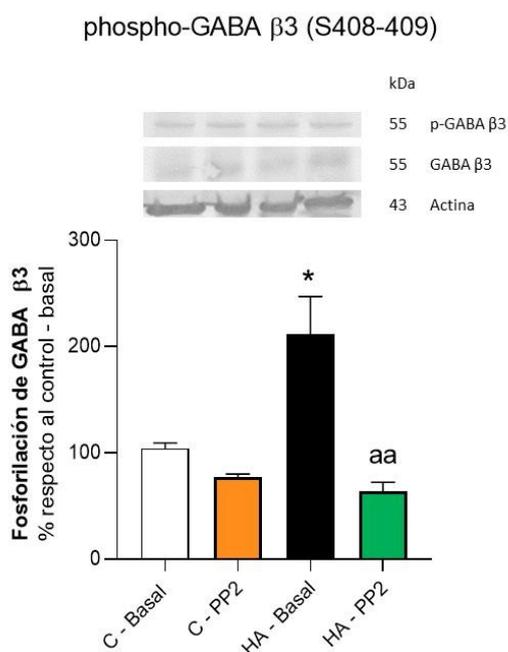


Figura 78. La inhibición de Src revierte el aumento en la fosforilación de la subunidad β_3 del receptor GABA_A en hipocampo de ratas hiperamonémicas. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin PP2. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. Los valores se representan en porcentaje respecto a las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 3-5 ratas por grupo. Los datos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

5.4. Efecto de la inhibición de Src sobre el contenido de gephyrin

La hiperamonemia aumenta el contenido de gephyrin y la inhibición de la kinasa Src lo normaliza ($84 \pm 14\%$; $F = 10.66$, $p < 0.05$). En las ratas control PP2 disminuye el contenido de gephyrin ($52 \pm 30\%$, $p < 0.01$) (Figura 79).

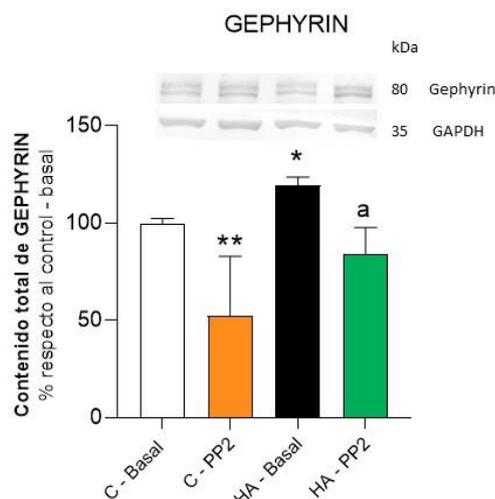


Figura 79. La inhibición de Src revierte el aumento del contenido de gephyrin en hipocampo de ratas hiperamonémicas. Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin PP2. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 3-5 ratas por grupo. Los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

5.5. Efecto de la inhibición de Src sobre el contenido total y la expresión en membrana de transportadores de GABA

El tratamiento con PP2 revierte el aumento en el contenido de GAT-1 (93 ± 14 %; $F = 6.336$, $p < 0.05$) y GAT-3 (69 ± 6 %; $F = 8.725$, $p < 0.01$) producido por la hiperamonemia. En el grupo control la inhibición de Src tiende a disminuir el contenido de GAT-1 (78 ± 13 %), (74 ± 6 %, $p > 0.05$), y de GAT-3 (79 ± 15 %, $p > 0.05$) pero las diferencias no son significativas (Figura 80 A y B).

La inhibición de Src no revierte la disminución en la expresión en membrana de GAT-1 (49 ± 12 %; $F = 4.958$, $p > 0.05$) observada en hiperamonemia y si que normaliza la de GAT-3, al aumentar su expresión en membrana (128 ± 3 %; $F = 8.725$, $p < 0.05$). En el grupo control el tratamiento con PP2 tiende a disminuir la expresión en membrana de GAT-1 (56 ± 20 %, $p > 0.05$) y a aumentar la expresión en membrana de GAT-3 (160 ± 20 %, $p > 0.05$) (Figura 80 D y E).

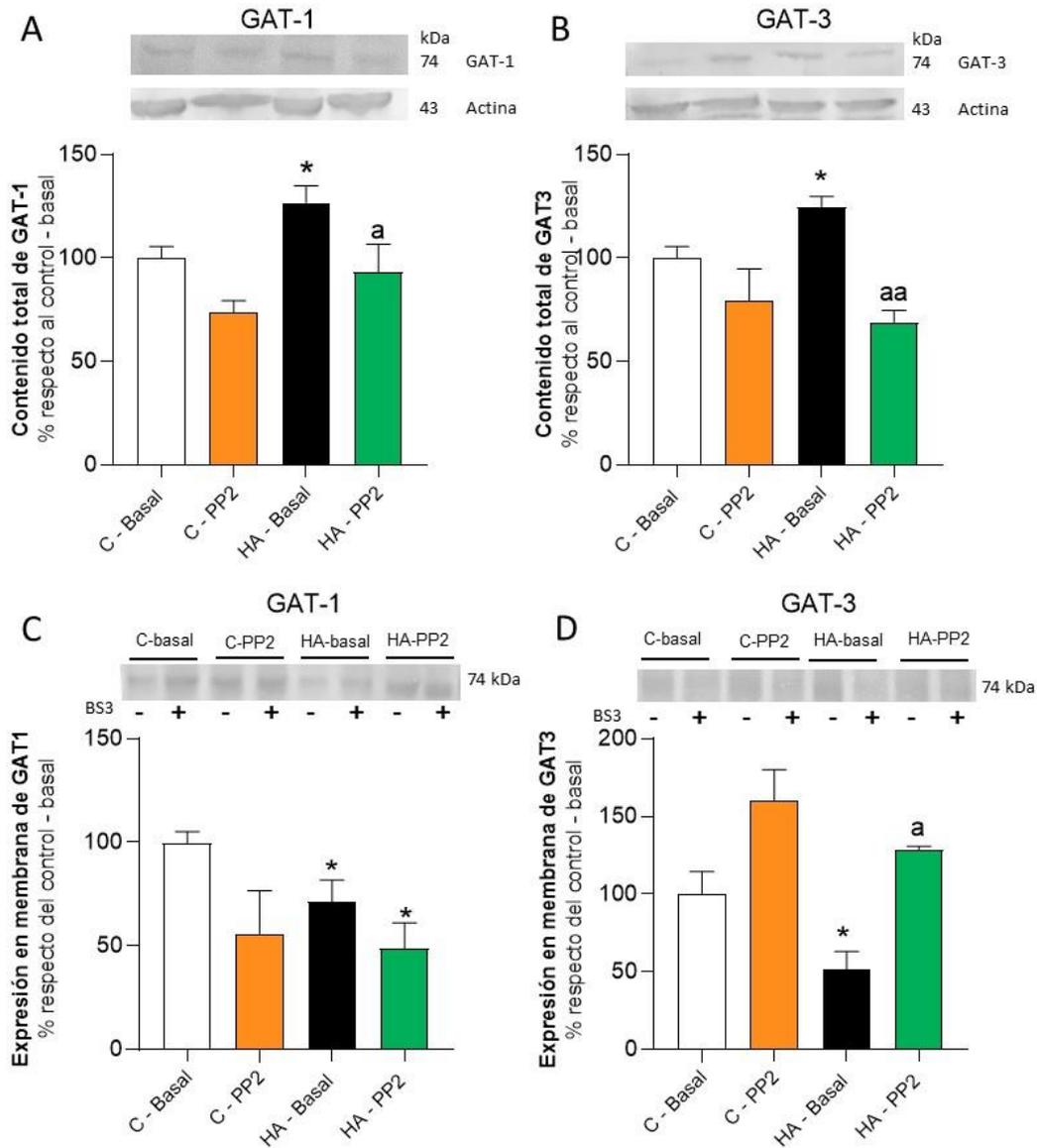


Figura 80. Efecto de la inhibición de Src sobre el contenido total (A, B) y sobre la expresión en membrana (C, D) de GAT-1 y GAT-3. Rodajas frescas de hipocampo procedentes de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin PP2. Las muestras se analizaron por western blot como se describe en métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 3 - 8 ratas por grupo. Todos los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

5.6. Efecto de la inhibición de Src sobre la expresión en membrana de transportadores de Cl⁻

La hiperamonemia disminuye la expresión en membrana de KCC2 y aumenta la de NKCC1 y la inhibición de Src normaliza la expresión en membrana de NKCC1 ($62 \pm 22\%$; $F = 7.872$, $p < 0.01$) y tiende a revertir la disminución en la expresión en membrana de KCC2 ($83 \pm 7\%$; $F = 16.14$, $p > 0.05$), pero las diferencias no llegan a ser significativas. En el grupo control el

tratamiento con PP2 disminuye la expresión en membrana de KCC2 ($46 \pm 8 \%$, $p < 0.01$) y tiende también a disminuir la de NKCC1 ($48 \pm 16 \%$ $p > 0.05$) (Figura 81).

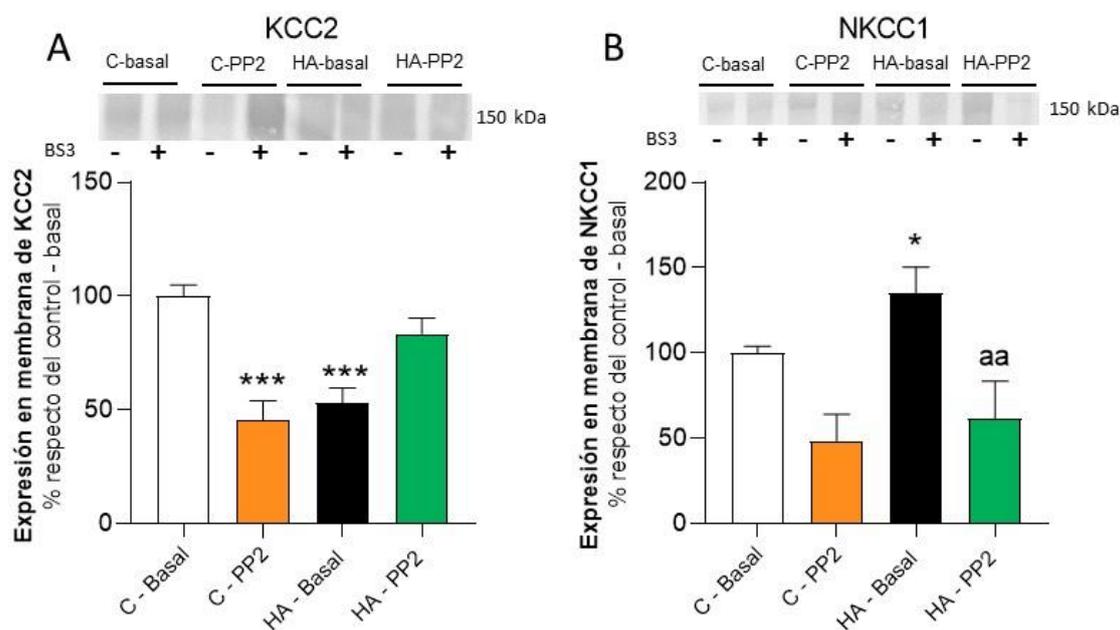


Figura 81. Efecto de la inhibición de Src sobre la expresión en membrana de KCC2 (A) y NKCC1 (B). Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin PP2. La expresión en membrana se analizó por western blot como se describe en métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 4 – 8 ratas por grupo. Los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^{aa} $p < 0.01$).

5.7. Efecto de la inhibición de Src sobre el contenido de IL-1 β , CC12 y BDNF

La hiperamonemia aumenta el contenido de IL-1 β , CC12 y BDNF y el tratamiento con PP2 normaliza el contenido de BDNF ($93 \pm 14 \%$; $H = 12.57$, $p < 0.05$) (Figura 82 B) y de CC12 ($81 \pm 10 \%$; $F = 12.21$, $p < 0.01$) (Figura 82 C), pero no el de IL-1 β ($133 \pm 15 \%$; $F = 7.454$, $p > 0.05$) (Figura 82 A). En el grupo control la inhibición de Src disminuye el contenido de CC12 ($63 \pm 8 \%$; $p < 0.01$), pero afecta al contenido de BDNF ($105 \pm 21 \%$, $p > 0.05$) ni al de IL-1 β ($100 \pm 2 \%$, $p > 0.05$) (Figura 82).

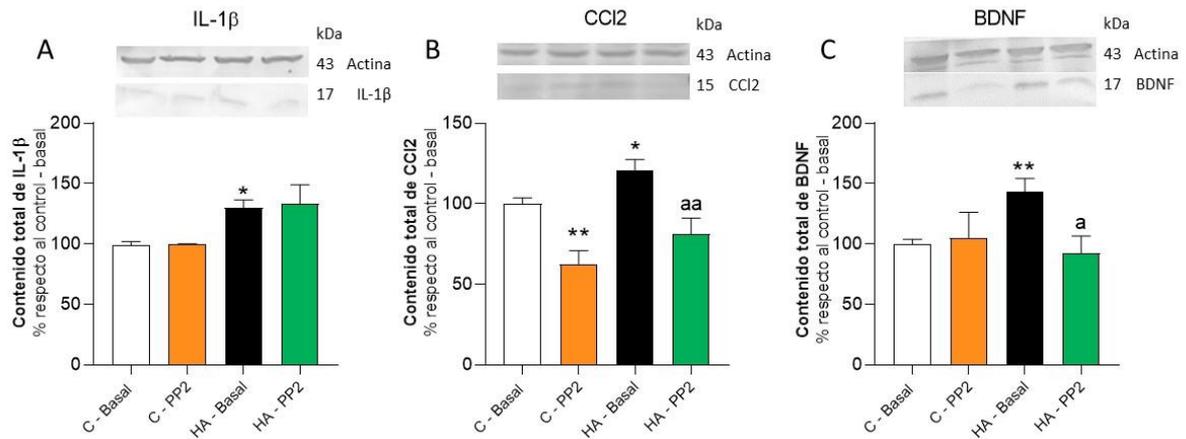


Figura 82. La inhibición de Src revierte el aumento inducido por la hiperamonemia en el contenido de BDNF (C), pero no el de IL-1β (A) y CC12 (B). Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin PP2. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 4-6 ratas por grupo. En A y C los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. En B los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

5.8. Efecto de la inhibición de Src sobre la fosforilación de Src, Akt, CREB y p38

La inhibición de Src revierte el aumento en la fosforilación de Src ($68 \pm 5 \%$; $F = 11.83$, $p < 0.05$), p38 ($83 \pm 10 \%$; $H = 19.4$, $p < 0.05$) y CREB ($97 \pm 11 \%$; $F = 6.869$, $p < 0.05$), pero no el de AKT ($268 \pm 60 \%$; $H = 36.37$, $p > 0.05$). En el grupo control el tratamiento con PP2 aumenta la fosforilación de AKT ($316 \pm 115 \%$, $p < 0.01$), pero no altera ninguna de las otras fosforilaciones en Src ($61 \pm 10 \%$, $p > 0.05$), p38 ($96 \pm 14 \%$, $p > 0.05$) y CREB ($89 \pm 9 \%$, $p > 0.05$) (Figura 83).

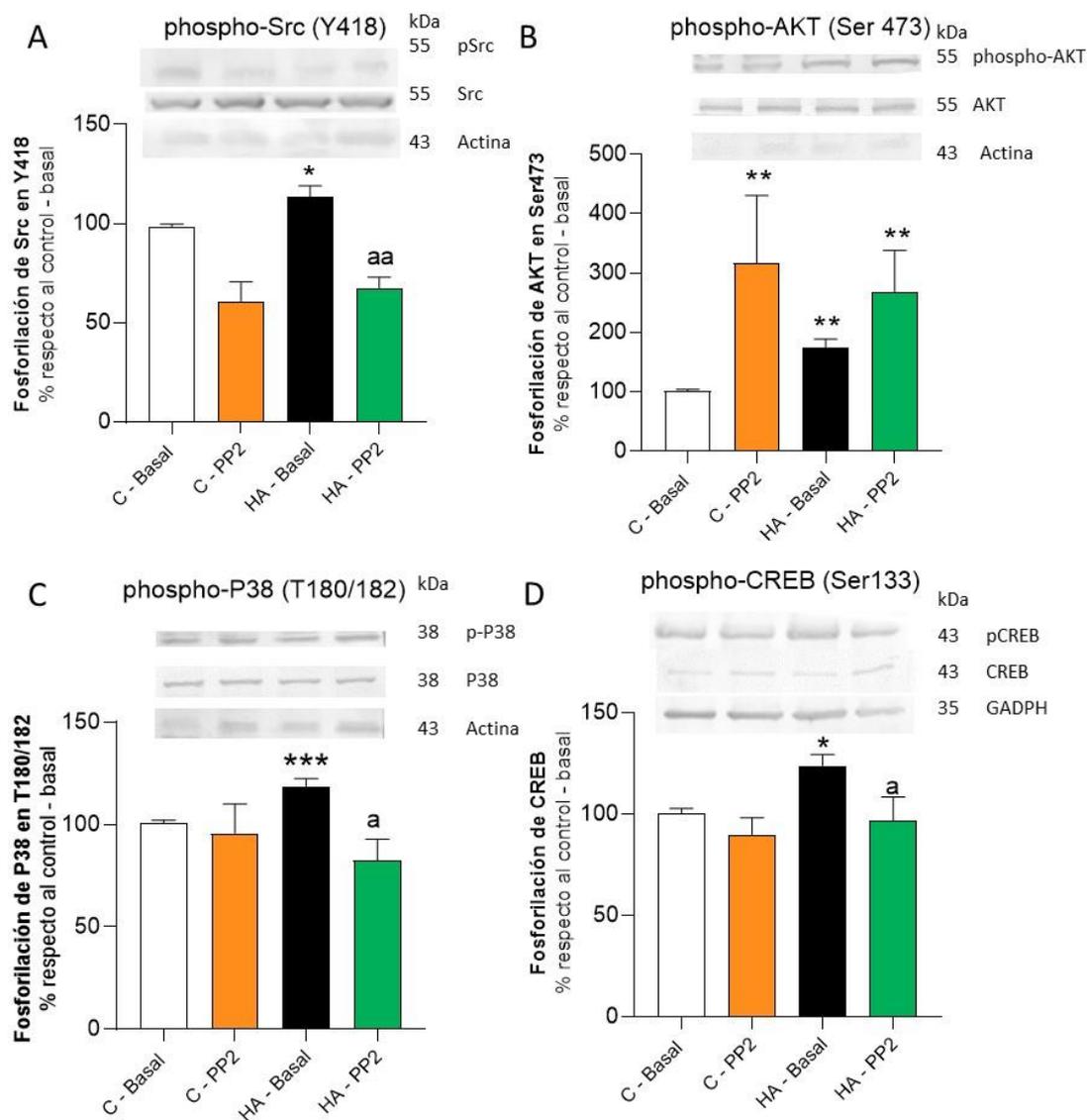


Figura 83. La inhibición de Src revierte el aumento de la fosforilación en ratas hiperamonémicas de Src en Y418 (A), de Akt en Ser473 (B), de CREB en Ser133 (C) y de P38 en T180/182 (D). Rodajas frescas de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas se incubaron con o sin PP2. Las muestras se analizaron por inmunoblot como se describe en material y métodos. Los datos representan el porcentaje respecto de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 5-10 ratas por grupo. En A y D los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. En B y C los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y un test de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) y “a” diferencia significativa respecto a las ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$; ^{aa} $p < 0.01$).

6. EFECTO DEL BLOQUEO DE CCR2 SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN

En el hipocampo de ratas hiperamonémicas hay un aumento del contenido de CCL2 y esta quimiocina juega un papel central en el desarrollo de la neuroinflamación en el SNC, a través de su receptor CCR2 (Foresti et al., 2009; Guo et al., 2014). Para analizar si un aumento de la activación de CCR2 contribuye a la inducción de la neuroinflamación en hipocampo de ratas

hiperamónicas, se estudió el efecto de la inhibición del receptor CCR2 ex vivo en rodajas de hipocampo con RS 504393, un antagonista del receptor CCR2, y analizamos el efecto sobre la activación de microglía y astrocitos.

6.1. Efecto del bloqueo del receptor CCR2 sobre la activación de microglía y astrocitos

El bloqueo de CCR2 revierte la activación de la microglía en ratas hiperamónicas (170 ± 12 µm; $F = 38.4$, $p < 0.05$). En el grupo control el bloqueo del receptor CCR2 disminuye el perímetro celular teñido con Iba1 (142 ± 8 µm, $p < 0.05$), es decir, aumenta la activación de la microglía (Figura 84).

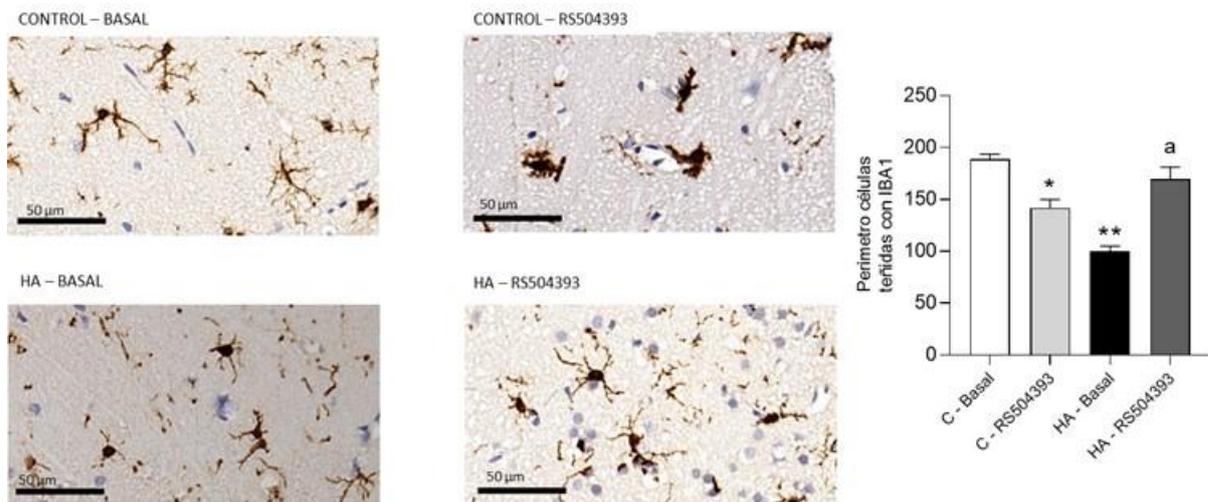


Figura 84. La hiperamnesia induce activación de la microglía en el hipocampo y el tratamiento con RS504393 revierte dicha activación. Se tiñó la microglía con un anticuerpo contra Iba1 en cortes de hipocampo de ratas control e hiperamónicas (HA) tratadas o no con RS504393. Se analizó el perímetro de las células teñidas con Iba1. Se muestran imágenes representativas, la escala mostrada es de 50 µm. Los valores son la media ± SEM de 4 ratas por grupo. Los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a los cortes de hipocampo de ratas con hiperamnesia crónica (^{aa} $p < 0.01$).

En el caso de los astrocitos, el tratamiento con RS504393 no revierte su activación, manteniendo el porcentaje de área teñida por GFAP en valores similares a los observados en ratas hiperamónicas (25 ± 1 % área teñida con GFAP; $F = 37.58$, $p > 0.05$). En el grupo control tampoco observamos del ningún efecto del bloqueo del receptor CCR2 sobre la activación de astrocitos (18 ± 1 %, $p > 0.05$) (Figura 85).

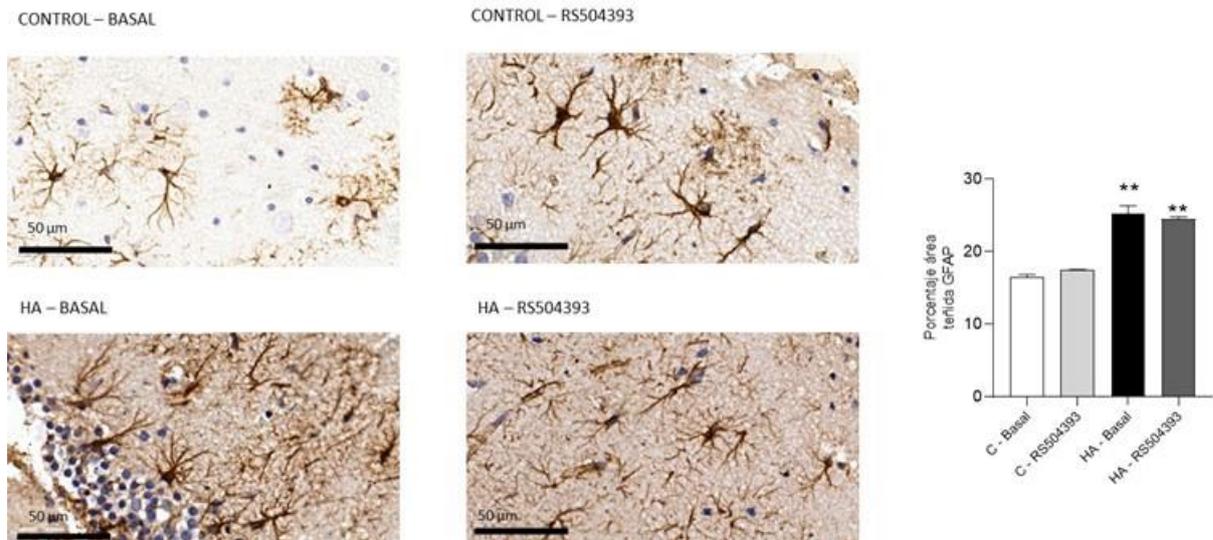


Figura 85. La hiperamonemia induce activación de la microglía en el hipocampo y el tratamiento con RS504393 no revierte dicha activación. Se tiñeron los astrocitos con un anticuerpo contra GFAP en cortes de hipocampo de ratas control e hiperamonémicas (HA) tratadas o no con RS504393. Se analizó el porcentaje de área teñida con anti-GFAP. Se muestran imágenes representativas, la escala mostrada es de 50 µm de longitud. Los datos siguieron una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples Tukey. Los valores son la media \pm SEM de 4 ratas por grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al grupo control (** $p < 0.01$) y “a” diferencia significativa respecto a los cortes de hipocampo de ratas con hiperamonemia crónica (^a $p < 0.05$).

DISCUSIÓN

El tercer capítulo de esta tesis doctoral se ha centrado en estudiar los mecanismos por los que la hiperamonemia crónica modula la neuroinflamación y afecta a los receptores GABA_A, transportadores GABA y co-transportadores de Cl⁻.

1. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA INDUCCIÓN DE NEUROINFLAMACIÓN EN HIPOCAMPO DE RATAS HIPARAMONEMICAS.

Hemos demostrado que en hipocampo de ratas hiperamonemicas hay activación de microglía y astrocitos y están aumentados los niveles de IL- β , CCL2 y BDNF, por lo que analizamos los mecanismos por los que se producen estas alteraciones. Para ello, se analizaron los niveles de estos tres factores y la activación de microglía y astrocitos en cortes de hipocampo tras el tratamiento ex vivo con: JTE013 (antagonista del receptor S1PR2), IL-1Ra (antagonista del receptor de IL-1) y ANA-12 (antagonista del receptor TrkB). Además, también se analizó la activación de microglía y astrocitos tras el tratamiento con RS504393, un antagonista de CCR2.

La tabla 11 resume los efectos de cada uno de estos tratamientos sobre los niveles de IL-1 β , CCL2 y BDNF y sobre la activación de microglía y astrocitos.

Tabla 11. Efecto de la hiperamonemia sobre la neuroinflamación. Efecto del tratamiento ex vivo con IL-1Ra, JTE013, ANA-12, PP2 y wortmanina sobre los niveles de IL-1 β , CCL2 y BDNF, sobre la fosforilación de p38 y CREB y sobre la activación de microglía y astrocitos en el hipocampo de ratas hiperamonémicas y controles.

	IL-1Ra		JTE013		ANA-12		Wortmanina		PP2	
	Control	HA	Control	HA	Control	HA	Control	HA	Control	HA
IL-1 β		↑		↑		↑		↑		↑
CCL2		↑	↓	↑		↑		↑	↓	↑
BDNF		↑		↑		↑		↑		↑
pP38		↑		↑	↑	↑	↑	↑		↑
pCREB		↑		↑		↑		↑		↑
pAkt		↑		↑		↑	↓	↑	↑	↑
pSrc		↑		↑		↑		↑		↑
	IL-1Ra		JTE013		ANA-12		RS504393			
	Control	HA	Control	HA	Control	HA	Control	HA		
Microglía	↑	↑		↑		↑	↑	↑		
Astrocitos		↑	↑	↑		↑		↑		

Se representan con flechas rojas las alteraciones producidas por la hiperamonemia y con flechas verdes las alteraciones producidas por los diferentes tratamientos en ratas control. Las cruces indican reversión por los diferentes tratamientos de las alteraciones producidas por la hiperamonemia.

La tabla 12 resume los tipos celulares en los que se expresan los mediadores inflamatorios que hemos estudiado, así como los receptores de IL-1, S1PR2, CCR2 y TrkB.

Tabla 12. Tipos celulares en los que se expresan en hipocampo los mediadores inflamatorios IL-1 β , CCL2 y BDNF y los receptores de IL-1, S1PR2, TrkB y CCR2.

	Neuronas	Microglía	Astrocitos
IL-1R	Sí	Sí	Sí
S1PR2	Sí	Sí	Sí
TrkB	Sí	Sí	Sí
CCR2	Sí	Sí	No
IL-1 β	Sí	Sí	Sí
CCL2	Sí	Sí	Sí
BDNF	Sí	Sí	Sí

1.1. Papel del receptor S1PR2 en la modulación de la neuroinflamación en hipocampo de ratas hiperamonémicas

El bloqueo de S1PR2, que se expresa tanto en neuronas como en astrocitos y microglía en hipocampo (Anelli et al., 2005; Dong et al., 2019), por el tratamiento con JTE013, revierte la activación de la microglía en ratas hiperamonémicas. Sapkota et al., (2019) demostraron que la administración de JTE013 reduce la activación de la microglía en isquemia cerebral mediante la supresión de la activación de NF- κ B (Jayakumar et al., 2010; Adlimoghaddam et al., 2020). En hiperamonemia también aumenta la traslocación nuclear de NF- κ B en hipocampo (Balzano et al., 2020). Es posible que el tratamiento con JTE013 esté revirtiendo la activación de la microglía a través de la reducción de la activación de NF- κ B.

Hemos comprobado que el tratamiento con JTE013 normaliza el contenido de IL-1 β , CCL2 y BDNF en hipocampo de ratas hiperamonémicas. Se ha demostrado que el bloqueo de S1PR2 por JTE013 reduce la producción de IL-1 β inducida por un patógeno bacteriano oral (Hsu et al., 2019). En arterosclerosis también se ha demostrado que la activación por S1P de su receptor S1PR2 estimula la liberación de citocinas proinflamatorias, entre ellas la IL-1 β . Spkota et al., (2019) demostraron que en isquemia cerebral el bloqueo del receptor S1PR2 por JTE013 revierte la producción de IL-1 β y la activación de la microglía, concretamente la polarización M1 de este

tipo celular. Esto mismo está sucediendo en el hipocampo de ratas hiperamonemias, donde el tratamiento con JTE013 normaliza los niveles de IL-1 β y revierte la activación de microglía. La disminución de los niveles de IL-1 β por JTE013 tiene que estar ocurriendo en neuronas, ya que estudios anteriores del grupo han demostrado que en hipocampo de ratas hiperamonemias la IL-1 β aumenta en este tipo celular (Cabrera-Pastor et al., 2016a; Taoro-Gonzalez et al., 2019; Balzano et al., 2020). Dado que la transcripción de IL-1 β se modula por NF- κ B, el mecanismo por el que el JTE013 disminuiría los niveles de IL-1 β podría implicar la normalización de la activación de NF- κ B (Jayakumar et al., 2011).

Por otra parte, Li et al., 2014 demostraron que la esfingosina-1-fosfato induce la liberación de CCL2 y que el aumento de CCL2 se revierte por el tratamiento con JTE013, al inhibir el receptor S1PR2, lo que coincide con nuestros resultados. Puesto que el bloqueo del receptor S1PR2 normaliza el aumento de IL-1 β y que la IL-1 β promueve la producción de CCL2 en neuronas (Parry et al., 1998; Chui et al., 2010), pensamos que la normalización del contenido de CCL2 por JTE013 es consecuencia de la normalización del contenido de IL-1 β . Parry et al., (1998) demostraron que la IL-1 α y la IL-1 β estimulan la producción de CCL2 por las neuronas a través de la activación del receptor de IL-1. La estimulación de la producción de CCL2 por IL-1 β también se ha observado en astrocitos (Thompson et al., 2009). La activación del receptor de IL-1 activa a Src, que activa al receptor NMDA, lo que aumenta los niveles intracelulares de Ca²⁺, lo que activa a la CAMKII y CREB e induce la transcripción génica de IL-6 (Tsakiri et al., 2008b). Este mecanismo podría estar regulando la transcripción de CCL2 en las neuronas. Otra posibilidad es que la inducción de CCL2 en las neuronas de ratas hiperamonemias esté mediada por la activación del receptor de IL-1, pero que sea dependiente de NF- κ B (Parry et al., 1998).

La activación del receptor S1PR2 también induce la producción de BDNF (Wang et al., 2020), lo que explicaría que el bloqueo del receptor S1PR2 revierta el aumento del contenido de BDNF observado en hipocampo de ratas hiperamonemias. Además, el tratamiento con JTE013 también normaliza el aumento de la fosforilación de p38, que aumenta en microglía activada.

El mecanismo que proponemos es el siguiente: la activación del receptor S1PR2 promueve la producción de IL-1 β en neuronas que, a través de la unión a su receptor, aumenta la producción de CCL2. La unión de CCL2 producido por las neuronas a su receptor CCR2 en microglía promovería la inserción en membrana del receptor P2X4 (Toyomitsu et al., 2012), lo que da lugar a la entrada de Ca²⁺ en la microglía y a la activación de la MAP quinasa p38, a través de su fosforilación en los residuos de treonina 180 y de tirosina 182, lo que estimularía la producción de BDNF (Trang et al., 2011) (Figura 86). El bloqueo del receptor S1PR2 normaliza toda esta vía y la activación de microglía y astrocitos.

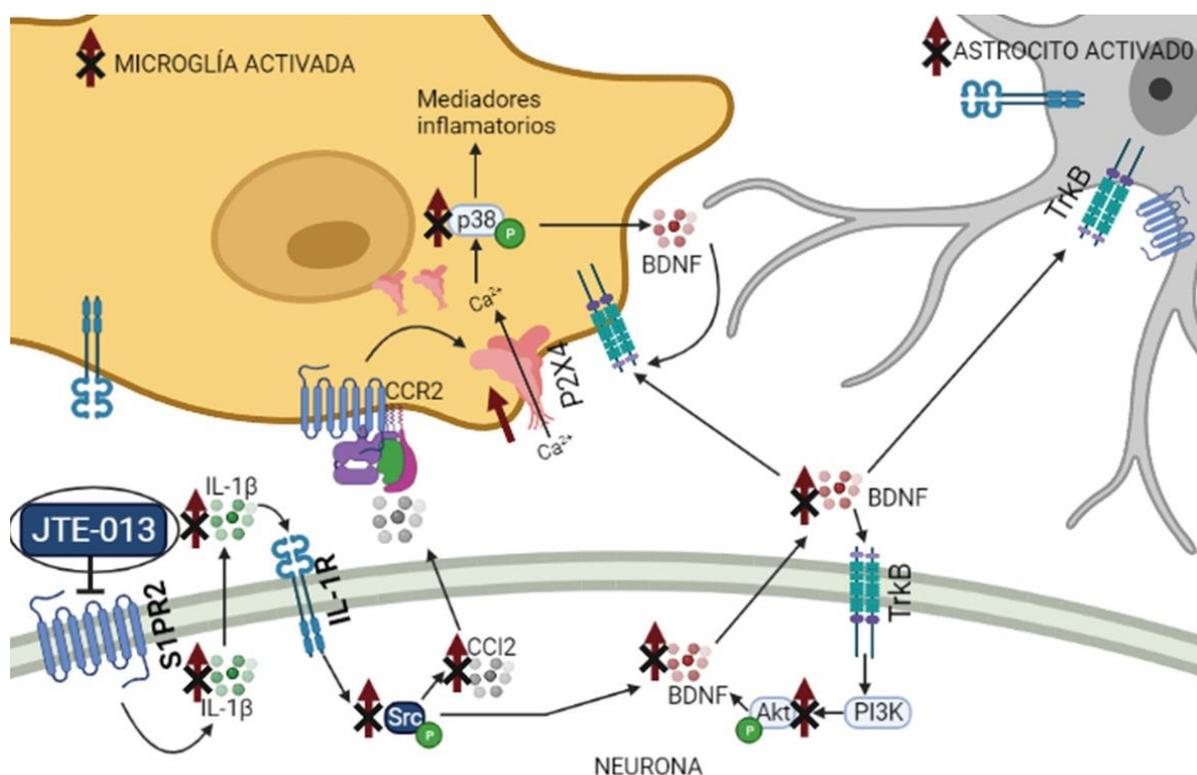


Figura 86. Mecanismos implicados en la inducción de la neuroinflamación en hipocampo de ratas hiperamonémicas y en su reversión por el bloqueo del S1PR2 por JTE013. Mecanismos por los que la hiperamonemia aumenta los niveles de IL-1 β , CCl₂ y BDNF y produce activación de microglía y astrocitos. En hipocampo la hiperamonemia aumenta los niveles de IL-1 β , CCl₂ y BDNF y produce activación de microglía y astrocitos. Se representan, en rojo las alteraciones producidas por la hiperamonemia. Las cruces indican reversión por JTE013 de las alteraciones producidas por la hiperamonemia. Ver explicación en el texto.

Además, el tratamiento con JTE013 también revierte la activación de astrocitos en ratas hiperamonémicas. Pébay et al., (2001) demostraron que la S1P promueve la proliferación astrogliar. Nuestros resultados indican que el BDNF promovería la activación de astrocitos, ya que, como se verá más adelante, el bloqueo del receptor TrkB, que normaliza los niveles de BDNF, pero no los de IL-1 β y CCl₂, revierte la activación de astrocitos. Ding et al., (2020) demostraron que el BDNF activa al receptor TrkB en astrocitos promoviendo su activación y que el bloqueo de S1PR2 normaliza su activación. Esto mismo estaría ocurriendo en hipocampo de las ratas hiperamonémicas. Otra posibilidad es que la hiperamonemia esté modulando la activación de astrocitos a través del receptor S1PR2, el cual se expresa también en astrocitos. Sin embargo, esto es poco probable, ya que en este caso el bloqueo de TrkB no debería revertir la activación de los astrocitos.

La reversión de la activación de astrocitos tiene que ocurrir por una vía diferente a la de la microglía, ya que el bloqueo del receptor CCR2, como se ve en la Tabla 12, no revierte la activación de astrocitos, pero sí la de la microglía. Hipotetizamos que tras la activación del

receptor de IL-1 β las neuronas además de CCL2, también producen BDNF que contribuye a la activación de astrocitos (Figura 86).

La Tabla 11 resume los efectos del tratamiento con JTE013 sobre los niveles de IL-1 β , CCL2 y BDNF y sobre la activación de microglía y astrocitos.

1.2. Papel de la IL-1 y de la activación de su receptor en la inducción de neuroinflamación en hipocampo de ratas hiperamonemias

Estudios anteriores demostraron que el bloqueo del receptor de IL-1 por el tratamiento con IL-1Ra in vivo revierte las alteraciones producidas por la hiperamonemia en la memoria de trabajo y en la memoria de reconocimiento de objetos (Taoro-González et al., 2019). Taoro-González et al., (2019), también demostraron que en ratas hiperamonemias el tratamiento con IL-1Ra in vivo mediante minibombas osmóticas revierte la activación de la microglía. En la presente tesis doctoral demostramos que el tratamiento ex vivo de rodajas de hipocampo de ratas hiperamonemias con IL-1Ra revierte la activación de la microglía, pero, además, también revierte la activación de astrocitos.

En este mismo estudio (Taoro-González et al., 2019) también se demostró que el tratamiento con IL-1Ra in vivo revierte el aumento en los niveles de la propia IL-1 β en hipocampo. En esta tesis demostramos que el tratamiento con IL-1Ra ex vivo también revierte el aumento en la producción de esta citocina en ratas hiperamonemias. IL-1Ra es un péptido endógeno con efectos antiinflamatorios (Klementiev et al., 2014). El IL-1Ra compite con la IL-1 β por su unión al receptor de IL-1, el cual se expresa en neuronas, microglía y astrocitos. El tratamiento con IL-1Ra aumenta la producción de IL-1Ra por la microglía, reduciendo los niveles cerebrales de IL-1 β , probablemente al inhibir su producción (Clausen et al., 2016). Esto puede contribuir a la reversión de la activación de la microglía inducida por el tratamiento con IL-1Ra en ratas hiperamonemias (Tabla 11).

El bloqueo del receptor de IL-1 también revierte el aumento producido por la hiperamonemia en el contenido total de CCL2, en la fosforilación de p38 y en los niveles de BDNF. Diferentes estudios han demostrado que la IL-1 β promueve la producción y liberación de quimiocinas como por ejemplo CCL2 tanto en células endoteliales cerebrales (Chui et al., 2010) como en neuronas (Parry et al., 1998). Así, el aumento de IL-1 β en hiperamonemia aumentaría la producción de CCL2 por las neuronas. Como se ha comentado antes, el CCL2 liberado por las neuronas activaría a su receptor CCR2 en microglía, lo que promovería la inserción en membrana del receptor P2X4 en microglía (Toyomitsu et al., 2012), lo que da lugar a la entrada de Ca²⁺ y a la activación de la MAP quinasa p38, a través de su fosforilación en los residuos de treonina 180 y de tirosina 182, lo que estimularía la producción de BDNF (Trang et al., 2012). Por tanto, parece razonable pensar

que el tratamiento con IL-1Ra al normalizar el contenido de IL-1 β y CCL2 normalice también la activación de la microglía y la producción de BDNF por la microglía normalizando la vía CCL2-CCR2-P2X4-MAPK38-BDNF (Figura 87).

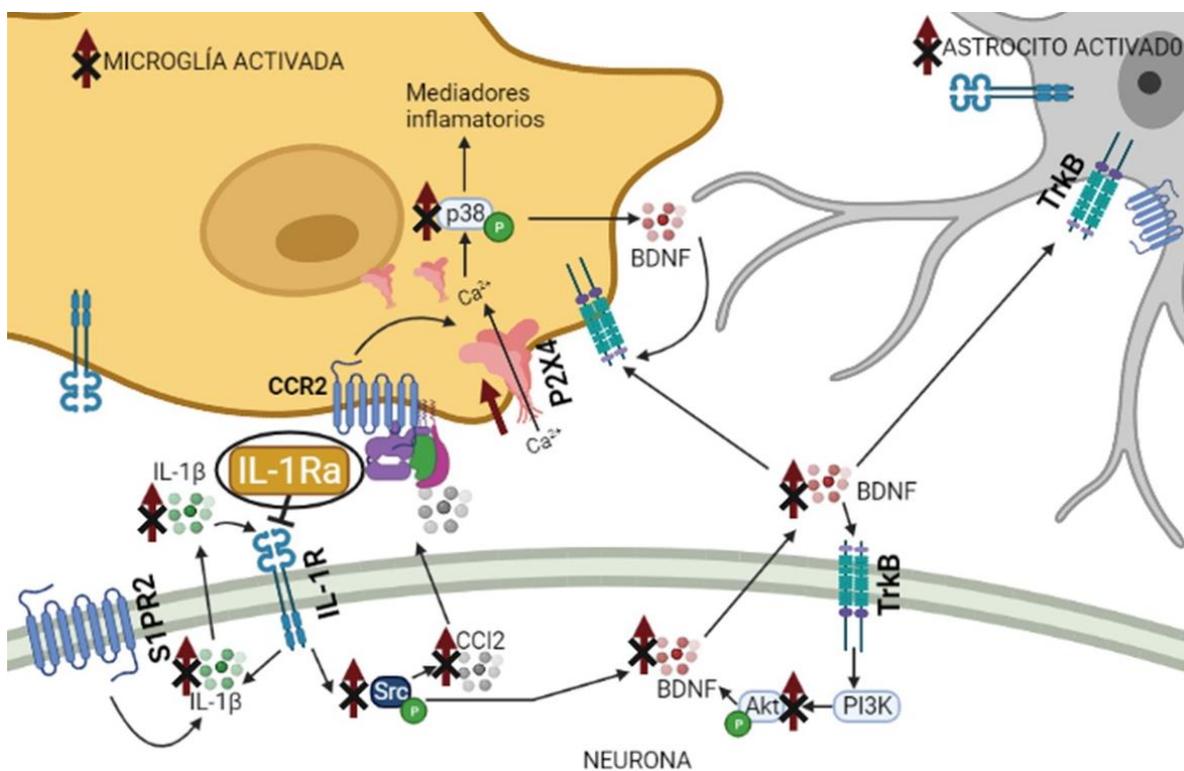


Figura 87. Mecanismos implicados en la inducción de neuroinflamación en hipocampo de ratas hiperamonémicas y en su reversión por el bloqueo del receptor de IL-1. A. Mecanismos por los que la hiperamonemia aumenta los niveles de IL-1 β , CCL2 y BDNF y produce activación de microglía y astrocitos. B. En hipocampo la hiperamonemia aumenta los niveles de IL-1 β , CCL2 y BDNF y produce activación de microglía y astrocitos. Se representa, en rojo las alteraciones producidas por la hiperamonemia. Las cruces indican reversión por IL-1Ra de las alteraciones producidas por la hiperamonemia. Ver explicación en el texto.

Por otra parte, el tratamiento con IL-1Ra también normaliza la activación de astrocitos, la cual tendría lugar a través de la normalización de los niveles de BDNF producidos por las neuronas tras la activación del receptor de IL-1. El aumento de la activación del receptor de IL-1 en hiperamonemia podría inducir el aumento de CCL2 y BDNF por al menos dos mecanismos diferentes: activando los factores de transcripción NF- κ B y/o CREB.

Yu et al., (2018) demostraron que la IL-1 β promueve la producción de BDNF a través de la activación de NF- κ B, algo que también podía estar ocurriendo en hiperamonemia. También se ha demostrado que NF- κ B induce la transcripción de CCL2 (Parry et al., 1998).

El bloqueo del receptor de IL-1 con IL-1Ra también podría normalizar los niveles de BDNF y CCL2 a través de CREB. La activación del receptor de IL-1 en neuronas de hipocampo puede activar a CREB a través de la normalización de p38 (Srinivasan et al., 2004) o de Src (Tsakiri et al., 2008a). La activación del receptor de IL-1 activa a Src, que activa al receptor NMDA, lo que

aumenta los niveles intracelulares de Ca^{2+} que activa a la CAMKII y CREB, lo que induce la transcripción génica (Tsakiri et al., 2008a). Uno de los genes modulados por CREB es el del BDNF (Jin et al., 2019) que, además, podría estar modulando la transcripción de CCI2. Esto podría explicar nuestros resultados en los que el bloqueo del receptor de IL-1 revierte el aumento en la fosforilación de Src y CREB y normaliza los niveles de CCI2 y BDNF. El hecho de que la inhibición de Src con PP2 normalice tanto la fosforilación de CREB como los niveles de BDNF y CCI2 apoya esta hipótesis. Sin embargo, el hecho de que, como se discute después, el bloqueo de TrkB con ANA-12 normaliza la fosforilación de CREB, pero no los niveles de CCI2, sugiere que la modulación de la expresión CCI2 ocurre por un mecanismo independiente de CREB. Funakoshi-Tago et al., (2005) demostraron en cultivos celulares de glioblastoma que la activación de Src por IL-1 aumenta la activación de NF- κ B de una manera independiente de su actividad kinasa. La activación del receptor de IL-1 activa a Src que interacciona con IKK γ , lo que aumenta la activación y la traslocación al núcleo de NF- κ B. Lluís et al., (2007) demostraron que la activación de Src por ROS en cultivos celulares de neuroblastoma y diferentes tipos de carcinomas activa a NF- κ B, a través de la fosforilación de I κ B- α , y que la inhibición de Src disminuye la fosforilación de I κ B- α y, en consecuencia, la activación de NF- κ B. Estos estudios demuestran que Src modula a NF- κ B por diferentes mecanismos, lo que nos lleva a pensar que en hiperamonemia el aumento de los niveles de CCI2 puede estar mediado por la activación de Src y la consiguiente activación de NF- κ B que promovería la transcripción de CCI2. Aunque hemos demostrado que el bloqueo del receptor de IL-1 normaliza la fosforilación de Src, desconocemos el efecto del tratamiento con IL-1Ra sobre NF- κ B. Otro estudio muestra que, en un modelo de ratas con isquemia cerebral, en el que aumentan los niveles de IL-1 β y de NF- κ B (p65/p50) en corteza e hipocampo, el bloqueo del receptor de IL-1 por IL-1Ra disminuye la activación de NF- κ B y su traslocación al núcleo al aumentar la fosforilación de I κ B- α (Hu et al., 2005). Esto mismo puede estar pasando en el hipocampo de ratas hiperamonémicas, que la activación del receptor de IL-1 active Src que fosforila a I κ B, aumentando la activación y traslocación al núcleo de NF- κ B que aumentaría la transcripción de CCI2.

La Tabla 11 resume los efectos del tratamiento con IL-1Ra sobre los niveles de IL-1 β , CCI2 y BDNF y sobre la activación de microglía y astrocitos.

1.3. Efecto del bloqueo del receptor CCR2 sobre la activación de microglía y astrocitos.

El receptor CCR2 es activado principalmente por CCI2. La activación de este receptor desempeña importantes funciones en el desarrollo de la neuroinflamación en múltiples patologías del SNC como Alzheimer o isquemia cerebral, promoviendo la infiltración de monocitos (Chu et al., 2014). Nuestros resultados muestran que la inhibición del receptor CCR2 revierte la activación de la

microglía, pero no la de astrocitos en ratas hiperamonemicas. El receptor CCR2 se localiza fundamentalmente en microglía y neuronas (Komiya et al., 2020). Diversos estudios demuestran que el CCR2 desempeña un papel clave en la modulación de la función de la microglía y que la inhibición de este receptor disminuye la activación de la microglía en algunas patologías del SNC (Tian et al., 2017; Singh et al., 2020), como mostramos también aquí en ratas hiperamonemicas. Zhang et al., (2017) demostraron en un modelo animal de encefalopatía hepática que el CCL2 promueve la activación de la microglía y que el bloqueo de CCR2 revierte esta activación. Sin embargo, el CCR2 no parece modular la activación de astrocitos en ratas hiperamonemicas, ya que la inhibición de este receptor no revierte la activación de astrocitos. CCR2 se expresa en microglía y neuronas, pero no en astrocitos, lo que nos lleva a pensar que en la modulación de la activación de astrocitos no intervendría el BDNF producido por la microglía por la vía CCL2-P2X4-MAPK38-BDNF, sino que la normalización de la activación de astrocitos por JTE013 e IL-1Ra ocurre porque la activación del receptor S1PR2 en neuronas estimula la producción de IL-1 β , que activa al receptor de IL-1 y estimula la producción de BDNF por las neuronas. Este BDNF liberado por las neuronas se uniría al receptor TrkB en astrocitos promoviendo su activación. El hecho de que, como se verá a continuación, el bloqueo de TrkB por el tratamiento con ANA-12, normalice únicamente los niveles de BDNF y la activación de astrocitos, apoya la idea de que el BDNF es el que media la activación de astrocitos en hipocampo de ratas hiperamonemicas (Figura 88).

La Tabla 11 resume los efectos del tratamiento con RS504393 para bloquear el receptor CCR2 sobre la activación de microglía y astrocitos.

1.4. Papel del BDNF y de la activación de su receptor TrkB en la neuroinflamación en hipocampo de ratas hiperamonemicas

El tratamiento con ANA-12 normaliza el contenido de BDNF, pero no revierte el aumento producido por la hiperamonemia en el contenido de CCL2 ni de IL-1 β . La normalización del contenido de BDNF por el bloqueo de TrkB podría estar ocurriendo a través de la normalización CREB. La activación del receptor TrkB activa la vía de señalización PLC γ /CAMKII/CREB que promueve la transcripción génica de BDNF en neuronas (Finkbeiner et al., 1997). El bloqueo de TrkB con ANA-12, inhibiría esta vía y disminuiría la transcripción génica y, por tanto, el contenido de BDNF. El BDNF a través de su receptor TrkB también puede aumentar los niveles de BDNF por la vía PI3K/Akt (Qiao et al., 2013) que, al igual que la activación de la PLC γ y la MAPK, activa a CREB y la transcripción de genes modulados por CREB (Palasz et al., 2020) (Figura 88). El hecho de que la wortmanina, inhibidor de la PI3K, reduzca la activación de Akt, de CREB y los niveles de BDNF, pero no los de CCL2, apoya que en ratas hiperamonemicas la

activación por BDNF de TrkB active la vía PI3K/Akt, que activaría CREB, lo que contribuiría al aumento de la expresión de BDNF, pero no de CCI2.

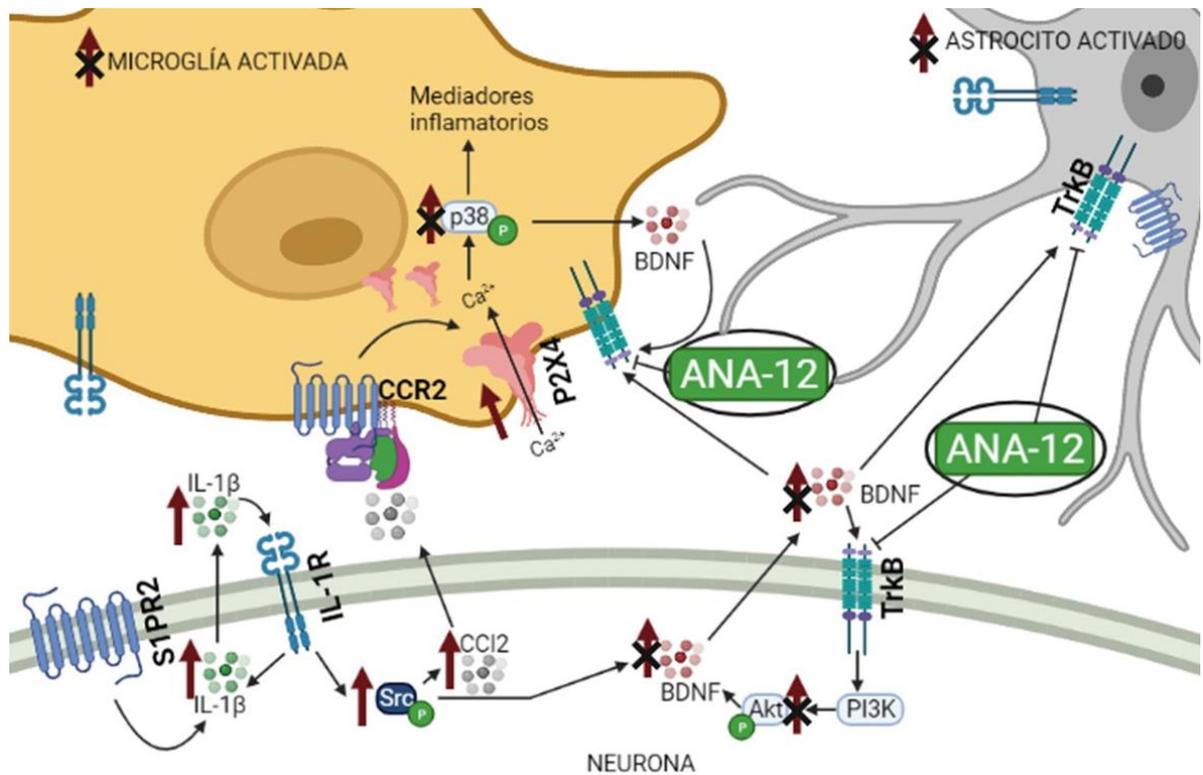


Figura 88. Mecanismos implicados en la inducción de neuroinflamación en hipocampo de ratas hiperamonémicas y en su reversión por el bloqueo del receptor TrkB con ANA-12. Mecanismos por los que la hiperamonemia aumenta los niveles de IL-1 β , CCI2 y BDNF y produce activación de microglía y astrocitos. En hipocampo la hiperamonemia aumenta los niveles de IL-1 β , CCI2 y BDNF y produce activación de microglía y astrocitos. Se representa, en rojo las alteraciones producidas por la hiperamonemia. Las cruces indican reversión de las alteraciones producidas por la hiperamonemia por ANA-12. Ver explicación en el texto.

Zhang et al., (2014) demostraron que la activación de la microglía promueve la liberación de BDNF por este tipo celular y que el secuestro de BDNF con TrkB/Fc revierte la activación de la microglía, lo que sugiere que el BDNF producido por la microglía activada y/o por otros tipos celulares como las neuronas, es crucial para el mantenimiento de la activación microglial en hipocampo. El bloqueo de TrkB con ANA-12 revierte la activación de la microglía, porque la activación de TrkB en este tipo celular es esencial para el mantenimiento de su activación. Zhang et al., (2014) demostraron en cultivos que el ATP activa la microglía aumentando la síntesis de BDNF y que si se elimina este BDNF endógeno disminuye la activación de la microglía y la producción de otros mediadores inflamatorios como TNF- α . Esto sugiere que el tratamiento con ANA-12 revierte la activación de la microglía en ratas hiperamonémicas porque normaliza el contenido de BDNF (Figura 88, Tabla 11). Ding et al., (2020) demostraron que la inyección de BDNF promueve la activación tanto de astrocitos como de microglía en médula espinal y que el bloqueo del receptor TrkB, que se expresa en neuronas, microglía y astrocitos, con ANA-12

revierte dicha activación. Esto coincide con nuestros resultados, en los que el tratamiento de cortes de hipocampo de ratas hiperamonemicas con ANA-12 revierte la activación de astrocitos y microglía. Puesto que el bloqueo del receptor CCR2 no revierte la activación de astrocitos, esta activación debe estar mediada por los aumentos en los niveles de BDNF producido por las neuronas. Estos resultados apoyan la idea de que en hiperamonemia crónica la activación de la microglía es resultado de la activación de la vía CCI2-CCR2-P2X4-MAPKp38-BDNF, ya que tanto el bloqueo del receptor CCR2 como el de TrkB revierten la producción de BDNF y la activación de la microglía. La activación de astrocitos sería consecuencia del aumento en la liberación de BDNF por las neuronas, ya que el bloqueo de TrkB, pero no el bloqueo de CCR2, revierte la activación de los astrocitos.

La Tabla 11 resume los efectos del tratamiento con ANA-12 sobre los niveles de IL-1 β , CCI2 y BDNF y sobre la activación de microglía y astrocitos.

1.5. Papel de la PI3K en la modulación de la neuroinflamación en el hipocampo de ratas hiperamonemicas.

También estudiamos el efecto de la inhibición de la PI3K sobre el contenido de IL-1 β , BDNF y CCI2. La wortmanina, inhibidor de la PI3K, únicamente revierte el aumento del contenido de BDNF producido por la hiperamonemia, pero no revierte el aumento de CCI2 ni de IL-1 β . Esto nos lleva a pensar que alguno de los mecanismos de modulación de la producción de BDNF bien en neuronas o en glía, involucre a la PI3K. Como se ha comentado anteriormente, Qiao et al., (2013) demostraron que el propio BDNF a través de su receptor TrkB promueve la liberación de BDNF. También demostraron que la inhibición de la PI3K con wortmanina revierte el aumento de los niveles de BDNF observados en los ganglios de la raíz dorsal en respuesta a la inflamación de vejiga por cistitis. El aumento en los niveles de BDNF era resultado de la activación de TrkB que activa la vía PI3K/Akt que lleva a la transcripción génica de BDNF. Esto mismo podría estar ocurriendo en hiperamonemia (Figura 88), ya que la inhibición de la PI3K revierte el aumento en la fosforilación de Akt y en los niveles de BDNF. Los mecanismos de inducción de la producción de CCI2 e IL-1 β en hiperamonemia serían independientes de la PI3K, ya que la wortmanina no normaliza los niveles de CCI2 e IL-1 β en ratas hiperamonemicas.

La tabla 11 resume los efectos del tratamiento con wortmanina sobre los niveles de IL-1 β , CCI2 y BDNF.

1.6. Papel de Src en la modulación de la neuroinflamación en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

Analizamos el efecto de la inhibición de Src sobre el contenido de IL-1 β , BDNF y CCL2. El tratamiento con PP2, un inhibidor de Src, revierte el aumento del contenido de BDNF y CCL2, pero no el de IL-1 β . Además, Src se activa como consecuencia de la activación del receptor de IL-1 (Taoro-González et al., 2019), lo que sugiere que la inducción de CCL2 y BDNF a través del receptor de IL-1 podría estar mediada por la activación de Src (Figura 87). Como se ha comentado anteriormente, la activación de Src, activa al receptor NMDA, lo que aumenta los niveles intracelulares de Ca²⁺ que activa a la CAMKII y CREB, lo que induce la transcripción génica de BDNF (Tsakiri et al., 2008a). Nuestros resultados muestran que el bloqueo del receptor de IL-1 revierte el aumento en la fosforilación de Src y CREB y normaliza los niveles de BDNF. Esto sugiere que en hiperamonemia la vía IL-1 β - receptor de IL-1 – Src – CREB contribuye al aumento del contenido de BDNF. El aumento de los niveles de CCL2 ocurre por una vía diferente ya que la inhibición de TrkB no normaliza la fosforilación de CREB, pero sí los niveles de CCL2. Estos resultados sugieren que, como se ha visto en otros estudios (Parry et al., 1998), NF- κ B sería el factor de transcripción que modularía la expresión de CCL2, en este caso en hipocampo de ratas hiperamonémicas.

Por otro lado, se ha demostrado que para la activación de TrkB son esenciales las quinasas Src, una vez activado el receptor TrkB por BDNF se activan cascadas de señalización que promueven la producción y liberación de más BDNF (Huang et al., 2010). En base a los resultados obtenidos, la inhibición de Src podría estar normalizando el aumento en los niveles de BDNF observados en hipocampo de ratas hiperamonémicas tanto por la inhibición de la activación de CREB, como se indica arriba, como por impedir la correcta activación de TrkB y bloquear las vías de la PI3K/Akt y PLC γ /CAMKII/CREB que aumentan los niveles de BDNF.

La Tabla 11 resume los efectos del tratamiento con PP2 sobre los niveles de IL-1 β , CCL2 y BDNF.

En resumen, en hiperamonemia la activación del receptor S1PR2 aumenta los niveles de IL-1 β , que activa al receptor de IL-1. Esto aumenta la producción y liberación de CCL2 por las neuronas que se une a CCR2 en la microglía, lo que promueve la inserción en membrana de P2X4, aumentando la entrada de Ca²⁺ en la microglía, lo que activa a la MAP quinasa p38, a través de su fosforilación en los residuos de treonina 180 y de tirosina 182, lo que estimula la producción de BDNF por la microglía. El aumento de los niveles de BDNF va a contribuir al mantenimiento de la activación de la microglía (Figura 89 A). Por otra parte, el aumento de los niveles de IL-1 β promueve la producción de BDNF en neuronas, que se va a unir al receptor TrkB y a activar a los astrocitos. El aumento de los niveles de IL-1 β que activa al receptor de IL-1, aumenta la activación

de p38 (Srinivasan et al., 2004) y de Src, que activan a CREB que activa la transcripción de BDNF, aumentando así sus niveles. Además, proponemos que la activación del receptor de IL-1 y la activación de Src activan a NF-κB que aumenta la transcripción de CCl2. De acuerdo con los mecanismos propuesto, el bloqueo del receptor S1PR2, al normalizar los niveles de IL-1β normaliza también la activación de Src y los niveles de CCl2 y BDNF y la activación de microglía y astrocitos. El bloqueo del receptor de la IL-1 normaliza los niveles de IL-1β, CCl2 y BDNF y revierte la activación de microglía y astrocitos. El bloqueo de CCR2 normaliza únicamente la activación de microglía. En el caso del bloqueo de TrkB con ANA-12, sólo se normalizan los niveles de BDNF y normaliza tanto la activación de microglía como la de astrocitos (Figura 89 B).

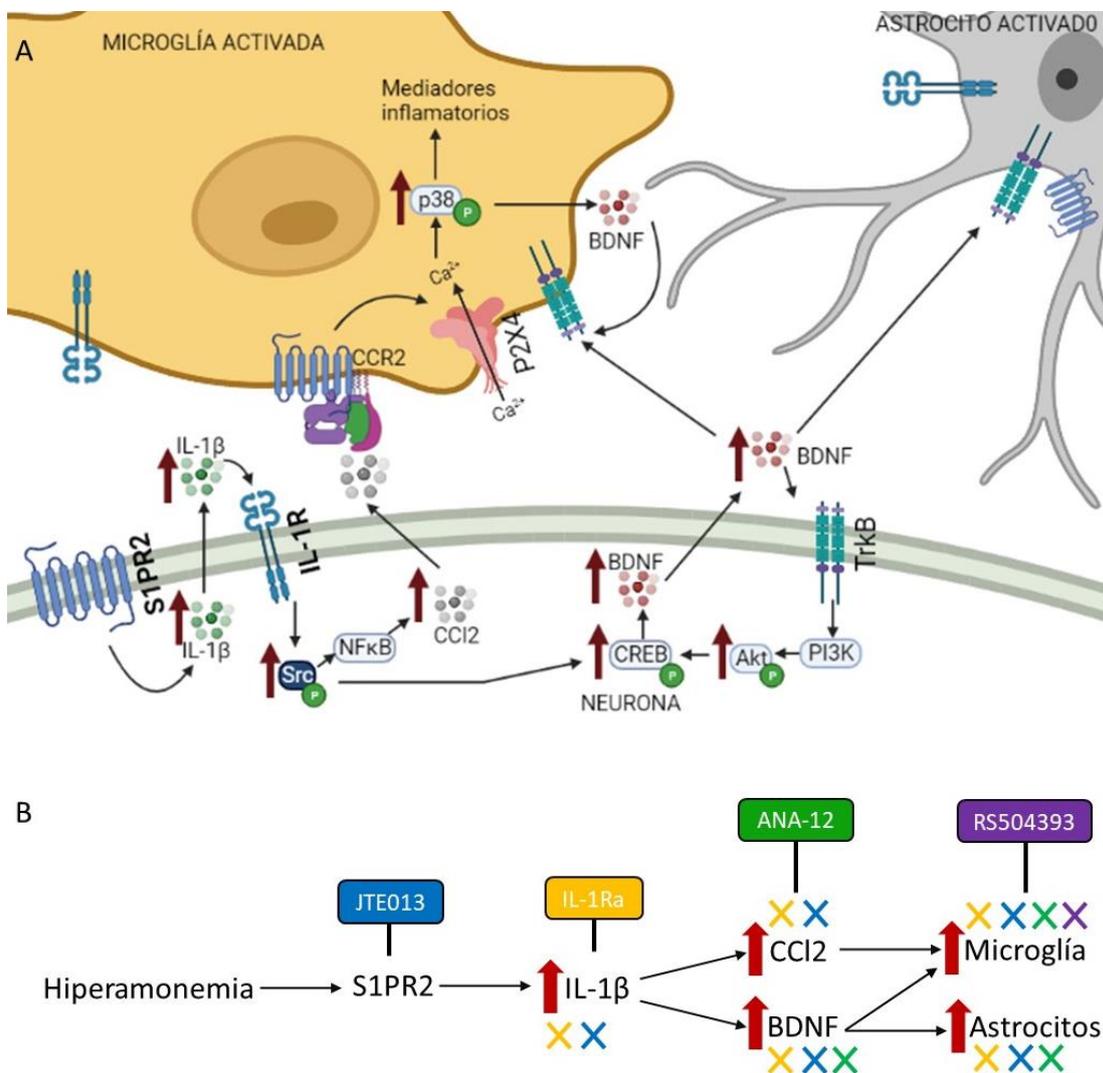


Figura 89. Mecanismos propuestos para la inducción de la neuroinflamación en hipocampo de ratas hiperamonemicas. A. Mecanismos por los que la hiperamonemia aumenta los niveles de IL-1β, CCl2 y BDNF y produce activación de microglía y astrocitos. B. En hipocampo la hiperamonemia aumenta los niveles de IL-1β, CCl2 y BDNF y activa la microglía y astrocitos. Se representa, en rojo las alteraciones producidas por la hiperamonemia. Las cruces indican reversión de las alteraciones producidas por la hiperamonemia por los diferentes tratamientos: JTE013 (azul), IL-1Ra (amarilla), ANA-12 (verde) y RS504393 (morada).

2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LAS ALTERACIONES EN LA NEUROTRANSMISIÓN GABAérgica EN HIPOCAMPO DE RATAS HIPARAMONEMICAS.

2.1. Modulación del contenido extracelular de GABA y de las enzimas glutamato descarboxilasa (GAD65 Y GAD67)

Como ya se ha comentado en el capítulo 2, el contenido total de GABA se encuentra disminuido en hipocampo de ratas hiperamonemias. Puesto que la hiperamonemia no altera el contenido de GAD65, pero sí que disminuye el contenido de GAD67, pensamos que esta disminución conduciría a una menor síntesis de GABA a partir de glutamato, lo que podría explicar la disminución del contenido total de GABA.

También se ha analizado la concentración extracelular de GABA extracelular que, a diferencia del contenido total de GABA, está aumentado en hipocampo de ratas hiperamonemias. Esto puede ser debido a la disminución de la expresión en membrana de los transportadores de GABA, GAT-1 y GAT-3, lo que daría lugar a una menor recaptación de GABA del medio extracelular y, como resultado, aumentaría su concentración extracelular, aunque el contenido total de GABA en hipocampo esté disminuido en hiperamonemia. Una mayor concentración extracelular de GABA, junto con el aumento de la expresión en membrana de receptores GABA_A, sería la responsable del aumento del tono GABAérgico observado en el hipocampo de ratas hiperamonemias (Capítulo 2).

El BDNF es un importante modulador de la neurotransmisión GABAérgica. Gubellini et al., (2005) demostraron que el BDNF es imprescindible para la LTP GABAérgica. En cortex el BDNF es necesario para la correcta expresión de GAD65 (Sánchez-Huertas y Rico, 2011). Existen estudios que demuestran que el BDNF modula la expresión en membrana de transportadores GABA y su función (Law et al., 2000; Whitworth and Quick, 2001; Vaz et al., 2011). Vaz et al., (2008) demostraron que el BDNF inhibe la captación de GABA mediada por GAT-1, lo que aumenta la concentración extracelular de GABA, y que esta inhibición se elimina si se inhibe TrkB. Siguiendo esta idea, en hiperamonemia el aumento de los niveles de BDNF contribuiría al aumento de la concentración extracelular de GABA, al disminuir la captación de GABA a través de GAT-1, cuya expresión en membrana se encuentra disminuida. El bloqueo de TrkB con ANA-12 normaliza la expresión en membrana de los transportadores GABA, por lo que se espera que también normalice el GABA extracelular. Además, el bloqueo de los receptores de IL-1 y S1PR2 también revierten la disminución en la expresión en membrana de los transportadores GABA. Es de esperar que el bloqueo de estos receptores también normalice el GABA extracelular. Sin embargo, debido a que el GABA extracelular se mide por microdiálisis in vivo y nuestros

experimentos son en rodajas de hipocampo *ex vivo*, no conocemos el efecto del bloqueo de los receptores TrkB, de IL-1 y S1PR2 sobre el contenido de GABA extracelular.

Nuestros resultados también demuestran que el bloqueo de TrkB por ANA-12 normaliza tanto la expresión de GAD67 como el contenido total de GABA, sin alterar la expresión de GAD65. El bloqueo del receptor de IL-1 y S1PR2 también normalizan el contenido total de GABA y la expresión en membrana de GAT-1 y GAT-3, posiblemente como resultado de la normalización de los niveles de BDNF.

Como se ha comentado en el capítulo 2 el aumento del tono GABAérgico en hipocampo puede ser resultado de diferentes factores: aumento del GABA extracelular, aumento de la cantidad de receptores GABA_A, aumento de la concentración de compuestos endógenos análogos a la benzodiazepina que aumentan la activación de los receptores GABA_A, por un aumento de la concentración de neuroesteroides que también aumentan la activación de los receptores GABA_A o directamente por un aumento de la activación de los receptores GABA_A por amonio (Cauli et al., 2009).

Los resultados sugieren que en hiperamonemia el aumento de los niveles de BDNF disminuyen la expresión en membrana de GAT-1 y GAT-3, lo que aumenta la concentración de GABA extracelular. El bloqueo del receptor TrkB y de los receptores de IL-1 y S1PR2, que normalizan los niveles de BDNF, revierten la disminución de la expresión en membrana de los dos transportadores GABA y, posiblemente, normalicen también el contenido de GABA extracelular.

Al mismo tiempo, la hiperamonemia disminuye la expresión de GAD67 y, como resultado, disminuye la síntesis de GABA, lo que da lugar a un menor contenido total de GABA. El bloqueo del receptor TrkB y de los receptores de IL-1 y S1PR2, que revierten el aumento en los niveles de BDNF observados en hipocampo de ratas hiperamonemicas, normalizan tanto el contenido de GAD67 como el contenido total de GABA.

2.2. Modulación de la expresión en membrana de receptores GABA_A, transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻

Hemos demostrado que la hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ y δ del receptor GABA_A y disminuye la de la subunidad $\alpha 5$ en hipocampo. Además, en el hipocampo de ratas hiperamonemicas está disminuida la expresión en membrana de los transportadores de GABA GAT-1 y GAT-3 y del cotransportador de Cl⁻ KCC2, mientras que está aumentada la expresión en membrana del cotransportador de Cl⁻ NKCC1. Partimos de la idea de que estas alteraciones son consecuencia de la neuroinflamación. Con el fin de analizar los mecanismos por los que la neuroinflamación modula la expresión en membrana del receptor

GABA_A, de los cotransportadores de Cl⁻ y de los transportadores de GABA, se analizó el efecto sobre los mismos de los siguientes tratamientos ex vivo con: JTE013 (antagonista del receptor S1PR2), IL-1Ra (antagonista del receptor de IL-1) y ANA-12 (antagonista del receptor TrkB).

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 13.

Tabla 13. Alteraciones en la expresión en membrana de receptores y transportadores de GABA y de Cl⁻ en hipocampo ratas hiperamonémicas. Efectos del tratamiento ex vivo con IL-1Ra, JTE013, ANA-12, PP2 y wortmanina en ratas hiperamonémicas y controles

		IL-1Ra		JTE013		ANA-12		Wortmanina		PP2	
		Control	HA	Control	HA	Control	HA	Control	HA	Control	HA
Subunidades del receptor GABA _A	GABA α1	↑	✗		✗		✗		✗		✗
	GABA α2		✗		✗		✗		✗		✗
	GABA α5	↑	↓		↓		↓	↑	✗		↓
	GABA γ2	↑	✗		✗		✗		✗		✗
	GABA β3		✗		✗		✗		✗		✗
	GABA δ		✗		✗		✗		✗		✗
	p GABA β3		✗		✗		✗		✗		✗
TRANSPORTADORES GABA	GAT-1	↑	✗	↑	✗	↑	✗		↓		↓
	GAT-3	↓	✗		✗	↓	✗		✗	↑	✗
COTRANSPORTADORES Cl ⁻	KCC2		✗	↑	✗	↑	✗	↑	✗	↓	↓
	NKCC1		↑		✗		✗		✗		✗

Se representan, en rojo (aumentos) y azul (disminuciones), las alteraciones causadas por la hiperamonemia en la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A, transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻. Las cruces representan la reversión por los diferentes tratamientos de las alteraciones observadas en ratas hiperamonémicas. En verde, los efectos de cada tratamiento sobre la expresión en membrana en ratas controles.

2.2.1. Papel del receptor TrkB en las alteraciones en la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A, de transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻ en hipocampo de ratas hiperamonémicas

El bloqueo del receptor TrkB con ANA-12, normaliza la expresión en membrana de las subunidades α1, α2, γ2, β3 y δ del receptor GABA_A pero no la de la subunidad α5. En hiperamonemia aumenta el contenido de BDNF y el tratamiento con ANA-12 lo normaliza. Se ha demostrado que el BDNF, aumenta la expresión de las subunidades de los receptores GABA_A y facilita la liberación de GABA en cultivos de neuronas de hipocampo (Yamada et al., 2002). Estos datos sugieren que el aumento de BDNF contribuye al aumento de la expresión en membrana de las subunidades α1, α2, γ2, β3 y δ del receptor GABA_A.

Una de las subunidades clave en la modulación de la expresión en membrana de receptores GABA_A es la subunidad $\beta 3$. Las subunidades β del receptor GABA_A, contiene un motivo de unión a AP2, en los residuos 401-412. La subunidad $\mu 2$ del complejo AP2 se une a estos motivos induciendo la endocitosis de receptores GABA_A (Kittler et al., 2005). La fosforilación de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A en los residuos de serina 408 y 409 (dentro del motivo de unión a AP2) evita la unión de AP2, lo que aumenta la expresión en membrana tanto de $\beta 3$ como de otras subunidades y el contenido de gephyrin (Nakamura et al., 2015). En epilepsia disminuye la fosforilación de los residuos de serina 408/9 de la subunidad $\beta 3$ por la PKC, lo que aumenta la unión de AP2 y promueve la endocitosis de algunos subtipos de receptores GABA_A. El aumento de la fosforilación de S408/9 y el bloqueo de la unión de $\beta 3$ a AP2 aumenta la expresión en membrana de receptores GABA_A y restaura la eficacia de la inhibición sináptica (Terunuma et al., 2014). Nosotros hemos demostrado que en ratas hiperamonémicas hay un aumento de la fosforilación de la subunidad $\beta 3$ en los residuos S408/409 y que el bloqueo de TrkB con ANA-12 revierte este aumento. Una de las vías de transducción de señal activadas por el receptor TrkB es la de la PI3K-PKC (Porcher et al., 2018) y la PKC es una de las quinasas que cataliza la fosforilación de $\beta 3$; el bloqueo del receptor TrkB podría normalizar la expresión en membrana del receptor GABA_A porque normaliza la fosforilación de $\beta 3$, permitiendo la unión de AP2 y la internalización de receptores GABA_A (Figura 90). Como se verá más adelante en la discusión, la inhibición de la PI3K por wortmanina también revierte el aumento de la fosforilación en los residuos S408/409 de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A en ratas hiperamonémicas. Otra de las vías que activa TrkB es la vía PLC- γ /PKC- δ , mediante la cual también podría modular la fosforilación de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A (Minichiello, 2009).

Otra subunidad clave en la modulación de la expresión en membrana de los receptores GABA_A, es la subunidad $\gamma 2$. Los residuos de tirosina 365 y 367 de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A son sitios de fosforilación por Src y, además, son sitios de unión a AP2, que media la internalización de receptores GABA_A. La fosforilación de los residuos de tirosina 365 y 367 de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A impide la unión de AP2, aumentando la expresión en membrana de receptores GABA_A. Kittler et al., (2008) mostraron que cuando se introducen subunidades $\gamma 2$ no fosforiladas, se reduce la expresión en membrana de receptores GABA_A y la amplitud de los mIPSCs mediados por receptores GABA_A disminuye. Como se comenta en la introducción (Tabla 1, apartado 6.1), la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A en hipocampo se combina con las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 3$ y δ y puede facilitar su inserción en membrana. Sin embargo, no hemos podido analizar el efecto de la hiperamonemia sobre la fosforilación de $\gamma 2$ en los residuos de tirosina 365 y 367 por no disponer de un anticuerpo comercial que reconozca la forma fosforilada, por lo que desconocemos si los niveles de fosforilación de la subunidad $\gamma 2$ están aumentados en hiperamonemia y, en caso de que fuese así, los mecanismos implicados.

La ratio de expresión KCC2/NKCC1 cambia durante el desarrollo y en determinadas patologías (Zhang et al., 2021). En algunas patologías, como en isquemia cerebral o epilepsia, disminuye la expresión en membrana de KCC2, por el aumento de BDNF, que induce la fosforilación de la fosfolipasa C gamma1 (PLC γ 1) en el residuo T783, lo que conduce a la internalización de KCC2 (Carter et al., 2018). Otros estudios también han demostrado que el tratamiento con antagonistas de TrkB aumenta la expresión de KCC2 (Rivera et al., 2002; Béjot et al., 2011). En el hipocampo de ratas hiperamonémicas, el tratamiento con ANA-12 revierte la disminución de la expresión en membrana de KCC2. Además, en el grupo control el bloqueo del receptor TrkB también aumenta la expresión en membrana de KCC2. Estos datos apoyan que la activación de TrkB por BDNF es responsable de la disminución de la expresión en membrana de KCC2 en hipocampo de ratas hiperamonémicas.

Un mecanismo por el que la activación de TrkB podría reducir la expresión en membrana de KCC2 en hiperamonemia es por fosforilación de los residuos de tirosina 903 y 1087 por Src que promueve la internalización de KCC2 (Figura 90). En rodajas de hipocampo el BDNF a través de la activación de TrkB activa dos vías de transducción de señales que implican Shc/FRS-2, con un dominio de homología Src, y la PLC γ , que aumentan la fosforilación de KCC2 en los residuos de tirosina 903 1087, lo que aumenta su internalización y disminuye su expresión en membrana. Sin embargo, desconocemos los niveles de fosforilación de estos residuos en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

En la presente tesis hemos descrito que la hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de NKCC1 y que el tratamiento con ANA-12 la normaliza. Eftekhari et al., (2014) demostraron que el BDNF aumenta la expresión en membrana de NKCC1 y disminuye la de KCC2 en hipocampo de modelos animales de epilepsia. Esto mismo sucede en el hipocampo de ratas hiperamonémicas. Se han identificado fosforilaciones en NKCC1 que aumentan la función de cotransporte. Por ejemplo, la activación de TrkB activa la vía WNK-SPAK/OSR1, que fosforila a NKCC1 aumentando su función de cotransporte. Sin embargo, no hemos encontrado estudios que identifiquen modificaciones postraduccionales que modulen la expresión en membrana de NKCC1. Diferentes estudios en células de endotelio vascular y en enterocitos muestran que el transporte desde y hacia la membrana están regulados por diferentes mecanismos, por ejemplo, interacciones con componentes del citoesqueleto, de manera independiente de fosforilación (Klein et al., 1995; Flatman et al., 2002; Flatman et al., 2005), algo que también podría estar sucediendo en hiperamonemia. Desconocemos los mecanismos por los que la hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de NKCC1 en hipocampo ni como el bloqueo de TrkB la revierte.

También hemos demostrado que el bloqueo del receptor TrkB no sólo normaliza el contenido total de GAT-1 y GAT-3, sino que también revierte la disminución de la expresión en membrana de estos dos transportadores de GABA observada en ratas hiperamonémicas. La syntaxina modula positivamente la expresión en membrana de GAT-1 y la fosforilación de Munc-18 por la PKC inhibe la unión de la syntaxina a GAT-1 y reduce su expresión en membrana (Beckman et al., 1998). Una de las vías activadas por TrkB es la de la PI3K-PKC, por lo que podría ser que el aumento de la actividad de la PKC inducido por BDNF a través de la activación de TrkB en hiperamonemia aumente la fosforilación de Munc-18, reduciendo la unión de la syntaxina y la expresión en membrana de GAT-1. El tratamiento con ANA-12 disminuiría la activación de la PKC que, a su vez, disminuiría la fosforilación de Munc-18, aumentando la unión de la syntaxina a GAT-1 y, como consecuencia, la expresión en membrana de GAT-1. Sin embargo, el bloqueo de la PI3K mediante el tratamiento con wortmanina no revierte la expresión en membrana de GAT-1, por lo que la idea de que TrkB normalice la expresión en membrana a través de la vía PI3K/PKC/syntaxina parece poco probable. No obstante, la activación de TrkB por BDNF también activa la vía de la PLC γ . La fosforilación de la tirosina 816 de TrkB conduce al reclutamiento y la fosforilación de la PLC γ 1. La PLC γ 1 activada hidroliza el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato para generar inositol-1,4,5-trifosfato (Ins (1,4,5) P $_3$) y diacilglicerol (DAG). El Ins (1,4,5) P $_3$ promueve la liberación de Ca $^{2+}$ intracelular, lo que activa a enzimas como las proteínas quinasas dependientes de Ca $^{2+}$ /calmodulina. El DAG activa diferentes isoformas de PKC (Minichiello, 2009). Una posibilidad es que la activación de TrkB disminuya la expresión en membrana de GAT-1 a través de la activación de la PKC por la vía de la PLC γ , de manera independiente de la PI3K. Esto aumentaría la fosforilación de Munc-18, reduciendo la unión de la syntaxina a GAT-1 y, como consecuencia, disminuiría la expresión en membrana de este transportador. Esto, a su vez, explicaría tanto que el bloqueo de TrkB con ANA-12 normalice la expresión en membrana de GAT-1, como que la wortmanina no revierta la disminución de la expresión en membrana de GAT-1. En cualquier caso, no sabemos si la fosforilación de Munc-18 se encuentra aumentada en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

Por otra parte, se ha demostrado que el estado de fosforilación de GAT-1 determina la localización subcelular de GAT-1. La fosforilación en los residuos de serina hace que el transportador adopte una conformación que dificulta la fosforilación de la tirosina y favorece las interacciones con la maquinaria de internalización, acelerando así la endocitosis de GAT-1, aumentando la reserva intracelular del transportador. Mientras, la fosforilación los residuos de tirosina (Tyr-107, Tyr-317, Tyr-412, Tyr-481, and Tyr-598) tiene el efecto contrario, aumenta la expresión en membrana de GAT-1 (Quick et al., 2004). El aumento de la actividad de la PKC promueve la disminución de la expresión en membrana de GAT1. GAT1 se fosforila en residuos de serina de forma dependiente de la PKC, pero este estado sólo se observa cuando la fosforilación en los residuos

de tirosina de GAT1 se eliminan o se reduce en gran medida (Quick et al., 2004). Esto mismo podría estar sucediendo en hiperamonemia, que haya un aumento en la fosforilación por PKC en alguno de los residuos de serina, lo que aumentaría la internalización de GAT-1 y, como consecuencia, disminuiría la expresión en membrana, aunque la expresión de GAT-1 aumente. No obstante, desconocemos los niveles de fosforilación de estos residuos.

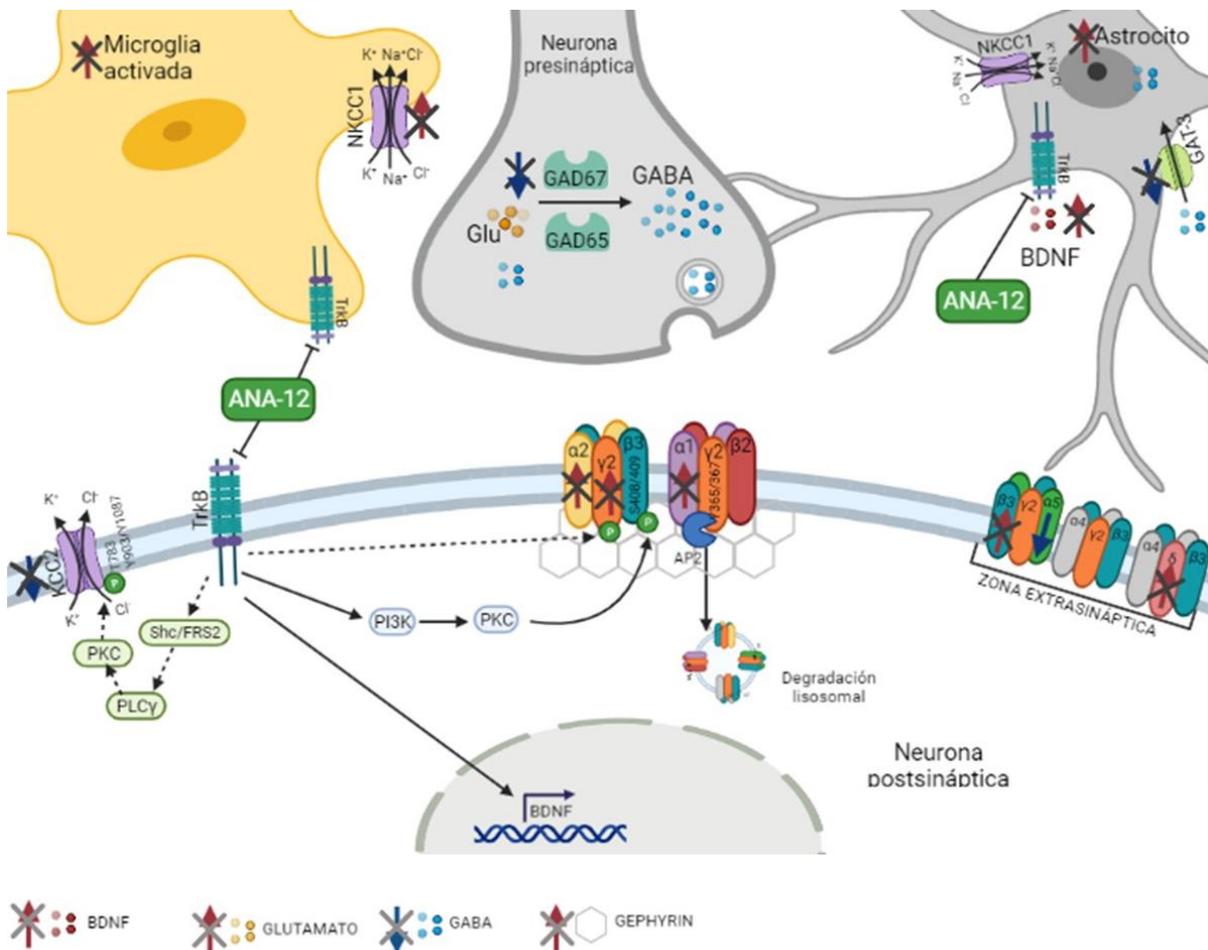


Figura 90. Mecanismos por los que la hiperamonemia altera la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A, de transportadores GABA y de cotransportadores de Cl⁻. Efecto del bloqueo del receptor TrkB sobre las alteraciones observadas en ratas hiperamonémicas. Se representa, en rojo (aumentos) y azul (disminuciones), las alteraciones causadas por la hiperamonemia en la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A, transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻, las alteraciones en el contenido total de gephyrin, GAD67, IL-1β, BDNF y CCI2. Las cruces representan la reversión de las alteraciones observadas en ratas hiperamonémicas por el tratamiento con ANA-12. Las flechas con líneas discontinuas indican posibles vías mediadas por TrkB, pero que no han sido analizadas en hiperamonemia.

Se ha demostrado también que las concentraciones bajas de GABA extracelular aumentan la fosforilación en residuos de tirosina de GAT1, lo que aumenta la expresión en membrana del transportador (Whitworth y Quick, 2001). Por el contrario, concentraciones más altas de GABA extracelular, aumentan la fosforilación en los residuos de serina de GAT1, lo que disminuye la expresión en membrana del transportador. Esto es coherente con nuestros resultados, ya que en hipocampo de ratas hiperamonémicas hay un aumento del contenido extracelular de GABA y una

disminución de la expresión en membrana de GAT-1. Estos efectos podrían estar mediados por la vía PLC γ /DAG/PKC. Hay estudios que demuestran la modulación de GAT-1 por la unión del BDNF a TrkB y la activación de esta vía. Vaz et al., (2008) demostraron que el tratamiento con BDNF inhibe la captación de GABA mediada por GAT-1, lo que aumenta la concentración extracelular de GABA, y que esta inhibición se elimina tanto si se inhibe TrkB como la PLC en neuronas de hipocampo de rata.

Aunque la hiperamonemia también disminuye la expresión en membrana de GAT-3, desconocemos el mecanismo por el que se produce. No hemos encontrado bibliografía acerca de los mecanismos de modulación de la expresión en membrana de GAT-3.

En la tabla 13 se resumen los efectos del bloqueo de TrkB sobre la expresión en membrana de receptores GABA_A, transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻.

2.2.2. Papel del receptor de la IL-1 en las alteraciones en la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A, de transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻ en hipocampo de ratas hiperamonémicas

Taoro-González et al., (2019) demostraron que el bloqueo del receptor de IL-1 por tratamiento intracerebral con IL-1Ra restaura la expresión en membrana de las subunidades GluN2A del receptor NMDA y GluA1 del receptor AMPA, pero no normaliza la expresión en membrana de la subunidad GluN1 del receptor NMDA y tampoco normaliza las de la subunidad GluN2B del receptor NMDA ni la subunidad GluA2 del AMPA, que están aumentadas en hiperamonemia. Además, también demostraron que el bloqueo del receptor de la IL-1 revierte el aumento de la expresión en membrana de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A inducida por la hiperamonemia. Sin embargo, no se conocía el efecto de la hiperamonemia ni del tratamiento con IL-1Ra sobre la expresión en membrana del resto de subunidades del receptor GABA_A. En la presente tesis doctoral demostramos que el tratamiento ex vivo con IL-1Ra, al igual que el tratamiento con ANA-12, revierte el aumento en la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ y δ del receptor GABA_A, pero no revierte la disminución de la expresión en membrana de $\alpha 5$ producida por la hiperamonemia. Puesto que el bloqueo del receptor de IL-1 normaliza el contenido de BDNF, una posibilidad es que el aumento de IL-1 β en hiperamonemia aumente la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A porque aumenta BDNF y la activación de TrkB por los mecanismos descritos anteriormente (Discusión capítulo 3, apartado 2.1.).

El receptor de IL-1 también activa otras vías de transducción de señales mediante las que podría modular la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A en hipocampo de ratas hiperamonémicas. Taoro-Gonzalez et al., (2018) demostraron que el tratamiento con IL-1Ra revierte el aumento en la fosforilación de Src en el residuo de tirosina 418, pero no el aumento de la fosforilación de Akt en el residuo de serina 473. Serantes et al., (2006) demostraron que en oocitos la IL-1 β promueve, de manera dependiente del receptor de IL-1, la activación de la PI3K y está la de Akt, lo que induce la inserción de receptores GABA_A en membrana. Según este estudio la IL-1 β induce la inserción de receptores GABA_A en la membrana al promover la fosforilación de las subunidades γ 2 y β 3 del receptor GABA_A en neuronas de hipocampo. No obstante, no consiguieron demostrar que estas fosforilaciones estuviesen mediadas por Akt. Aquí, nosotros demostramos que el bloqueo del receptor de IL-1 normaliza la expresión en membrana de todas las subunidades del receptor GABA_A, a excepción de la subunidad α 5, de una forma independiente de Akt, ya que el tratamiento con IL-1Ra no revierte el aumento de la fosforilación de Akt en el residuo Ser473 producido por la hiperamonemia. Esto sugiere que la modulación de la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A puede ocurrir por mecanismos diferentes en distintos tipos celulares, siendo diferente en neuronas de hipocampo y oocitos, probablemente porque expresan diferentes componentes de las vías de transducción de señales implicadas.

Por otra parte, el bloqueo del receptor de IL-1 sí revierte el aumento en la fosforilación de Src en Y418. Una posibilidad es que la normalización de la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A mediada por IL-1Ra se produzca por la reversión del aumento de la fosforilación de la subunidad β 3 del receptor GABA_A y que esta fosforilación esté mediada por Src, ya que como se verá más adelante la inhibición de Src por PP2 también normaliza la expresión en membrana de las subunidades α 1, α 2, γ 2, β 3 y δ del receptor GABA_A. Sin embargo, según la bibliografía, la fosforilación de la subunidad β 3 del receptor GABA_A no está mediada por Src, sino por otras quinasas como Akt o la PKC (Nakamura et al., 2015). Taoro-Gonzalez et al., (2018) demostraron que en el hipocampo de ratas hiperamonémicas, el aumento de IL-1 β produce una mayor activación del receptor de IL-1, lo que aumenta la fosforilación y actividad de Src que activa a la PKC δ . La normalización de la fosforilación de β 3 por el bloqueo del receptor de IL-1 y la inhibición de Src debe ocurrir como resultado de la normalización de la actividad de la PKC δ , ya que la PKC es una de las quinasas que fosforila a la subunidad β 3 en los residuos de serina 408 y 409. Otra alternativa es que el tratamiento con IL-1Ra normalice la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A al normalizar la fosforilación de la subunidad β 3 a través de

la vía de transducción de señales activada por TrkB (PI3K/PKC), al revertir el bloqueo del receptor de IL-1 el aumento en el contenido de BDNF producido por la hiperamonemia.

Como se ha comentado anteriormente, otro de los mecanismos que modula la expresión en membrana de receptores GABA_A es la fosforilación de la subunidad GABA γ 2 en residuos de tirosina 365 y 367. Estos residuos son los principales sitios de fosforilación por Src que, a su vez, son sitios de unión a AP2, que media la internalización de receptores GABA_A (Nakamura et al., 2015). El tratamiento con IL-1Ra podría estar normalizando la expresión en membrana de receptores GABA_A al normalizar la fosforilación y la actividad de Src que, a su vez, normalizaría la fosforilación la subunidad GABA γ 2 en Y365/Y367. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, no conocemos el efecto de la hiperamonemia sobre esta fosforilación.

Además, el bloqueo del receptor de la IL-1 revierte el aumento del contenido total de gephyrin producido por la hiperamonemia. El cuarto dominio transmembrana (TM4) de la subunidad GABA γ 2 es esencial para la expresión en membrana de los receptores GABA_A y para la unión gephyrin en las sinapsis inhibitorias (Alldred et al., 2005). El aumento en la expresión en membrana de la subunidad γ 2 en hiperamonemia daría lugar a un aumento de la unión de gephyrin, lo que permitiría la unión a la misma de otras subunidades del receptor GABA_A, aumentando su expresión en membrana. El tratamiento con IL-1Ra, al normalizar la expresión en membrana de GABA γ 2, normalizaría la unión de gephyrin y la expresión en membrana de otras subunidades GABA_A que se combinan con γ 2 (α 1, α 2, γ 2, β 3 y δ) y. De hecho, se ha demostrado que en *knockouts* de genes que codifican para las subunidades γ 2 y α 3 del receptor GABA_A, no sólo disminuye la expresión en membrana de receptores GABA_A sino también el contenido de gephyrin (Essrich et al., 1998; Studer et al., 2006; Winsky-Sommerer et al., 2008). Además, el silenciamiento génico de gephyrin mediante un siRNA afecta al reclutamiento de receptores GABA_A en membrana y disminuye las corrientes postsinápticas inhibitorias (Essrich et al., 1998; Fritschy et al., 2008). Gonzalez et al., (2013) demostraron que la reducción del contenido de gephyrin va ligada a una disminución de la expresión en membrana de las subunidades α 4, β 2/3 y γ 2 a.

Otras subunidades del receptor GABA_A también contienen motivos de unión a gephyrin, como por ejemplo las subunidades α , y también se han correlacionado los niveles de expresión en membrana de estas subunidades con la expresión de gephyrin. Tretter et al. (2008) demostraron que gephyrin se une a un dominio intracelular hidrofóbico de 10 aminoácidos de la subunidad α 2, lo que es responsable de la acumulación sináptica de receptores GABA_A. Estudios posteriores también identificaron motivos de unión a gephyrin en las subunidades α 3 y α 1 del receptor GABA_A (Mukherjee et al., 2011; Tretter et al., 2011). Esto explicaría el aumento paralelo producido por la hiperamonemia en la expresión en membrana de las distintas subunidades del

receptor GABA_A (excepto $\alpha 5$) y en la expresión de gephyrin. El aumento de la unión de gephyrin a las subunidades $\beta 3$ y $\gamma 2$ en membrana, conduciría al aumento de la unión del resto de subunidades a gephyrin.

Por otro lado, el tratamiento con IL-1Ra no revierte la disminución de la expresión en membrana de la subunidad $\alpha 5$. Aunque desconocemos los mecanismos de regulación de la expresión en membrana de esta subunidad, los resultados indican que son diferentes a los del resto de subunidades del receptor GABA_A.

El bloqueo del receptor de IL-1 también revierte la disminución de la expresión en membrana de KCC2 producida por la hiperamonemia. Al igual que sucedía con las subunidades del receptor GABA_A, el bloqueo del receptor de IL-1 puede estar normalizando la expresión en membrana de KCC2 porque normaliza los niveles de BDNF o bien directamente por vías de transducción de señal asociadas al propio receptor. La expresión en membrana de KCC2, al igual que la del receptor GABA_A, está regulada por fosforilación. Concretamente, la fosforilación en los residuos Y903, Y1087, catalizada por quinasas tipo Src, promueven la internalización de este transportador (Côme et al., 2019). En hiperamonemia hay un aumento de la fosforilación de Src en el residuo Y418, lo que aumenta su actividad. Esto aumentaría la fosforilación de KCC2 y promovería la internalización de este cotransportador de Cl⁻, reduciendo su expresión en membrana en hiperamonemia. Parece razonable pensar que el tratamiento con IL-1Ra podría estar normalizando la expresión en membrana de KCC2 al disminuir la actividad de Src y la fosforilación en los residuos Y903/Y1087. Sin embargo, la inhibición de Src con el tratamiento con PP2 no normaliza la expresión en membrana de KCC2, por lo que esta hipótesis quedaría descartada. Existe otro sitio de fosforilación de KCC2, S940, que aumenta la estabilidad en membrana de este cotransportador. Sin embargo, hemos visto que esta fosforilación no está alterada en ratas hiperamonémicas y el tratamiento con IL-1Ra tampoco la modifica, por lo que tampoco explicaría la disminución de la expresión en membrana de KCC2. Aunque existen otros residuos de fosforilación de KCC2: S31, T34, S913, S932, S988, T999, T1009 (Cordshagen et al., 2018) y S25, S26, T34, S937, T1009, S1022, S1025 y S1026 (Weber et al., 2014), no regulan la expresión en membrana de KCC2, sino la función de cotransporte de KCC2. Por ello, otra posibilidad es que la normalización de la expresión de KCC2 mediante el bloqueo del receptor de IL-1 ocurriese al normalizar de los niveles de BDNF que normalizaría la expresión en membrana de KCC2, como se ha discutido en el apartado anterior.

Por otra parte, el tratamiento con IL-1Ra no revierte el aumento de la expresión en membrana de NKCC1 producido por la hiperamonemia, lo que indica que los mecanismos de regulación de la expresión en membrana de KCC2 y NKCC1 son diferentes.

El tratamiento con IL-1Ra también normaliza tanto el contenido total como la expresión en membrana de los transportadores GABA (GAT-1 y GAT-3). La regulación del funcionamiento de los transportadores de GABA depende de una amplia variedad de cascadas de señalización que implican distintas quinasas y fosfatasa, así como proteínas sinápticas como la syntaxina, un componente SNARE (Law et al., 2000). La syntaxina modula positivamente la expresión en membrana de GAT-1 y la fosforilación de Munc-18 por la PKC inhibe la unión de la syntaxina a GAT-1 (Beckman et al., 1998). Además, GAT-1 puede ser también fosforilado directamente por la PKC. La expresión en membrana de GAT-1 en neuronas en cultivo (Wang et al., 2005; Beckman et al., 1999) y en terminales nerviosos disminuye de manera dependiente de la fosforilación por la PKC (Whitworth et al., 2001; Law et al., 2000). Esto mismo podría estar sucediendo en hiperamonemia y que el bloqueo del receptor de IL-1 normalice la expresión en membrana de GAT-1 directamente a través de vías de señalización del receptor de IL-1 que activan la PKC. Taoro-Gonzalez et al., (2018) demostraron que en el hipocampo de ratas hiperamonémicas, el aumento de IL-1 β produce una mayor activación del receptor de IL-1, lo que aumenta la fosforilación y actividad de Src que activa a la PKC δ y que el tratamiento con IL-1Ra ex vivo normaliza todas estas alteraciones. La PKC δ puede fosforilar a GAT-1 en los residuos de serina (Law et al., 2000; Vaz et al., 2011), lo que, como se ha comentado en el apartado anterior, disminuye su expresión en membrana. Así, la IL-1 β podría reducir la expresión en membrana de GAT-1 por dos mecanismos diferentes, ambos dependientes de la PKC: al fosforilar Munc-18 e inhibir la unión de la syntaxina a GAT-1 y mediante la fosforilación directa de GAT-1 en residuos de serina. El bloqueo del receptor de IL-1 β al normalizar la actividad de la PKC normalizaría también la expresión en membrana de GAT-1. Sin embargo, esta vía no parece ser la responsable de la normalización de la expresión en membrana de GAT-1 mediada por IL-1Ra, ya que la inhibición de Src no normaliza la expresión en membrana de GAT-1. Esto nos lleva a pensar que el tratamiento con IL-1Ra podría normalizar la expresión en membrana de GAT-1 indirectamente a través de la normalización de los niveles de BDNF y, en consecuencia, la activación de TrkB y de la vía PLC γ /DAG/PKC.

El bloqueo del receptor de IL-1 por IL-1Ra también normaliza la expresión en membrana de GAT-3, pero desconocemos los mecanismos por los que se produce. Como se ha comentado anteriormente no hemos encontrado bibliografía a cerca de los mecanismos de modulación de la expresión en membrana de GAT-3.

En la tabla 13 se resumen los efectos del bloqueo del receptor de IL-1 sobre la expresión en membrana de receptores GABA $_A$, transportadores de GABA y cotransportadores de Cl $^-$.

La figura 91 ilustra los mecanismos por los que la IL-1 β estaría modulando la expresión en membrana de las diferentes subunidades del receptor GABA_A, la expresión en membrana de KCC2.

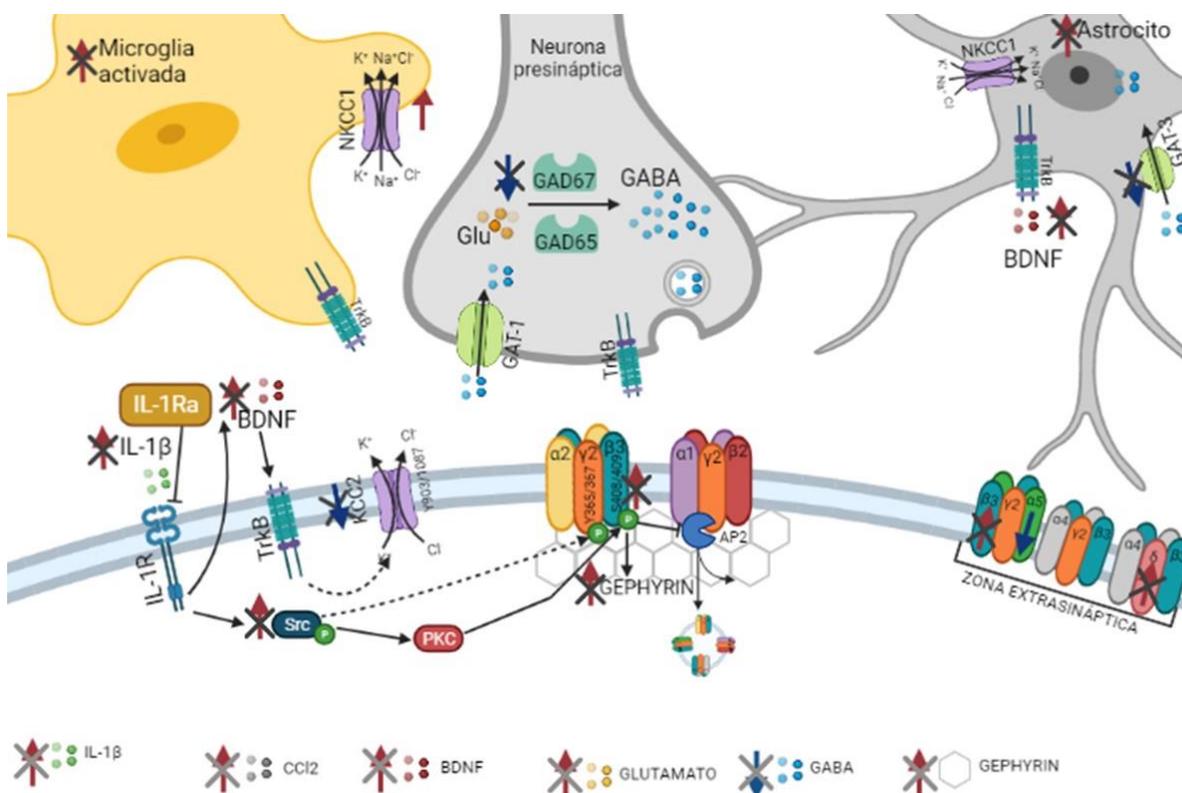


Figura 91. Mecanismos por los que la hiperamonemia altera la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A, de transportadores GABA y de cotransportadores de Cl⁻. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre las alteraciones observadas en ratas hiperamonémicas. Se representa, en rojo (aumentos) y azul (disminuciones), las alteraciones causadas por la hiperamonemia en la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A, transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻, las alteraciones en el contenido total de gephyrin, GAD67, IL-1 β , BDNF y CCI2. Las cruces representan la reversión de las alteraciones observadas en ratas hiperamonémicas por el tratamiento con IL-1Ra. Las flechas con líneas discontinuas indican posibles vías mediadas por el receptor de IL-1, pero que no han sido analizadas en hiperamonemia.

2.2.3. Papel del receptor S1PR2 en las alteraciones en la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A, de transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻ en hipocampo de ratas hiperamonémicas

Como sucedía con el tratamiento con IL-1Ra, el bloqueo del receptor S1PR2 normaliza la expresión en membrana de las subunidades α 1, α 2, γ 2, β 3 y δ del receptor GABA_A. Puesto que el tratamiento con JTE013 normaliza el contenido total de IL-1 β y BDNF una posibilidad es que esté induciendo la normalización de la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A a través de las vías de transducción de señales del receptor de la IL-1 y TrkB comentadas

en los apartados anteriores de la discusión. Sin embargo, el S1PR2 también activa vías de transducción de señales que pueden modular directamente la expresión en membrana de receptores GABA_A, transportadores GABA y cotransportadores de Cl⁻.

El JTE013 también normaliza la fosforilación de la subunidad $\beta 3$ en los residuos S408/409, como en los casos anteriores, la disminución de esta fosforilación, mediada por el bloqueo del receptor S1PR2, aumentaría la unión de AP2 y, por tanto, la internalización de receptores GABA_A. Como resultado se produciría una disminución de la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$ y δ , en paralelo a la de la subunidad $\beta 3$. Una de las vías de transducción de señal activadas por el receptor S1PR2 es la de la PI3K-Akt (Zhang et al., 2013; Liu et al., 2016). La subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A puede ser fosforilada por la quinasa Akt. En hiperamonemia aumenta la fosforilación de Akt en el residuo de serina 133 y, por tanto, la actividad de Akt y la fosforilación de la subunidad $\beta 3$. Ambas fosforilaciones se normalizan con el tratamiento con JTE013. Por tanto, es lógico pensar que en hiperamonemia el aumento de la activación del receptor S1PR2 aumentaría la activación de Akt, lo que aumentaría la fosforilación de la subunidad $\beta 3$, disminuyendo la internalización de receptores y, por tanto, aumentaría la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$ y δ del receptor GABA_A. Otra posibilidad sería que la inhibición del receptor S1PR2 esté normalizando la expresión en membrana de las diferentes subunidades del receptor GABA_A a través de otra vía de transducción de señal que involucra a Src, bien directamente a través de S1PR2 (Lorenz-Guertin and Jacob, 2018) o a través del receptor de IL-1, ya que el tratamiento con JTE013 revierte tanto el aumento de la fosforilación de Src en Y418 (que aumenta su actividad) como el aumento de los niveles de IL-1 β y el aumento de la fosforilación de la subunidad $\beta 3$ en S408/409 observado en ratas hiperamonémicas. Así, el bloqueo del receptor S1PR2 normalizaría la fosforilación de $\beta 3$ bien por la modulación directa de Akt y/o Src como consecuencia de que normaliza los niveles de IL-1 β y de BDNF y, por tanto, las vías por las que IL-1 β y BDNF la modulan (Figura 92). Además, como ocurría con el bloqueo del receptor de la IL-1, el bloqueo de S1PR2 también normaliza el contenido total de gephyrin. Gephyrin, es un organizador clave de las sinapsis GABAérgicas, al permitir la estabilización de los receptores GABA_A en la membrana, y, por ello, se considera un marcador postsináptico de las sinapsis GABAérgicas (Sassoe`-Pognetto et al., 1995; Essrich et al., 1998; Sassoe-Pognetto and Fritschy, 2000). La normalización del contenido de gephyrin por el tratamiento con JTE013, iría ligado a la normalización de la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A, como ocurre con el bloqueo del receptor de IL-1 y de TrkB.

En cuanto a los transportadores de GABA (GAT-1 y GAT-3), el tratamiento con JTE013 también normaliza tanto el aumento del contenido total como la disminución de la expresión en membrana de ambos. El receptor S1PR2 está acoplado a diferentes proteínas G, entre ellas la G α Q que activa la fosfolipasa C, la PKC y NF κ B (Ng et al., 2018). Puesto que una de las vías de transducción de

señales del receptor S1PR2 incluye la activación de la PKC, el bloqueo de este receptor podría revertir la disminución de la expresión en membrana de GAT-1, como sucedía con el bloqueo del receptor de la IL-1, al disminuir la fosforilación de la syntaxina por la PKC, permitiendo la unión de la syntaxina a GAT-1 y la traslocación de este a la membrana. La activación de la PKC también podría estar aumentando directamente la fosforilación de GAT-1 en los residuos de serina lo que aumentaría su internalización, disminuyendo la expresión en membrana. Otra posibilidad, no incompatible con la anterior, es que el JTE013 esté normalizando la expresión en membrana de GAT-1 a través de la normalización de la vía PLC γ /DAG/PKC activada por el receptor TrkB que modula GAT-1, ya que el JTE013 normaliza tanto los niveles de IL-1 β como de BDNF.

Además, el bloqueo de S1PR2 también normaliza la expresión en membrana de KCC2 en ratas hiperamonémicas, la cual puede estar mediada bien directamente por el receptor S1PR2 o a través de la normalización de los niveles de IL-1 β y de BDNF y de la activación del receptor de IL-1 y de TrkB. Como ocurría con el bloqueo del receptor de la IL-1, ya que en hiperamonemia no se ve alterada la fosforilación de KCC2 en el residuo S940 y la inhibición de Src no revierte la disminución de la expresión en membrana de KCC2, la explicación más plausible es que el JTE013 esté normalizando la expresión en membrana de KCC2 a través de la normalización de la fosforilación del residuo Y903/Y1087 que promueve la internalización de KCC2 a través de la vía de transducción de señal Shc/FRS-2 o PLC γ asociada a TrkB, al normalizar los niveles de IL-1 β y BDNF.

Por otro lado, el bloqueo de S1PR2 también normaliza la expresión en membrana de NKCC1. No obstante, desconocemos los mecanismos por los que el tratamiento con JTE013 normaliza la expresión en membrana de NKCC1, pero esta vía debe de ser independiente de la normalización de los niveles de IL-1 β , ya que el tratamiento con IL-1Ra no normaliza la expresión en membrana de NKCC1.

En la tabla 13 se resumen los efectos del bloqueo del receptor S1PR2 sobre la expresión en membrana de receptores GABA_A, transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻.

La figura 92 resume los efectos del bloqueo del receptor S1PR2 sobre las alteraciones observadas en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

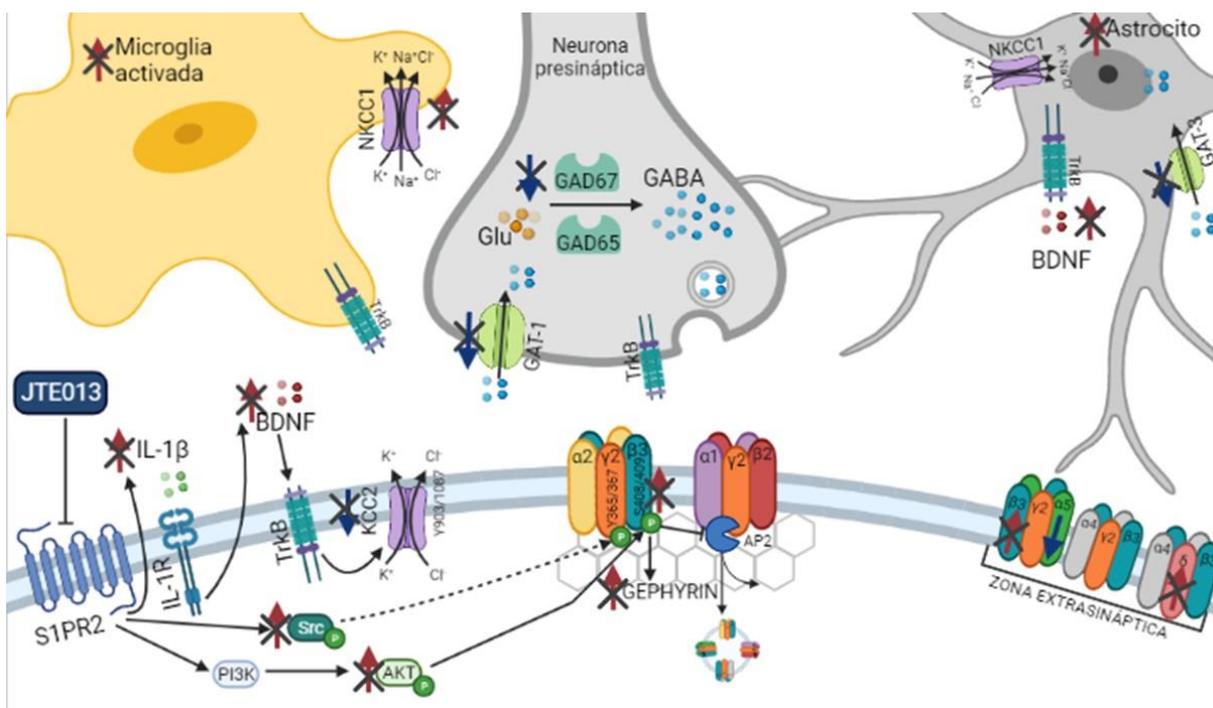


Figura 92. Mecanismos por los que la hiperamonemia altera la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A, de transportadores GABA y de cotransportadores de Cl⁻. Efecto del bloqueo del receptor de IL-1 sobre las alteraciones observadas en ratas hiperamonémicas. Se representa, en rojo (aumentos) y azul (disminuciones), las alteraciones causadas por la hiperamonemia en la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A, transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻, las alteraciones en el contenido total de gephyrin, GAD67, IL-1β, BDNF y CCL2. Las cruces representan la reversión de las alteraciones observadas en ratas hiperamonémicas por el tratamiento con JTE013.

2.2.4. Efecto de la inhibición de la PI3K mediante el tratamiento con wortmanina sobre la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A, de transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻.

Con el fin de analizar si los efectos sobre la expresión en membrana del receptor GABA_A, de transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻ están mediados por la PI3K, se llevaron a cabo experimentos *ex vivo* en los que inhibimos la PI3K mediante el tratamiento con wortmanina. Los resultados demuestran que la wortmanina revierte los aumentos producidos por la hiperamonemia en la expresión en membrana de las subunidades α1, α2, γ2, β3 y δ del receptor GABA_A y en la fosforilación de la subunidad β3, lo que apoyaría la idea de que la inhibición de TrkB normalizaría la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A a través de la vía PI3K/PKC, que llevaría a la fosforilación de β3 y al aumento de la expresión en membrana de las subunidades α1, α2, γ2, β3 y δ del receptor GABA_A. También encaja con la idea de que el bloqueo del receptor S1PR2 normalizaría la expresión en membrana de las subunidades GABA_A al normalizar la fosforilación de β3 por la vía PI3K/Akt activada por S1PR2. La wortmanina

normaliza la fosforilación de Akt. Como sucedía con el resto de tratamientos, la normalización de la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ y δ del receptor GABA_A va ligada a la disminución del contenido de gephyrin.

Cabe señalar que la inhibición de la PI3K normaliza la fosforilación de Src, por lo que la disminución de la expresión en membrana de subunidades GABA_A por el tratamiento con wortmanina también se debería a la disminución de la fosforilación de $\gamma 2$ en los residuos de tirosina 365 y 367, que aumentan la expresión en membrana al evitar la unión de AP2 y la internalización de receptores GABA_A.

Puesto que la wortmanina revierte la disminución de la expresión en membrana de la subunidad $\alpha 5$ del receptor GABA_A, pero el resto de tratamientos no lo hacen, podemos afirmar que la modulación de la expresión en membrana de esta subunidad ocurriría por una vía diferente, pero que esta está mediada por la PI3K, pero no por S1PR2, ni por los receptores de IL-1 y TrkB.

En cuanto a los cotransportadores de Cl⁻, la wortmanina normaliza la expresión en membrana tanto de KCC2 como de NKCC1, por lo que los mecanismos de modulación de la expresión en membrana de ambos transportadores deben estar mediados por vías de señalización que involucren a la PI3K. En el caso de NKCC1 la vía sería independiente de IL-1 β y del receptor de IL-1, ya que el bloqueo de este receptor no revierte el aumento de la expresión en membrana de este cotransportador producido en ratas hiperamonémicas. Garzon-Muvdi et al., (2012) demostraron que NKCC1 en glioblastoma es fosforilado por la vía PI3K-Akt-WNK3. No sabemos si esta vía está alterada en hiperamonemia.

La inhibición de la PI3K no revierte la disminución de la expresión en membrana de los transportadores GABA GAT-1 y GAT-3 por lo que podemos afirmar que en la modulación de la expresión en membrana de estos transportadores no estaría interviniendo la PI3K. Este resultado indica que la normalización de la expresión en membrana de este transportador GABA por ANA-12 no está mediada por la vía TrkB/PI3K/PKC.

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que la reversión de las alteraciones observadas en el hipocampo de ratas hiperamonémicas por el bloqueo del receptor de IL-1, de S1PR2 y de TrkB en la expresión en membrana de subunidades GABA_A, KCC2 y NKCC1 pueden estar mediadas por la PI3K. En cambio la normalización de la expresión en membrana de GAT-1 y GAT-3 sería independiente de la PI3K.

En la tabla 13 se resumen los efectos de la inhibición de la PI3K sobre la expresión en membrana de receptores GABA_A, transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻.

2.2.5. Efecto de la inhibición de Src mediante el tratamiento con PP2 sobre la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A, de transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻.

Con el fin de estudiar cómo Src puede modular la expresión en membrana de las diferentes subunidades del receptor GABA_A, llevamos a cabo experimentos también *ex vivo* en los que inhibimos Src con PP2. Los resultados demuestran que, como sucede con el bloqueo del receptor de IL-1 y S1PR2, el tratamiento con PP2 revierte las alteraciones producidas por la hiperamonemia en la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ y δ del receptor GABA_A, pero, como sucedía con el tratamiento con IL-1Ra, no es capaz de revertir la disminución de la expresión en membrana de $\alpha 5$. Puesto que la inhibición de Src revierte el aumento en la fosforilación de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A, demostramos que la fosforilación de $\beta 3$ en los residuos de serina 408-409 también involucra a Src. Esto apoya la idea de que el bloqueo del receptor de la IL-1 estaría normalizando la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ y δ del receptor GABA_A a través de Src, que activa a la PKC que fosforilaría la subunidad $\beta 3$. También cabe la posibilidad de que la normalización de la expresión en membrana de subunidades GABA_A mediada por PP2 se produzca también a través de la fosforilación de $\gamma 2$. Sin embargo, desconocemos el nivel de fosforilación en hiperamonemia de esta subunidad. Además, la inhibición de Src normaliza el contenido total de gephyrin, implicada en la modulación de la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A.

La inhibición de Src no revierte la disminución en la expresión en membrana de KCC2 producida por la hiperamonemia, por lo que descartamos la idea de que la fosforilación en los residuos Y903, Y1087, la cual está catalizada por kinasas tipo Src, y que promueve la internalización de este transportador, esté aumentada en hiperamonemia. El bloqueo del receptor de IL-1 y S1PR2 revierten el aumento en la fosforilación de Src y la disminución en la expresión en membrana de KCC2, pero el bloqueo de Src no logra revertir la disminución de la expresión en membrana de KCC2, por lo que la reversión por IL-1Ra y JTE013 no está mediada por Src. La inhibición de Src también revierte el aumento de la expresión en membrana de NKCC1, por lo que en la modulación de la expresión de NKCC1 sí intervendría Src. Sin embargo, a través de una vía diferente a la activada por el receptor de la IL-1, ya que el tratamiento con IL-1Ra no revierte el aumento de la expresión en membrana de NKCC1 producido por la hiperamonemia.

El tratamiento con PP2 revierte la disminución de la expresión en membrana de GAT-3, pero no normaliza la expresión en membrana de GAT-1, por lo que la modulación de la expresión en membrana de GAT-3 sí es dependiente de Src, pero no la de GAT-1. El bloqueo del receptor de IL-1 revierte tanto el aumento en la fosforilación de Src como la disminución de la expresión en membrana de GAT-3, podría ser que la normalización de la expresión en membrana de GAT-3

inducida por IL-1Ra dependa de Src, al igual que la del bloqueo de S1PR2. En el caso de GAT-1, que la inhibición de Src no normalice su expresión en membrana apoya la idea de que la reversión de la disminución de la expresión en membrana de GAT-1 por el bloqueo del receptor TrkB esté mediada por vía de la proteína GαQ que activa la fosfolipasa G y esta a la PKC, ya que esta vía es independiente de Src. El bloqueo del receptor disminuiría la actividad de la PKC y la fosforilación de la sintaxina y/o la fosforilación de GAT-1 en los residuos de serina, lo que aumentaría la expresión en membrana de GAT-1. Estos datos indican que el receptor de IL-1 no normaliza la expresión en membrana de GAT-1 a través de la vía Src/PKCδ.

Los resultados obtenidos demuestran que la reversión de las alteraciones observadas en el hipocampo de ratas hiperamonémicas por el bloqueo del receptor de IL-1 y el JTE013 en la expresión en membrana de subunidades GABA_A, NKCC1 y GAT-3 podrían estar mediadas por Src. Mientras que la normalización de la expresión en membrana de KCC2 y GAT-1 sería independiente de Src.

En la tabla 13 se resumen los efectos de la inhibición de Src sobre la expresión en membrana de receptores GABA_A, transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻.

En resumen (Figura 93), en hiperamonemia la activación del receptor S1PR2 aumenta la producción de IL-1β, que se une al receptor de IL-1. El receptor de IL-1 activa a Src que, a través del factor de transcripción CREB, aumenta la producción de BDNF. El BDNF se une al receptor TrkB en neuronas que activa la vía PI3K-PKC, la PKC fosforila a la subunidad β3 del receptor GABA_A en los residuos de serina 408 y 409, lo que evita la unión de AP2 a los receptores GABA_A y su internalización, aumentando la expresión en membrana tanto de la subunidad β3 como de las subunidades α1, α2, γ2 y δ del receptor GABA_A. Como consecuencia del aumento de la expresión en membrana de la subunidad β3 del receptor GABA_A aumenta también la expresión de gephyrin, indispensable para la estabilización en membrana de receptores GABA_A. El aumento en los niveles de BDNF en hipocampo de ratas hiperamonémicas también disminuye la expresión en membrana de GAT-1, principalmente en neuronas, y GAT-3, principalmente en astrocitos. En el caso de GAT-1 la activación de la PKC podría fosforilar a Munc-18, reduciendo la unión de la sintaxina a GAT-1 y, con ello, su expresión en membrana. La PKC también puede fosforilar directamente a GAT-1. En ambos casos disminuye la expresión en membrana de este transportador. Además, el aumento de los niveles de BDNF y la activación de TrkB disminuyen la expresión en membrana de KCC2, posiblemente aumentando la fosforilación de KCC2 en los residuos de tirosina 903 1087, lo que aumenta su internalización y disminuye su expresión en membrana (Figura 93). La hiperamonemia también disminuye la expresión en membrana de la subunidad α5 del receptor GABA_A y aumenta la expresión en membrana de NKCC1, pero por mecanismos diferentes al que proponemos.

Además, en hiperamonemia el aumento en los niveles de BDNF también aumenta la concentración extracelular de GABA, como resultado de la disminución en la expresión en membrana de GAT-1 y GAT-3. El aumento del GABA extracelular, junto con el aumento en la expresión en membrana de receptores GABA_A, aumenta la neurotransmisión GABAérgica en hipocampo de ratas hiperamonémicas, la cual se ve reflejada en una mayor respuesta de los receptores GABA_A (capítulo 2). Esta hiperactivación GABAérgica contribuiría al deterioro cognitivo y motor, que se restaura al disminuir la respuesta GABAérgica, como por ejemplo con bicuculina (Malaguarnera et al., 2019) o GR3207 (Johansson et al., 2015).

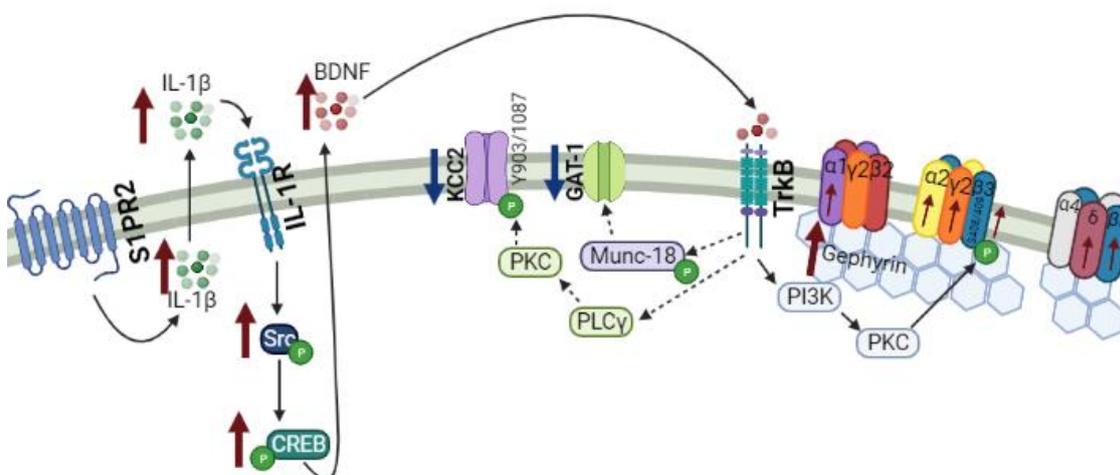


Figura 93. Mecanismos por los que la hiperamonemia altera la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A, de transportadores GABA y de cotransportadores de Cl⁻. Se representa, en rojo (aumentos) y azul (disminuciones), las alteraciones causadas por la hiperamonemia en la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A, transportadores de GABA y cotransportadores de Cl⁻, en la expresión de gephyrin, en las fosforilaciones de Src y CREB y en los niveles de IL-1β y BDNF. Se muestran con flechas discontinuas los mecanismos que podrían estar modulando la expresión en membrana de KCC2 y GAT-1, pero no han sido comprobados en esta tesis.

El bloqueo del receptor S1PR2, al normalizar los niveles de IL-1β, de BDNF y la activación de TrkB revierte todas las alteraciones en la expresión en membrana de las subunidades del receptor GABA_A, excepto la disminución de la expresión en membrana de la subunidad α5, y normaliza tanto la expresión en membrana de GAT-1 y GAT-3 como de KCC2 y NKCC1 (Figura 90). El bloqueo del receptor de IL-1 normaliza los niveles de BDNF en hipocampo de ratas hiperamonémicas, lo que disminuye la activación del receptor TrkB y revierte los aumentos en la expresión en membrana de las subunidades α1, α2, γ2, β3 y δ del receptor GABA_A, la disminución de la expresión en membrana de GAT-1, GAT-3 y KCC2, pero no el aumento de la expresión en membrana de NKCC1 (Figura 91). El bloqueo de TrkB con ANA-12 normaliza la expresión en membrana de las subunidades α1, α2, γ2, β3 y δ del receptor GABA_A, de GAT-1 y GAT-3 y de KCC2 y NKCC1 (Figura 92). Ni el bloqueo de S1PR2, ni el del receptor de IL-1 ni el de TrkB revierten la disminución de la expresión en membrana de la subunidad α5 del receptor GABA_A.

Cabe mencionar que, como se ha comentado anteriormente en la discusión, los receptores S1PR2 y de IL-1 también pueden activar otras vías de transducción de señales y modular la expresión en membrana de subunidades del receptor GABA_A y transportadores de GABA y de cloruro. Sin embargo, el hecho de que el bloqueo de TrkB con ANA-12 revierta las alteraciones en la expresión en membrana de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ y δ del receptor GABA_A, de GAT-1 y GAT-3 y de KCC2 y NKCC1, indica que el principal mecanismo por el que la hiperamonemia los altera es a través de la activación del receptor TrkB por los niveles aumentados de BDNF.





CONCLUSIONS



Hyperammonemia reduces the function of AMPA receptors in hippocampus, reducing the amplitude of the EPSPs mediated by AMPA receptors. Extracellular cGMP normalizes the amplitude of these EPSPs induced by activation of AMPA receptors.

1. Hyperammonemia increases the function of NMDA receptors in hippocampus increasing the amplitude of the NMDA receptor mediated EPSPs. Increasing extracellular GMPc normalizes the amplitude of these EPSPs induced by activation of AMPA receptors.
2. Hyperammonemia increases the function of GABA_A receptors in hippocampus, increasing the amplitude, area and width of the IPSPs. The main factors that would contribute to the increased GABAergic response are increased extracellular concentration of GABA and increased membrane expression of GABA_A receptors. Increasing extracellular cGMP normalizes the membrane expression of $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ and δ GABA_A receptor subunits, which would be responsible for the normalization of amplitude, area and width of the GABA_A receptor-induced IPSPs.
3. Hyperammonemia decreases the membrane expression of GABA transporters, GAT-1 and GAT-3, in hippocampus, which would be responsible for the increasing in extracellular concentration of GABA.
4. The decrease in membrane expression of KCC2 and the increase in membrane expression of NKCC1, which modulate the chloride gradient, may contribute to the alterations of GABA_A receptor function in hippocampus of hyperammonemic rats.
5. In hyperammonemia increased S1PR2 receptor activation increases IL-1 β levels, which activates the IL-1 receptor, which increases the production and release by neurons of CCL2 that binds to CCR2 in microglia, promoting activation of microglia and membrane insertion of P2X4, and activation of p38 MAP kinase, which stimulates BDNF production by microglia. The increase in BDNF levels contributes to the maintenance of microglial activation in hippocampus of hyperammonemic rats.
6. IL-1 β also promotes the production of BDNF by neurons, which would bind to the TrkB receptor and activate astrocytes.
7. The increase of BDNF levels in hippocampus of hyperammonemic rats increases the activation of TrkB receptor that activates PI3K/PKC pathway. PKC would phosphorylate the $\beta 3$ subunit of GABA_A receptors at serines 408 and 409, which increases membrane expression of $\beta 3$, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$ and δ subunits of the GABA_A receptor. Blocking S1PR2, IL-1 receptor or TrkB reduces BDNF levels and TrkB activation resulting in normalization of $\beta 3$ subunit phosphorylation and of membrane expression of $\beta 3$, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ and δ subunits of GABA_A receptor.

8. Hyperammonemia reduces the membrane expression of $\alpha 5$ subunit of GABA_A receptors. The alteration of membrane expression of this subunit occurs by a different mechanism than for $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 2$, $\beta 3$ and δ subunits, since it is not reversed by blocking the IL-1 receptor, TrkB or S1PR2.
9. In hyperammonemia increased BDNF levels increase TrkB activation which activates the PI3K-PKC pathway which reduces the membrane expression of GAT-1. Blocking the IL-1 receptor or TrkB normalizes membrane expression of GAT-1 by normalising BDNF levels, activation of TrkB and the PI3K-PKC pathway.
10. Hyperammonemia also reduces the membrane expression of GAT-3 and this is mediated by increased BDNF levels. Blocking TrkB, IL-1 receptor or S1PR2 normalizes it.
11. In hyperammonemia, the increase of BDNF levels reduces KCC2 membrane expression, likely by increasing its phosphorylation at tyrosines 903 and 1087, which increases its internalisation and decreases KCC2 membrane expression. Blocking S1PR2 or IL-1 receptor normalizes BDNF levels, reduces TrkB activation and reverses the decrease of KCC2 membrane expression. In contrast, hyperammonemia increases the membrane expression of NKCC1 and only blocking TrkB or S1PR2 reverses this alteration.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Adlimoghaddam, A., Albensi, B.C. (2020). The nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway is involved in ammonia-induced mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion.*, 57:63-75. doi: 10.1016/j.mito.2020.12.008.
- Aguilar, M.A., Miñarro, J., Felipo, V. (2000). Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats. *Exp. Neurol.*, 161:704–713. doi: 10.1006/exnr.1999.7299.
- Ahluwalia, V., Wade, J.B., Heuman, D.M., Hammeke, T.A., Sanyal, A.J., Sterling, R.K., Stravitz, R.T., Luketic, V., Siddiqui, M.S., Puri, P., Fuchs, M., Lennon, M.J., Kraft, K.A., Gilles, H., White, M.B., Noble, N.A., Bajaj, J.S. (2014). Enhancement of functional connectivity, working memory and inhibitory control on multi-modal brain MR imaging with Rifaximin in Cirrhosis: implications for the gut -liver-brain axis. *Metab. Brain Dis.*, 29(4):1017–1025.
- Allred, M.J., Mulder-Rosi, J., Lingenfelter, S.E., Chen, G., Lüscher, B. (2005). Distinct gamma2 subunit domains mediate clustering and synaptic function of postsynaptic GABAA receptors and gephyrin. *J. Neurosci.*, 25(3): 594-603. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4011-04.2005.
- Amlal, H., Soleimani, M. (1997). K⁺/NH₄⁺ antiporter: a unique ammonium carrying transporter in the kidney inner medulla. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1323(2):319–333. doi: 10.1016/s0005-2736(96)00200-3.
- Amtul, Z., Atta-Ur-Rahman. (2015). Neural plasticity and memory: molecular mechanism. *Rev. Neurosci.*, 26(3):253-68. doi: 10.1515/revneuro-2014-0075.
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., T.V. and O'Keefe, J. (2007). *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.
- Anderson, G.R., Aoto, J., Tabuchi, K., Földy, C., Covy, J., Yee, A.X., Wu, D., Lee, S.J., Chen, L., Malenka, R.C. and Südhof, T.C. (2015). β -Neurexins Control Neural Circuits by Regulating Synaptic Endocannabinoid Signaling. *Cell*, 162(3):593–606. doi: 10.1016/j.cell.2015.06.056.
- Anelli, V., Bassi, R., Tettamanti, G., Viani, P., Riboni, L. (2005). Extracellular release of newly synthesized sphingosine-1-phosphate by cerebellar granule cells and astrocytes. *J. Neurochem.*, 92:1204–1215. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02955.x.
- Anggono, V., Huganir, R.L. (2012). Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 22: 461–469. doi:10.1016/j.conb.2011.12.006
- Aronson, D.C., Chamuleau, R.A., Frederiks, W.M., Gooszen, H.G., Heijmans, H.S., James, J. (1993). Reversibility of cholestatic changes following experimental common bile duct obstruction: fact or fantasy? *J. Hepatol.*, 18(1):85–95. doi: 10.1016/s0168-8278(05)80014-5.
- Assi, E., Cazzato, D., De Palma, C., Perrotta, C., Clementi, E., Cervia, D. (2013). Sphingolipids and brain resident macrophages in neuroinflammation: an emerging aspect of nervous system pathology. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013:309302. doi: 10.1155/2013/309302.

- Atluri, P.P. and Regehr, W.G. (1996). Determinants of the time course of facilitation at the granule cell to Purkinje cell synapse. *J. Neurosci.*, 16(18):5661–5671. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-18-05661.1996.
- Bajaj, J.S., Riggio, O. (2010). Drug therapy: rifaximin. *Hepatology*, 52(4):1484-8. doi: 10.1002/hep.23866.
- Bajaj, J.S., Saeian, K., Schubert, C.M., Hafeezullah, M., Franco, J., Varma, R.R., Gibson, D.P., Hoffmann, R.G., Stravitz, R.T., Heuman, D.M., Sterling, R.K., Shiffman, M., Topaz, A., Boyett, S., Bell, D., Sanyal, A.J. (2009). Minimal hepatic encephalopathy is associated with motor vehicle crashes: the reality beyond the driving test. *Hepatology.*, 50(4):1175-1183. doi: 10.1002/hep.23128.
- Balzano, T., Arenas, Y.M., Dadsetan, S., Forteza, J., Gil-Perotin, S., Cubas-Nuñez, L., Casanova, B., Gracià, F., Varela-Andrés, N., Montoliu, C., Llansola, M., Felipo, V. (2020). Sustained hyperammonemia induces TNF- α IN Purkinje neurons by activating the TNFR1-NF- κ B pathway. *J. Neuroinflammation.*, 17(1):70. doi: 10.1186/s12974-020-01746-z.
- Balzano, T., Forteza, J., Molina, P., Giner, J., Monzó, A., Sancho-Jiménez, J., Urios, A., Montoliu, C., Felipo, V. (2018). The Cerebellum of Patients with Steatohepatitis Shows Lymphocyte Infiltration, Microglial Activation and Loss of Purkinje and Granular Neurons. *Sci. Rep.*, 8(1):3004. doi: 10.1038/s41598-018-21399-6.
- Barcomb, K., Hell, J.W., Benke, T.A., Bayer, K.U. (2016). The CaMKII/GluN2B Protein Interaction Maintains Synaptic Strength. *J. Biol. Chem.*, 291(31): 16082–16089. doi: 10.1074/jbc.M116.734822.
- Barnard, E.A., Skolnick, P., Olsen, R.W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A.N. Langer, S.Z. (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.*, 50(2):291–313.
- Beckman, M.L., Bernstein, E.M., Quick, M.W. (1998). Protein kinase C regulates the interaction between a GABA transporter and syntaxin 1A. *J. Neurosci.*, 18(16):6103-12. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-16-06103.1998.
- Beckman, M.L., Bernstein, E.M., Quick, M.W. (1999). Multiple G protein-coupled receptors initiate protein kinase C redistribution of GABA transporters in hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 19(11):RC9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-11-j0006.1999.
- Béjot, Y., Prigent-Tessier, A., Cachia, C., Giroud, M., Mossiat, C., Bertrand, N., Garnier, P., Marie, C. (2011). Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats. *Neurochem. Int.*, 58(1):102-11. doi: 10.1016/j.neuint.2010.10.019.
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.*, 3: 728-739. doi: 10.1038/nrn920.

- Bengtsson, F., Nobin, A., Falck, B., Gage, F.H., Jeppsson, B. (1986). Portacaval shunt in the rat: selective alterations in behavior and brain serotonin. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 24(6):1611–1616. doi: 10.1016/0091-3057(86)90494-6.
- Blackman, A. V., Abrahamsson, T., Costa, R. P., Lalanne, T., Sjöström, P. J. (2013). Target-cell-specific short-term plasticity in local circuits. *Front. Synaptic Neurosci.*, 5:11. doi:10.3389/fnsyn.2013.00011
- Blaesse, P., Airaksinen, M.S., Rivera, C., Kaila, K. (2009). Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron*, 61(6):820-38. doi: 10.1016/j.neuron.2009.03.003.
- Blitzer, R.D., Wong, T., Nouranifar, R., Iyengar, R., Landau, E.M. (1995). Postsynaptic cAMP pathway gates early LTP in hippocampal CA1 region. *Neuron*, 15(6):1403-14. doi: 10.1016/0896-6273(95)90018-7.
- Bogdanov, Y., Michels, G., Armstrong-Gold, C., Haydon, P. G., Lindstrom, J., Pangalos, M., Moss, S. J. (2006). Synaptic GABAA receptors are directly recruited from their extrasynaptic counterparts. *The EMBO journal*, 25(18):4381–4389. doi:10.1038/sj.emboj.7601309
- Bollen, E., Puzzo, D., Rutten, K., Privitera, L., De Vry, J., Vanmierlo, T., Kenis, G., Palmeri, A., D'Hooge, R., Balschun, D., Steinbusch, H.M., Blokland, A., Prickaerts, J. (2014). Improved long-term memory via enhancing cGMP-PKG signaling requires cAMP-PKA signaling. *Neuropsychopharmacology*, 39(11):2497-505. doi: 10.1038/npp.2014.106.
- Bon, C.L., Garthwaite, J. (2003). On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.*, 23(5):1941-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-05-01941.2003.
- Bormann, J. (2000). The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 21(1):16-9. doi: 10.1016/s0165-6147(99)01413-3.
- Bose, S., Cho, J. (2013). Role of chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in neurodegenerative diseases. *Arch. Pharm. Res.* 36(9):1039-50. doi: 10.1007/s12272-013-0161-z.
- Boulton, C.L., Southam, E., Garthwaite, J. (1995). Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neuroscience*, 69(3):699-703. doi: 10.1016/0306-4522(95)00349-n.
- Bradford, H.F. (1995). Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog. Neurobiol.*, 47(6):477-511. doi: 10.1016/0301-0082(95)00030-5.
- Brickley, S.G., Mody, I. (2012). Extrasynaptic GABA(A) receptors: their function in the CNS and implications for disease. *Neuron*, 73(1):23-34. doi: 10.1016/j.neuron.2011.12.012.
- Brünig, I., Penschuck, S., Berninger, B., Benson, J, Fritschy, J.M.. (2001). BDNF reduces miniature inhibitory postsynaptic currents by rapid downregulation of GABA(A) receptor surface expression. *Eur. J. Neurosci.*, 13(7):1320-8. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01506.x.

- Bukanova, J.V., Solntseva, E.I., Kondratenko, R.V., Skrebitsky, V.G. (2014). Glycine receptor in hippocampal neurons as a target for action of extracellular cyclic nucleotides. *Neurosci. Lett.*, 561:58-63. doi: 10.1016/j.neulet.2013.12.037
- Burkhard, P.R., Delavelle, J., Du Pasquier, R., Spahr, L. (2003). Chronic parkinsonism associated with cirrhosis: a distinct subset of acquired hepatocerebral degeneration. *Arch. Neurol.*, 60(4):521-528. doi: 10.1001/archneur.60.4.521. PMID: 12707065.
- Bustamante, J., Rimola, A., Ventura, P.J., Navasa, M., Cirera, I., Reggiardo, V., Rodés, J. (1999). Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *J. Hepatol.*, 30(5): 890-5. doi: 10.1016/s0168-8278(99)80144-5
- Buzsáki, G. (1984). Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog. Neurobiol.*, 22(2):131-53. doi: 10.1016/0301-0082(84)90023-6.
- Cabrera-Pastor, A. (2014). Modulación de la vía Glu-NO-GMPc y del aprendizaje por GMPc extracelular en cerebelo. Mecanismos moleculares implicados. Alteraciones en modelos animales de hiperamonemia y encefalopatía hepática. (Tesis doctoral). Universidad de Valencia, Valencia.
- 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*, 161:107496. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.01.011.
- Cabrera-Pastor, A., Balzano, T., Hernández-Rabaza, V., Malaguarnera, M., Llansola, M., Felipo, V. (2018). Increasing extracellular cGMP in cerebellum in vivo reduces neuroinflammation, GABAergic tone and motor in-coordination in hyperammonemic rats. *Brain Behav. Immun.*, 69:386-398. doi: 10.1016/j.bbi.2017.12.013.
- Cabrera-Pastor, A., Hernandez-Rabaza, V., Taoro-Gonzalez, L., Balzano, T., Llansola, M., Felipo, V. (2016a). In vivo administration of extracellular cGMP normalizes TNF- α and membrane expression of AMPA receptors in hippocampus and spatial reference memory but not IL-1 β , NMDA receptors in membrane and working memory in hyperammonemic rats. *Brain Behav. Immun.*, 1: 360–370. doi: 10.1016/j.bbi.2016.05.011.
- Cabrera-Pastor, A., Llansola, M., Reznikov, V., Boix, J., Felipo, V. (2012). Differential effects of chronic hyperammonemia on modulation of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway by metabotropic glutamate receptor 5 and low and high affinity AMPA receptors in cerebellum in vivo. *Neurochem. Int.* 61(1): 63–71. doi: 10.1016/j.neuint.2012.04.006.
- Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Felipo, V. (2016b). Hyperammonemia alters glycinergic neurotransmission and modulation of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway by extracellular glycine in cerebellum in vivo. *J. Neurochem.*, 137(4):539-48. doi: 10.1111/jnc.13579.

- Cammack, J.N., Rakhilin, S.V., Schwartz, E.A. (1994). A GABA transporter operates asymmetrically and with variable stoichiometry. *Neuron*, 13(4):949-60. doi: 10.1016/0896-6273(94)90260-7.
- Carta, M., Srikumar, B.N., Gorlewicz, A., Rebola, N., Mulle, C. (2018). Activity-dependent control of NMDA receptor subunit composition at hippocampal mossy fibre synapses. *J. Physiol.*, 596(4): 703-716. doi: 10.1113/JP275226.
- Carter, B.M., Sullivan, B.J., Landers, J.R., Kadam, S.D. (2018). Dose-dependent reversal of KCC2 hypofunction and phenobarbital-resistant neonatal seizures by ANA12. *Sci. Rep.*, 8(1):11987. doi: 10.1038/s41598-018-30486-7.
- Catterall, W.A., Few, A.P. (2008). Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron*, 59(6):882-901. doi: 10.1016/j.neuron.2008.09.005.
- Cauli, O., Mansouri, M. T., Agusti, A., Felipo, V. (2009). Hyperammonemia Increases GABAergic Tone in the Cerebellum but Decreases It in the Rat Cortex. *Gastroenterology*, 136(4): 1359–1367. doi: 10.1053/j.gastro.2008.12.057
- Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Boix, J., Felipo, V. (2007). Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology*. 46:514–519.
- Chater, T.E., Goda, Y. (2014). The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Front. Cell Neurosci.*, 8: 401. doi: 10.3389/fncel.2014.00401
- Chen, H., Parkinson, J.A., Morris, R.E., Sadler, P.J. (2003). Highly selective binding of organometallic ruthenium ethylenediamine complexes to nucleic acids: novel recognition mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(1):173-86. doi: 10.1021/ja027719m.
- Christensen, A.L. (1984). Neuropsychological investigation with Luria's methods. *Scand. J. Work Environ. Health*, 10 Suppl 1:33–34.
- Chu, H.X., Arumugam, T.V., Gelderblom, M., Magnus, T., Drummond, G.R., Sobey, C.G. (2014). Role of CCR2 in inflammatory conditions of the central nervous system. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 34(9):1425-9. doi: 10.1038/jcbfm.2014.120.
- Chui, R., Dorovini-Zis, K. (2010). Regulation of CCL2 and CCL3 expression in human brain endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *J. Neuroinflammation*, 7:1. doi: 10.1186/1742-2094-7-1.
- Clausen, B.H., Lambertsen, K.L., Dagnæs-Hansen, F., Babcock, A.A., von Linstow, C.U., Meldgaard, M., Kristensen, B.W., Deierborg, T., Finsen, B. (2016). Cell therapy centered on IL-1Ra is neuroprotective in experimental stroke. *Acta Neuropathol.*, 131(5):775-91. doi: 10.1007/s00401-016-1541-5.
- Clayton, D.A., Mesches, M.H., Alvarez, E., Bickford, P.C., Browning, M.D. (2002). A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *J. Neurosci.*, 22(9): 3628-37. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-09-03628.2002.

- Clemmesen, J.O., Larsen, F.S., Kondrup, J., Hansen, B.A., Ott, P. (1999). Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology*, 29(3):648-53. doi: 10.1002/hep.510290309.
- Collingridge, G.L., Isaac, J.T. Wang, Y.T. (2004). Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5(12):952–962. doi: 10.1038/nrn1556.
- Côme, E., Heubl, M., Schwartz, E.J., Poncer, J.C., Lévi, S. (2019). Reciprocal Regulation of KCC2 Trafficking and Synaptic Activity. *Front. Cell Neurosci.*, 13:48. doi: 10.3389/fncel.2019.00048.
- Conn, H.O., Lieberthal, M.M. (1979). Chapter 1: The syndrome of portal-systemic encephalopathy. *The Hepatic Coma Syndromes and Lactulose*, 1–45.
- Coombs, I.D., and Cull-Candy, S.G. (2009). Transmembrane AMPA receptor regulatory proteins and AMPA receptor function in the cerebellum. *Neuroscience*, 162: 656–665. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.01.004
- Corbalán, R., Montoliu, C., Miñana, M.D., Del Olmo, J.A., Serra, M.A., Aparisi, L., Rodrigo, J.M., Felipo, V. (2002). Altered modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in patients with liver disease. *Metab. Brain Dis.*, 17(4):295-301. doi: 10.1023/a:1021953717331.
- Córdoba, J., Cabrera, J., Lataif, L., Penev, P., Zee, P., Blei, A.T. (1998). High prevalence of sleep disturbance in cirrhosis. *Hepatology*, 27(2):339–345. doi: 10.1002/hep.510270204.
- Cordshagen, A., Busch, W., Winklhofer, M., Nothwang, H. G., Hartmann, A.M. (2018). Phosphoregulation of the intracellular termini of K⁺-Cl⁻ cotransporter 2 (KCC2) enables flexible control of its activity. *J. Biol. Chem.*, 293:16984–16993. doi:10.1074/jbc.RA118.004349
- Cossart, R., Bernard, C., Ben-Ari, Y. (2005). Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends Neurosci.*, 28(2):108-115. doi: 10.1016/j.tins.2004.11.011.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 11(3):327–335. doi: 10.1016/s0959-4388(00)00215-4.
- Cull-Candy, S., Kelly, L. Farrant, M. (2006). Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 16(3):288–297. doi: 10.1016/j.conb.2006.05.012.
- Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Agusti, A., Cabrera -Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernández-Rabaza, V., Gomez-Gimenez, B., Elmlili, N., Llansola, M., et al. (2016a). Infliximab reduces peripheral inflammation, neuroinflammation, and extracellular GABA in the cerebellum and improves learning and motor coordination in rats with hepatic encephalopathy. *J. Neuroinflammation.*, 13(1):245. doi: 10.1186/s12974-016-0710-8.

- Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Cabrera -Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernández-Rabaza, V., Gil-Perotín, S., Cubas-Núñez, L., García -Verdugo, J.-M., Agusti, A., et al. (2016b). Reducing Peripheral Inflammation with Infliximab Reduces Neuroinflammation and Improves Cognition in Rats with Hepatic Encephalopathy. *Front. Mol. Neurosci.*, 9:106. doi: 10.3389/fnmol.2016.00106. eCollection 2016.
- Danbolt, N.C. (2001). Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.*, 65(1):1–105. doi: 10.1016/s0301-0082(00)00067-8.
- De Flora, A., Guida, L., Franco, L., Zocchi, E., Pestarino, M., Usai, C., Marchetti, C., Fedele, E., Fontana, G., Raiteri, M. (1996). Ectocellular in vitro and in vivo metabolism of cADP-ribose in cerebellum. *Biochem. J.*, 320 (Pt 2): 665–671.
- Deidda, G., Bozarth, I.F., Cancedda, L. (2014). Modulation of GABAergic transmission in development and neurodevelopmental disorders: investigating physiology and pathology to gain therapeutic perspectives. *Front. Cell Neurosci.*, 8:119. doi: 10.3389/fncel.2014.00119
- Dejanovic, B., Semtner, M., Ebert, S., Lamkemeyer, T., Neuser, F., Lüscher, B., Meier, J. C., Schwarz, G. (2014). Palmitoylation of gephyrin controls receptor clustering and plasticity of GABAergic synapses. *PLoS biology*, 12(7): e1001908. doi: 10.1371/journal.pbio.1001908.
- Dennis, C.V., Sheahan, P.J., Graeber, M.B., Sheedy, D.L., Kril, J.J., Sutherland, G.T. (2014). Microglial proliferation in the brain of chronic alcoholics with hepatic encephalopathy. *Metab. Brain. Dis.*, 29(4):1027-39. doi: 10.1007/s11011-013-9469-0.
- Dhanda, S., Gupta, S., Halder, A., Sunkaria, A., Sandhir, R. (2018). Systemic inflammation without gliosis mediates cognitive deficits through impaired BDNF expression in bile duct ligation model of hepatic encephalopathy. *Brain Behav. Immun.*, 70:214-232. doi: 10.1016/j.bbi.2018.03.002.
- Dheen, S.T., Kaur, C., Ling, E.A. (2007). Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr. Med. Chem.*, 14(11):1189-97. doi: 10.2174/092986707780597961.
- Dhiman, R.K., Chawla, Y.K. (2009). Minimal hepatic encephalopathy. *Indian J. Gastroenterol.*, 28:5–16. doi: 10.1007/s12664-009-0003-6.
- Di Pardo, A., Maglione, V. (2018). The S1P Axis: New Exciting Route for Treating Huntington's Disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, 39(5):468-480. doi: 10.1016/j.tips.2018.02.009.
- Ding, H., Chen, J., Su, M., Lin, Z., Zhan, H., Yang, F., Li, W., Xie, J., Huang, Y., Liu, X., Liu, B., Zhou, X. (2020). BDNF promotes activation of astrocytes and microglia contributing to neuroinflammation and mechanical allodynia in cyclophosphamide-induced cystitis. *J. Neuroinflammation.*, 17(1):19. doi: 10.1186/s12974-020-1704-0.
- Dittman, J.S., Kreitzer, A.C. and Regehr, W.G. (2000). Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals. *J Neurosci.*, 20(4):1374–1385. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-04-01374.2000.

- Domek-Łopacińska, K., Strosznajder, J.B. (2005). Cyclic GMP metabolism and its role in brain physiology. *J. Physiol. Pharmacol.*, 56 Suppl 2:15-34.
- Dong, Y.Y., Wang, L., Chu, X., Cui, S., Kong, Q.X. (2019). [Altered expressions of SphK1 and S1PR2 in hippocampus of epileptic rats]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 35(4):308-311. doi: 10.12047/j.cjap.5792.2019.065.
- Dzhala, V.I., Talos, D.M., Sdrulla, D.A., Brumback, A.C., Mathews, G.C., Benke, T.A., Delpire, E., Jensen, F.E., Staley, K.J. (2005). NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat. Med.*, 11(11):1205-13. doi: 10.1038/nm1301.
- Edelmann, E., Lessmann, V., Brigadski, T. (2013). Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 76 Pt C:610-27. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.05.043.
- Eftekhari, S., Mehrabi, S., Soleimani, M., Hassanzadeh, G., Shahrokhi, A., Mostafavi, H., Hayat, P., Barati, M., Mehdizadeh, H., Rahmanzadeh, R., Hadjighassem, M.R., Joghataei, M.T. (2014). BDNF modifies hippocampal KCC2 and NKCC1 expression in a temporal lobe epilepsy model. *Acta Neurobiol. Exp.*, 74(3):276-87.
- Elizondo, A., Araya, J., Rodrigo, R., Poniachik, J., Csendes, A., Maluenda, F., Díaz, J.C., Signorini, C., Sgherri, C., Comporti, M., et al. (2007). Polyunsaturated fatty acid pattern in liver and erythrocyte phospholipids from obese patients. *Obesity (Silver Spring)*, 15(1):24–31. doi: 10.1038/oby.2007.518.
- ElMlili, N., Boix, J., Ahabrach, H., Rodrigo, R., Errami, M., and Felipo, V. (2010). Chronic hyperammonemia induces tonic activation of NMDA receptors in cerebellum. *J. Neurochem.*, 112(4): 1005-1014. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06520.x.
- Elwood, E., Lim, Z., Naveed, H., Galea, I. (2017). The effect of systemic inflammation on human brain barrier function. *Brain, behavior, and immunity*, 62:35–40. doi:10.1016/j.bbi.2016.10.020
- Erceg, S., Monfort, P., Hernandez-Viadel, M., Llansola, M., Montoliu, C., Felipo, V. (2005b). Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain Res.*, 1036(1-2):115–121. doi: 10.1016/j.brainres.2004.12.045.
- Erceg, S., Monfort, P., Hernández-Viadel, M., Rodrigo, R., Montoliu, C., Felipo, V. (2005a). Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology*, 41(2):299–306. doi: 10.1002/hep.20565.
- Essrich, C., Lorez, M., Benson, J.A., Fritschy, J.M., Lüscher, B. (1998). Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat. Neurosci.*, 1(7):563-71. doi: 10.1038/2798.
- Eugène, E., Depienne, C., Baulac, S., Baulac, M., Fritschy, J. M., Le Guern, E., Miles, R., Poncer, J. C. (2007). GABA(A) receptor gamma 2 subunit mutations linked to human epileptic syndromes differentially

- affect phasic and tonic inhibition. *J. Neurosci.*, 27(51): 14108–14116. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2618-07.2007.
- Fan, X., Jin, W.Y., Wang, Y.T. (2014). The NMDA receptor complex: a multifunctional machine at the glutamatergic synapse. *Front. Cell Neurosci.*, 8:160. doi: 10.3389/fncel.2014.00160.
- Farrant, M., Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat. Rev. Neurosci.*, 6(3):215-29. doi: 10.1038/nrn1625.
- Fedele, E., Ansaldo, M.A., Varnier, G., Raiteri, M. (2000). Benzodiazepine-sensitive GABA(A) receptors limit the activity of the NMDA/NO/cyclic GMP pathway: a microdialysis study in the cerebellum of freely moving rats. *J. Neurochem.*, 75(2):782-7. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0750782.x.
- Federico, P., MacVicar, B.A. (1996). Imaging the induction and spread of seizure activity in the isolated brain of the guinea pig: the roles of GABA and glutamate receptors. *J. Neurophysiol.*, 76(5):3471-92. doi: 10.1152/jn.1996.76.5.3471.
- Felipo, V. (2013). Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nat. Rev. Neurosci.*, 14(12):851-858. doi: 10.1038/nrn3587
- Felipo, V., Butterworth, R.F. (2002). Neurobiology of ammonia. *Prog. Neurobiol.*, 67(4):259-279. doi: 10.1016/s0301-0082(02)00019-9.
- Felipo, V., Hermenegildo, C., Montoliu, C., Llansola, M., Miñana, M.D. (1998). Neurotoxicity of ammonia and glutamate: molecular mechanisms and prevention. *Neurotoxicology*, 19(4-5): 675-681.
- Felipo, V., Miñana, M.D., Grisolia, S. (1988a). Long-term ingestion of ammonium increases acetylglutamate and urea levels without affecting the amount of carbamoyl-phosphate synthase. *Eur. J. Biochem.*, 176(3):567–571. doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb14315.x.
- Felipo, V., Miñana, M.D., Grisolia, S. (1988b). Paradoxical protection of both protein-free and high protein diets against acute ammonium intoxication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 156(1):506–510. doi: 10.1016/s0006-291x(88)80870-2.
- Felipo, V., Ordoño, J.F., Urios, A., El Mlili, N., Giménez-Garzó, C., Aguado, C., González-Lopez, O., Giner-Duran, R., Serra, M.A., Wassel, A., Rodrigo, J.M., Salazar, J., Montoliu, C. (2012a). Patients with minimal hepatic encephalopathy show impaired mismatch negativity correlating with reduced performance in attention tests. *Hepatology*, 55(2):530-9. doi: 10.1002/hep.24704.
- Ferenci, P., Lockwood, A., Mullen, K., Tarter, R., Weissenborn, K., Blei, A.T. (2002). Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology*, 35:716–721.
- Finkbeiner, S., Tavazoie, S.F., Maloratsky, A., Jacobs, K.M., Harris, K.M., Greenberg, M.E. (1997). CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*, 19(5):1031-47. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80395-5.

- Fioravante, D. Regehr, W.G. (2011). Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 21(2):269–274. doi: 10.1016/j.conb.2011.02.003.
- Fischer, I., Alliod, C., Martinier, N., Newcombe, J., Brana, C., Pouly, S. (2011). Sphingosine kinase 1 and sphingosine 1-phosphate receptor 3 are functionally upregulated on astrocytes under pro-inflammatory conditions. *PLoS One*, 6(8):e23905. doi: 10.1371/journal.pone.0023905.
- Flatman, P.W. (2002). Regulation of Na-K-2Cl cotransport by phosphorylation and protein-protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1566:140–151.
- Flatman, P.W. (2005). Activation of ferret erythrocyte Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport by deoxygenation. *J. Physiol.*, 563:421–431.
- Fortin, D.A., Davare, M.A., Srivastava, T., Brady, J.D., Nygaard, S., Derkach, V.A., Soderling, T.R. (2010). Long-term potentiation-dependent spine enlargement requires synaptic Ca²⁺-permeable AMPA receptors recruited by CaM-kinase I. *J. Neurosci.*, 30(35): 11565-75. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1746-10.2010.
- Fortune, E.S. and Rose, G.J. (2001). Short-term synaptic plasticity as a temporal filter. *Trends Neurosci.*, 24(7):381–385. doi: 10.1016/s0166-2236(00)01835-x.
- Francis, S.H. (2010). The role of cGMP-dependent protein kinase in controlling cardiomyocyte cGMP. *Circ. Res.*, 107(10):1164-6. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233239.
- Fritschy, J.M., Harvey, R.J., Schwarz, G. (2008). Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends Neurosci.*, 31(5):257-64. doi: 10.1016/j.tins.2008.02.006
- Fuhrmann, G., Segev, I., Markram, H. and Tsodyks, M. (2002). Coding of Temporal Information by Activity-Dependent Synapses. *J. Neurophysiol.*, 87(1):140–148. doi: 10.1152/jn.00258.2001.
- Funakoshi-Tago, M., Tago, K., Andoh, K., Sonoda, Y., Tominaga, S., Kasahara, T. (2005). Functional role of c-Src in IL-1-induced NF-kappa B activation: c-Src is a component of the IKK complex. *J. Biochem.*, 137(2):189-97. doi: 10.1093/jb/mvi018.
- Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L., Gilroy, D. W., Fasano, A., Miller, G. W., Miller, A. H., Mantovani, A., Weyand, C. M., Barzilai, N., Goronzy, J. J., Rando, T. A., Effros, R. B., Lucia, A., Kleinstreuer, N., Slavich, G. M. (2019). Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature medicine*, 25(12):1822–1832. doi: 10.1038/s41591-019-0675-0.
- Gaire, B.P., Lee, C.H., Sapkota, A., Lee, S.Y., Chun, J., Cho, H.J., Nam, T.G., Choi, J.W. (2018a). Identification of Sphingosine 1-Phosphate Receptor Subtype 1 (S1P1) as a Pathogenic Factor in Transient Focal Cerebral Ischemia. *Mol. Neurobiol.*, 55(3):2320-2332. doi: 10.1007/s12035-017-0468-8.

- Gaire, B.P., Song, M.R., Choi, J.W. (2018b). Sphingosine 1-phosphate receptor subtype 3 (S1P3) contributes to brain injury after transient focal cerebral ischemia via modulating microglial activation and their M1 polarization. *J. Neuroinflammation*, 15(1):284. doi: 10.1186/s12974-018-1323-1.
- Gale, K. (1992). GABA and epilepsy: basic concepts from preclinical research. *Epilepsia.*, 33 Suppl 5:S3-12.
- Gardoni, F., Mauceri, D., Malinverno, M., Polli, F., Costa, C., Tozzi, A., Siliquini, S., Picconi, B., Cattabeni, F., Calabresi, P., Di Luca, M. (2009). Decreased NR2B subunit synaptic levels cause impaired long-term potentiation but not long-term depression. *J. Neurosci.*, 29(3): 669-677. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3921-08.2009.
- Garthwaite, J., Charles, S.L., Chess-Williams, R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, 336(6197):385-8. doi: 10.1038/336385a0.
- Garzon-Muvdi, T., Schiapparelli, P., ap Rhys, C., Guerrero-Cazares, H., Smith, C., Kim, D.H., Kone, L., Farber, H., Lee, D.Y., An, S.S., Levchenko, A., Quiñones-Hinojosa, A. (2012). Regulation of brain tumor dispersal by NKCC1 through a novel role in focal adhesion regulation. *PLoS Biol.*, 10(5):e1001320. doi: 10.1371/journal.pbio.1001320.
- Geiger, J.R., Melcher, T., Koh, D.S., Sakmann, B., Seeburg, P.H., Jonas, P. Monyer, H. (1995). Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron*, 15(1):193–204. doi: 10.1016/0896-6273(95)90076-4.
- Gerok, W., Häussinger, D. (1984). [Ammonium detoxication and pH regulation by the liver]. *Med Welt.*, 35:28–34.
- Gibson, G.E., Zimber, A., Krook, L., Richardson, E.P., Visek, W.J. (1974). Brain histology and behavior of mice injected with urease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 33:201–211. doi: 10.1097/00005072-197404000-00001.
- Glykys, J., Mann, E.O., Mody, I. (2008). Which GABA(A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *J. Neurosci.*, 28(6):1421-6. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4751-07.2008.
- Glykys, J., Mody, I. (2007). The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus. *J. Physiol.*, 582(Pt 3):1163-78. doi: 10.1113/jphysiol.2007.134460.
- González, M.I., Cruz Del Angel, Y., Brooks-Kayal, A. (2013). Down-regulation of gephyrin and GABAA receptor subunits during epileptogenesis in the CA1 region of hippocampus. *Epilepsia.*, 54(4):616-24. doi: 10.1111/epi.12063.
- González-Fernández, B., Sánchez, D. I., González-Gallego, J., Tuñón, M. J. (2017). Sphingosine 1-Phosphate Signaling as a Target in Hepatic Fibrosis Therapy. *Front Pharmacol.*, 8:579. doi: 10.3389/fphar.2017.00579.

- Grassi, S., Mauri, L., Prioni, S., Cabitta, L., Sonnino, S., Prinetti, A., Giussani, P. (2019). Sphingosine 1-Phosphate Receptors and Metabolic Enzymes as Druggable Targets for Brain Diseases. *Front. Pharmacol.*, 10:807. doi: 10.3389/fphar.2019.00807.
- Grau, E., Felipo, V., Miñana, M.D., Grisolia, S. (1992). Treatment of hyperammonemia with carbamylglutamate in rats. *Hepatology*. 15(3):446-8. doi: 10.1002/hep.1840150315. PMID: 1544625.
- Grazioli, L., Alberti, D., Olivetti, L., Rigamonti, W., Codazzi, F., Matricardi, L., Fugazzola, C., and Chiesa, A. (2000). Congenital absence of portal vein with nodular regenerative hyperplasia of the liver. *Eur. Radiol.*, 10(5): 820–825. doi: 10.1007/s003300051012
- Greve, J.W., Gouma, D.J., Soeters, P.B., and Buurman, W.A. (1990). Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: a study with germ-free rats. *Gastroenterology*, 98(2):478–485. doi: 10.1016/0016-5085(90)90841-n.
- Groeneweg, M., Quero, J.C., De Bruijn, I., Hartmann, I.J., Essink-Bot, M.L., Hop, W.C., Schalm, S.W. (1998). Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology*., 28(1):45–49. doi: 10.1002/hep.510280108.
- Haley, J.E., Wilcox, G.L., Chapman, P.F. (1992). The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 8(2):211-6. doi: 10.1016/0896-6273(92)90288-o.
- Henley, J.M. Wilkinson, K. A. (2013). AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. *Dialogues Clin. Neurosci.*, 15(1):11-27.
- Hermenegildo, C., Marcaida, G., Montoliu, C., Grisolia, S., Miñana, M.D., Felipo, V. (1996). NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. *Neurochem. Res.*, 21(10): 1237-1244. doi: 10.1007/BF02532401.
- Hermenegildo, C., Monfort, P., and Felipo, V. (2000) Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology*, 31(3): 709-715. doi: 10.1002/hep.510310322.
- Hermenegildo, C., Montoliu, C., Llansola, M., Muñoz, M.D., Gaztelu, J.M., Miñana, M.D., Felipo, V. (1998). Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo. *Eur. J. Neurosci.*, 10:3201–3209. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00329.x.
- Hernández-Rabaza, V., Agusti, A., Cabrera -Pastor, A., Fustero, S., Delgado, O., Taoro-Gonzalez, L., Montoliu, C., Llansola, M., Felipo, V. (2015). Sildenafil reduces neuroinflammation and restores spatial learning in rats with hepatic encephalopathy: underlying mechanisms. *Journal of Neuroinflammation*, 12:195. doi: 10.1186/s12974-015-0420-7

- Hernández-Rabaza, V., Cabrera -Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Malaguarnera, M., Agustí, A., Llansola, M., Felipo, V. (2016a). Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by sulforaphane. *J. neuroinflammation*, 13:41. doi: 10.1186/s12974-016-0505-y.
- Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Gonzalez-Usano, A., Agusti, A., Balzano, T., Llansola M., Felipo, V (2016b). Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarization of microglia. *J. neuroinflammation*, 13(1):83. doi: 10.1186/s12974-016-0549-z.
- Hernandez-Viadel, M., Montoliu, C., Monfort, P., Canales, J.J., Erceg, S., Rowan, M., Ceccatelli, S., Felipo, V. (2003). Chronic exposure to 2,5-hexanedione impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in rat brain in vivo. *Neurochem. Int.*, 42(7):525–533. doi: 10.1016/s0197-0186(02)00190-0.
- Hewett, S.J., Jackman, N.A., Claycomb, R.J. (2012). Interleukin-1 β in Central Nervous System Injury and Repair. *Eur. J. Neurodegener. Dis.*, 1(2):195-211.
- Hinojosa, A.E., Garcia-Bueno, B., Leza, J.C., Madrigal, J.L. (2011). CCL2/MCP-1 modulation of microglial activation and proliferation. *J. Neuroinflammation*, 8:77. doi: 10.1186/1742-2094-8-77.
- Hjorth-Simonsen, A. (1973). Some intrinsic connections of the hippocampus in the rat: an experimental analysis. *J. Comp. Neurol.*, 147:145–161.
- Hoshino, K., Hasegawa, K., Kamiya, H., Morimoto, Y. (2017). Synapse-specific effects of IL-1 β on long-term potentiation in the mouse hippocampus. *Biomed. Res.*, 38(3):183-188. doi: 10.2220/biomedres.38.183.
- Hsu, L.C., Reddy, S.V., Yilmaz, Ö., Yu, H. (2019). Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2 Controls Podosome Components Induced by RANKL Affecting Osteoclastogenesis and Bone Resorption. *Cells*, 8(1):17. doi: 10.3390/cells8010017.
- Hu, X., Nesic-Taylor, O., Qiu, J., Rea, H.C., Fabian, R., Rassin, D.K., Perez-Polo, J.R. (2005). Activation of nuclear factor-kappaB signaling pathway by interleukin-1 after hypoxia/ischemia in neonatal rat hippocampus and cortex. *J. Neurochem.*, 93(1):26-37. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02968.x.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.*, 24:677-736. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.677.
- Huang, Y.Z., McNamara, J.O. (2010). Mutual regulation of Src family kinases and the neurotrophin receptor TrkB. *J. Biol. Chem.*, 285(11):8207-17. doi: 10.1074/jbc.M109.091041.
- Huganir, R.L., Nicoll, R.A. (2013). AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron*, 80(3):704-17. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.025.

- Isaac, J.T., Ashby, M., and McBain, C.J. (2007). The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*, 54: 859–871. doi: 10.1016/j.neuron.2007.06.001.
- Ishizuka, K., Kimura, T., Igata-yi, R., Katsuragi, S., Takamatsu, J., Miyakawa, T. (1997). Identification of monocyte chemoattractant protein-1 in senile plaques and reactive microglia of Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin. Neurosci.*, 51(3):135-8. doi: 10.1111/j.1440-1819.1997.tb02375.x.
- Ishizuka, N., Weber, J., Amaral, D.G. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 295(4):580-623. doi: 10.1002/cne.902950407.
- Jacob, T. C., Moss, S. J., Jurd, R. (2008). GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature reviews Neuroscience*, 9(5): 331–343. doi:10.1038/nrn2370
- Jacob, T.C., Moss, S.J., Jurd, R. (2008). GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat. Rev. Neurosci.*, 9(5):331-43. doi: 10.1038/nrn2370.
- Jäkel, S., Dimou, L. (2017). Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11:24. doi:10.3389/fncel.2017.00024
- Jayakumar, A.R., Bethea, J.R., Tong, X.Y., Gomez, J., Norenberg, M.D. (2011). NF- κ B in the mechanism of brain edema in acute liver failure: studies in transgenic mice. *Neurobiol. Dis.*, 41(2):498-507. doi: 10.1016/j.nbd.2010.10.021.
- Jin, Y., Sun, L.H., Yang, W., Cui, R.J., Xu, S.B. (2019). The Role of BDNF in the Neuroimmune Axis Regulation of Mood Disorders. *Front. Neurol.*, 10:515. doi: 10.3389/fneur.2019.00515.
- Johansson, M., Agusti, A., Llansola, M., Montoliu, C., Strömberg, J., Malinina, E., Ragagnin, G., Doverskog, M., Bäckström, T., Felipo, V. (2015). GR3027 antagonizes GABAA receptor-potentiating neurosteroids and restores spatial learning and motor coordination in rats with chronic hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 309(5):G400-9. doi: 10.1152/ajpgi.00073.2015.
- Jones, E.A. (2002). Ammonia, the GABA neurotransmitter system, and hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.*, 17(4): 275-81. doi: 10.1023/a:1021949616422.
- Jones, E.A., Weissenborn, K. (1997). Neurology and the liver. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 63(3):279–93. doi: 10.1136/jnnp.63.3.279.
- Jover, R., Compañy, L., Gutiérrez, A., Zapater, P., Pérez-Serra, J., Girona, E., Aparicio, J.R.R. Pérez-Mateo, M. (2003). Minimal hepatic encephalopathy and extrapyramidal signs in patients with cirrhosis. *The American journal of gastroenterology*, 98(7):1599–604. doi: 10.1111/j.1572-0241.2003.07528.x.
- Jover, R., Rodrigo, R., Felipo, V., Insausti, R., Sáez-Valero, J., García-Ayllón, M.S., Suárez, I., Candela, A., Compañy, A., Esteban, A., et al. (2006). Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated

rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology*, 43(6):1257–1266. doi: 10.1002/hep.21180.

Kaila, K. (1994). Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 42(4):489-537. doi: 10.1016/0301-0082(94)90049-3.

Kameyama, N., Murai, Y., Tanaka, E. (2020). The inhibition of evoked excitatory postsynaptic potentials produced by ammonium chloride in rat hippocampal CA1 neurons. *Heliyon*, 6(12): e05830. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05830.

Kandaswamy, U., Deng, P.Y., Stevens, C.F. Klyachko, V.A. (2010). The role of presynaptic dynamics in processing of natural spike trains in hippocampal synapses. *J. Neurosci.*, 30(47):15904–15914. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4050-10.2010.

Kandek, E.R., Tauc, L. (1964). Mechanism of prolonged heterosynaptic facilitation. *Nature*, 202:145-7. doi: 10.1038/202145a0.

Kaplan, D.R., Miller, F.D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 10(3):381-91. doi: 10.1016/s0959-4388(00)00092-1.

Karadottir, R., Cavelier, P., Bergersen, L.H., Attwell, D. (2005). NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature*, 438(7071):11621166. doi: 10.1038/nature04302.

Karunakaran, I., van Echten-Deckert, G. (2017). Sphingosine 1-phosphate - A double edged sword in the brain. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1859(9 Pt B):1573-1582. doi: 10.1016/j.bbmem.2017.03.008.

Kauer, J.A., Malenka, R.C. (2007). Synaptic plasticity and addiction. *Nat. Rev. Neurosci.*, 8(11):844-58. doi: 10.1038/nrn2234.

Kelly-Welch, A.E., Hanson, E.M., Boothby, M.R., Keegan, A.D. (2003). Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science*, 300(5625):1527-8. doi: 10.1126/science.1085458.

Kim, J., Lee, S., Choi, B.R., Yang, H., Hwang, Y., Park, J.H., LaFerla, F.M., Han, J.S., Lee, K.W., Kim, J. (2017a). Sulforaphane epigenetically enhances neuronal BDNF expression and TrkB signaling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.*, 61(2). doi: 10.1002/mnfr.201600194.

Kim, J., Lee, S., Kang, S., Kim, S. H., Kim, J. C., Yang, M., Moon, C. (2017b). Brain-derived neurotrophic factor and GABAergic transmission in neurodegeneration and neuroregeneration. *Neural Regen. Res.*, 12(10):1733-1741. doi: 10.4103/1673-5374.217353.

Kim, J.S., Gautam, S.C., Chopp, M., Zaloga, C., Jones, M.L., Ward, P.A., Welch, K.M. (1995). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. *J. Neuroimmunol.*, 56(2):127-34. doi: 10.1016/0165-5728(94)00138-e.

Kittler, J.T., Chen, G., Honing, S., Bogdanov, Y., McAinsh, K., Arancibia-Carcamo, I.L., Jovanovic, J.N., Pangalos, M.N., Haucke, V., Yan, Z., Moss, S.J. (2005). Phospho-dependent binding of the clathrin AP2

adaptor complex to GABAA receptors regulates the efficacy of inhibitory synaptic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.*, 102(41):14871-6. doi: 10.1073/pnas.0506653102.

Klein, J.D., O'Neill, W.C. (1995). Volume-sensitive myosin phosphorylation in vascular endothelial cells: correlation with Na-K-2Cl cotransport. *Am. J. Physiol.*, 269(6 Pt 1):C1524-31. doi: 10.1152/ajpcell.1995.269.6.C1524.

Klementiev, B., Li, S., Korshunova, I., Dmytriyeva, O., Pankratova, S., Walmod, P. S., Kjær, L. K., Dahllöf, M. S., Lundh, M., Christensen, D. P., Mandrup-Poulsen, T., Bock, E., Berezin, V. (2014). Anti-inflammatory properties of a novel peptide interleukin 1 receptor antagonist. *J. Neuroinflammation*, 11:27. doi: 10.1186/1742-2094-11-27.

Kleppisch, T., Feil, R. (2009). cGMP signalling in the mammalian brain: role in synaptic plasticity and behaviour. *Handb. Exp. Pharmacol.*, (191):549-79. doi: 10.1007/978-3-540-68964-5_24.

Klyachko, V.A. Stevens, C.F. (2006). Excitatory and feed-forward inhibitory hippocampal synapses work synergistically as an adaptive filter of natural spike trains. *PLoS Biol.*, 4, e207.

Komiya, H., Takeuchi, H., Ogawa, Y., Hatooka, Y., Takahashi, K., Katsumoto, A., Kubota, S., Nakamura, H., Kunii, M., Tada, M., Doi, H., Tanaka, F. (2020). CCR2 is localized in microglia and neurons, as well as infiltrating monocytes, in the lumbar spinal cord of ALS mice. *Mol. Brain.*, 13(1):64. doi: 10.1186/s13041-020-00607-3.

Kong, S., Cheng, Z., Liu, J., Wang, Y. (2014). Downregulated GABA and BDNF-TrkB pathway in chronic cyclothiazide seizure model. *Neural. Plast.*, 2014:310146. doi: 10.1155/2014/310146.

Kopec, C.D., Real, E., Kessels, H.W., Malinow, R. (2007). GluR1 links structural and functional plasticity at excitatory synapses. *J. Neurosci.*, 27: 13706-18. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3503-07.2007.

Kosenko, E., Kaminsky, Y., Grau, E., Miñana, M.D., Marcaida, G., Grisolia, S., Felipe, V. (1994). Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *J. Neurochem.*, 63(6):2172-8. doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.63062172.x.

Kosenkov, A.M., Gaidin, S.G., Sergeev, A.I., Teplov, I.Y., Zinchenko, V.P. (2018). Fast changes of NMDA and AMPA receptor activity under acute hyperammonemia in vitro. *Neurosci. Lett.*, 686: 80-86. doi: 10.1016/j.neulet.2018.08.054.

Kountouras, J., Billing, B. H., Scheuer, P.J. (1984). Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br. J. Exp. Pathol.*, 65(3):305-311.

Kumar, S.S., Bacci, A., Kharazia, V., Huguenard, J.R. (2002). A developmental switch of AMPA receptor subunits in neocortical pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, 22(8):3005-3015. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-08-03005.2002.

- Law, R.M., Stafford, A., Quick, M.W. (2000). Functional regulation of gamma-aminobutyric acid transporters by direct tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 275(31):23986-91. doi: 10.1074/jbc.M910283199.
- Lee, H.K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M.F., Huganir, R.L. (2000). Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature*, 405(6789):955-9. doi: 10.1038/35016089.
- Lee, K., Escobar, I., Jang, Y., Kim, W., Ausubel, F.M., Mylonakis, E. (2020). In the Model Host *Caenorhabditis elegans*, Sphingosine-1-Phosphate-Mediated Signaling Increases Immunity toward Human Opportunistic Bacteria. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(21):7813. doi: 10.3390/ijms21217813.
- Lee, V., Maguire, J. (2014). The impact of tonic GABAA receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and cell type. *Frontiers in neural circuits*, 8:3. doi:10.3389/fncir.2014.00003
- Lei, S., Jackson, M., Jia, Z., Roder, J., Bai, D., Orser, B.A., MacDonald, J.F. (2000). Cyclic GMP-dependent feedback inhibition of AMPA receptors is independent of PKG. *Nat. Neurosci.*, 3(6): 559–565. doi: 10.1038/75729.
- Leke, R., Oliveira, D.L., Forgiarini, L.F., Escobar, T.D., Hammes, T.O., Meyer, F.S., Keiding, S., Silveira, T.R., Schousboe, A. (2013). Impairment of short term memory in rats with hepatic encephalopathy due to bile duct ligation. *Metab. Brain Dis.*, 28(2):187-92. doi: 10.1007/s11011-012-9347-1.
- Lima Giacobbo, B., Doorduyn, J., Klein, H. C., Dierckx, R., Bromberg, E., de Vries, E. (2019). Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Mol. Neurobiol.*, 56(5):3295-3312. doi: 10.1007/s12035-018-1283-6.
- Liu, L., Wong, T.P., Pozza, M.F., Lingenhoehl, K., Wang, Y., Sheng, M., Auberson, Y.P., Wang, Y.T. (2004). Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science*, 304(5673): 1021-4. doi: 10.1126/science.1096615.
- Liu, W., Liu, B., Liu, S., Zhang, J., Lin, S. (2016). Sphingosine-1-phosphate receptor 2 mediates endothelial cells dysfunction by PI3K-Akt pathway under high glucose condition. *Eur. J. Pharmacol.*, 776:19-25. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.02.056.
- Llansola, M., Rodrigo, R., Monfort, P., Montoliu, C., Kosenko, E., Cauli, O., Piedrafita, B., El Mlili, N., Felipo, V. (2007). NMDA receptors in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.*, 22(3-4): 321-35. doi: 10.1007/s11011-007-9067-0.
- Lluis, J.M., Buricchi, F., Chiarugi, P., Morales, A., Fernandez-Checa, J.C. (2007). Dual role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia signaling: activation of nuclear factor- κ B via c-SRC and oxidant-dependent cell death. *Cancer Res.*, 67(15):7368-77. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0515.

- Loddenkemper, T., Talos, D.M., Cleary, R.T., Joseph, A., Sanchez Fernández, I., Alexopoulos, A., Kotagal, P., Najm, I., Jensen, F.E. (2014). Subunit composition of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors in status epilepticus. *Epilepsy Res.*, 108(4):605–615. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2014.01.015.
- Lorenz-Guertin, J.M., Bambino, M.J., Jacob, T.C. (2018). γ 2 GABAAR Trafficking and the Consequences of Human Genetic Variation. *Front. Cell. Neurosci.*, 12:265. doi: 10.3389/fncel.2018.00265
- Lu, L.F., Fiscus, R.R. (1999). Nitric oxide donors enhance calcitonin gene-related peptide-induced elevations of cyclic AMP in vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 376(3):307-14. doi: 10.1016/s0014-2999(99)00370-2.
- Lu, Y.F., Hawkins, R.D. (2002). Ryanodine receptors contribute to cGMP-induced late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J. Neurophysiol.*, 88(3):1270-8. doi: 10.1152/jn.2002.88.3.1270.
- Lund, I.V., Hu, Y., Raol, Y.H., Benham, R.S., Faris, R., Russek, S.J., Brooks-Kayal, A. R. (2008). BDNF selectively regulates GABAA receptor transcription by activation of the JAK/STAT pathway. *Sci. signal.*, 1(41):ra9. doi: 10.1126/scisignal.1162396
- Maceyka, M., Spiegel, S. (2014). Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature*, 510(7503):58-67. doi: 10.1038/nature13475.
- Madrigal, J.L., Caso, J.R. (2014). The chemokine (C-C motif) ligand 2 in neuroinflammation and neurodegeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 824:209-19. doi: 10.1007/978-3-319-07320-0_15.
- Magnin, E., Francavilla, R., Amalyan, S., Gervais, E., David, L.S., Luo, X., Topolnik, L. (2019). Input-Specific Synaptic Location and Function of the α 5 GABAA Receptor Subunit in the Mouse CA1 Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.*, 39(5):788-801. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0567-18.2018. ζ
- Malaguarnera, M., Llansola, M., Balzano, T., Gómez-Giménez, B., Antúnez-Muñoz, C., Martínez-Alarcón, N., Mahdinia, R., Felipo, V. (2019). Bicuculline Reduces Neuroinflammation in Hippocampus and Improves Spatial Learning and Anxiety in Hyperammonemic Rats. Role of Glutamate Receptors. *Front. Pharmacol.*, 10:132. doi: 10.3389/fphar.2019.00132.
- Malinow, R. (2003). AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.*, 358: 707–714.
- Malinow, R., Tsien, R.W. (1990). Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature*, 346(6280):177-180. doi: 10.1038/346177a0.
- Marcaggi, P., Coles, J.A. (2001). Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Prog. Neurobiol.*, 64(2):157–183. doi: 10.1016/s0301-0082(00)00043-5.

- Marcaida, G., Felipo, V., Hermenegildo, C., Miñana, M.D., Grisolia, S. (1992). Acute ammonia toxicity is mediated by the NMDA type of glutamate receptors. *FEBS Lett.*, 296(1): 67-68. doi: 10.1016/0014-5793(92)80404-5.
- Marchi, M., Raiteri, M. (1996). Nicotinic autoreceptors mediating enhancement of acetylcholine release become operative in conditions of “impaired” cholinergic presynaptic function. *J. Neurochem.*, 67(5):1974–1981. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.67051974.x.
- Marini, A.M., Jiang, X., Wu, X., Tian, F., Zhu, D., Okagaki, P., Lipsky, R.H. (2004). Role of brain-derived neurotrophic factor and NF-kappaB in neuronal plasticity and survival: From genes to phenotype. *Restor. Neurol. Neurosci.*, 22(2):121-30.
- Martinez-Hernandez, A., Bell, K.P., Norenberg, M.D. (1977). Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*, 195(4284):1356–1358. doi: 10.1126/science.14400.
- Martinez-Hernandez, A., Bell, K.P., Norenberg, M.D. (1977). Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science.*, 195(4284):1356-1358. doi: 10.1126/science.14400.
- Massey, P.V., Johnson, B.E., Moulton, P.R., Auberson, Y.P., Brown, M.W., Molnar, E., Collingridge, G.L., Bashir, Z.I. (2004). Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J. Neurosci.*, 24(36): 7821–7828. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1697-04.2004.
- Mathews, G.C, Diamond, J.S. (2003). “Neuronal glutamate uptake Contributes to GABA synthesis and inhibitory synaptic strength.” *J. Neurosci.*, 23(6):2040-2048. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-06-02040.2003
- Mattson, M.P., Meffert, M.K. (2006). Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ.*, 13(5):852-60. doi: 10.1038/sj.cdd.4401837.
- McMillin, M., Frampton, G., Thompson, M., Galindo, C., Standeford, H., Whittington, E., Alpini, G., DeMorrow, S. (2014). Neuronal CCL2 is upregulated during hepatic encephalopathy and contributes to microglia activation and neurological decline. *J. Neuroinflammation*, 11:121. doi: 10.1186/1742-2094-11-121.
- Mechtcheriakov, S., Graziadei, I.W., Kugener, A., Schuster, I., Mueller, J., Hinterhuber, H., Vogel, W. and Marksteiner, J. (2006). Motor dysfunction in patients with liver cirrhosis: impairment of handwriting. *J. Neurol.*, 253(3):349-56. doi: 10.1007/s00415-005-0995-5.
- Méndez, M., Méndez-López, M., López, L., Aller, M.A., Arias, J., Cimadevilla, J.M., Arias, J.L. (2008a). Spatial memory alterations in three models of hepatic encephalopathy. *Behav. Brain Res.*, 188(1):32-40. doi: 10.1016/j.bbr.2007.10.019.
- Méndez, M., Méndez-López, M., López, L., Aller, M.A., Arias, J., and Arias, J.L. (2008b). Working memory impairment and reduced hippocampal and prefrontal cortex c-Fos expression in a rat model of cirrhosis. *Physiol. Behav.*, 95, 302–307.

- Merrill A. H., Jr (2011). Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chemical reviews*, 111(10):6387–6422. doi:10.1021/cr2002917
- Michalak, A., and Butterworth, R.F. (1997). Ornithine transcarbamylase deficiency: pathogenesis of the cerebral disorder and new prospects for therapy. *Metab. Brain Dis.*, 12(3):171-182.
- Miñana, M.D., Felipo, V., Grisolia, S. (1988a). Protective effect of long term ammonium ingestion against acute ammonium intoxication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 153(3):979–983. doi: 10.1016/s0006-291x(88)81324-x.
- Miñana, M.D., Felipo, V., Wallace, R., Grisolia, S. (1988b). High ammonia levels in brain induce tubulin in cerebrum but not in cerebellum. *J. Neurochem.*, 51(6):1839–1842. doi: 10.1111/j.1471-4159.1988.tb01165.x.
- Mínguez, B., García -Pagán, J.C., Bosch, J., Turnes, J., Alonso, J., Rovira, A., Córdoba, J. (2006). Noncirrhotic portal vein thrombosis exhibits neuropsychological and MR changes consistent with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 43(4):707–714. doi: 10.1002/hep.21126.
- Minichiello, L. (2009). TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat. Rev. Neurosci.*, 10(12):850-60. doi: 10.1038/nrn2738.
- Mizoguchi, Y., Kanematsu, T., Hirata, M., Nabekura, J. (2003). A rapid increase in the total number of cell surface functional GABAA receptors induced by brain-derived neurotrophic factor in rat visual cortex. *J. Biol. Chem.*, 278(45): 44097-102. doi: 10.1074/jbc.M305872200.
- Monfort, P., Erceg, S., Piedrafita, B., Llansola, M., Felipo, V. (2007). Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability. *Eur. J. Neurosci.*, 25(7):2103–2111. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05444.x.
- Monfort, P., Felipo, V. (2010). Amyloid- β impairs, and ibuprofen restores, the cGMP pathway, synaptic expression of AMPA receptors and long-term potentiation in the hippocampus. *J. Alzheimers Dis.*, 22(3):795-809. doi: 10.3233/JAD-2010-101092.
- Monfort, P., Kosenko, E., Erceg, S., Canales, J.J., Felipo, V. (2002a). Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA receptors. *Neurochem. Int.*, 41(2-3):95-102. doi: 10.1016/s0197-0186(02)00029-3.
- Monfort, P., Muñoz, M.D., Felipo, V. (2005). Molecular mechanisms of the alterations in NMDA receptor-dependent long-term potentiation in hyperammonemia. *Metab. Brain Dis.*, 20(4):265-74. doi: 10.1007/s11011-005-7905-5.
- Monfort, P., Muñoz, M.D., Kosenko, E., Felipo, V. (2002b). Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase, and cGMP-

- degrading phosphodiesterase. *J. Neurosci.*, 22(23):10116-22. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-23-10116.2002.
- Montoliu, C., Llansola, M., Felipo, V. (2015). Neuroinflammation and neurological alterations in chronic liver diseases. *Neuroimmunol. Neuroinflamm.*, 2:138–44. doi: 10.4103/2347-8659.160845.
- Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M., Del Olmo, J.A., Urios, A., Rodrigo, J.M., Felipo, V. (2009). IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *J. Clin. Gastroenterol.*, 43(3):272-279. doi: 10.1097/MCG.0b013e31815e7f58.
- Montoliu, C., Rodrigo, R., Monfort, P., Llansola, M., Cauli, O., Boix, J., Elmlili, N., Agusti, A., Felipo, V. (2010). Cyclic GMP pathways in hepatic encephalopathy. Neurological and therapeutic implications. *Metab. Brain Dis.*, 25(1):39-48. doi: 10.1007/s11011-010-9184-z.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B. Seeburg, P.H. (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12(3):529-540. doi: 10.1016/0896-6273(94)90210-0.
- Moser, H. (1987). Electrophysiological evidence for ammonium as a substitute for potassium in activating the sodium pump in a crayfish sensory neuron. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 65(2):141–145. doi: 10.1139/y87-028.
- Msall, M., Batshaw, M.L., Suss, R., Brusilow, S.W., and Mellits, E.D. (1984). Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. Outcome of urea-cycle enzymopathies. *N. Engl. J. Med.*, 310(23):1500-1505. doi: 10.1056/NEJM198406073102304.
- Mücke, V.T., Maria Schwarzkopf, K., Thomas, D., Mücke, M.M., Rüschenbaum, S., Trebicka, J., Pfeilschifter, J., Zeuzem, S., Lange, C.M., Grammatikos, G. (2020). Serum Sphingosine-1-Phosphate Is Decreased in Patients With Acute-on-Chronic Liver Failure and Predicts Early Mortality. *Hepatology*, 4(10):1477-1486. doi: 10.1002/hep4.1561.
- Mukherjee, J., Kretschmannova, K., Gouzer, G., Maric, H.M., Ramsden, S., Tretter, V., Harvey, K., Davies, P.A., Triller, A., Schindelin, H., Moss, S.J. (2011). The residence time of GABA(A)Rs at inhibitory synapses is determined by direct binding of the receptor $\alpha 1$ subunit to gephyrin. *J. Neurosci.*, 31(41):14677-87. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2001-11.2011.
- 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. *Neurochem. Res.*, 25: 437–41. doi: 10.1023/a:1007547622844.
- Nakamura, Y., Darnieder, L.M., Deeb, T.Z., Moss, S.J. (2014). Regulation of GABAARs by phosphorylation. *Adv. Pharmacol.*, 72:97-146. doi: 10.1016/bs.apha.2014.11.008.
- Nakamura, Y., Darnieder, L.M., Deeb, T.Z., Moss, S.J. (2015). Regulation of GABAARs by phosphorylation. *Adv. Pharmacol.*, 72:97-146. doi: 10.1016/bs.apha.2014.11.008

- Nakazawa, T., Komai, S., Watabe, A.M., Kiyama, Y., Fukaya, M., Arima-Yoshida, F., Horai, R., Sudo, K., Ebine, K., Delawary, M., Goto, J., Umemori, H., Tezuka, T., Iwakura, Y., Watanabe, M., Yamamoto, T., Manabe, T. (2006). NR2B tyrosine phosphorylation modulates fear learning as well as amygdaloid synaptic plasticity. *EMBO J.*, 25(12): 2867-77.
- Neher, E. (1998). Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron*, 20(3):389-99. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80983-6.
- Ng, K.L., Yap, N.Y., Rajandram, R., Small, D., Pailoor, J., Ong, T.A., Razack, A.H., Wood, S.T., Morais, C., Gobe, G.C. (2018). Nuclear factor-kappa B subunits and their prognostic cancer-specific survival value in renal cell carcinoma patients. *Pathology*, 50(5):511-518. doi: 10.1016/j.pathol.2018.03.003.
- Norenberg, M.D. (1987). The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochem. Pathol.*, 6(1-2), 13-33. doi: 10.1007/BF02833599.
- Norenberg, M.D., Martinez-Hernandez, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.*, 161(2):303-310. doi: 10.1016/0006-8993(79)90071-4.
- Nusser, Z., Hájos, N., Somogyi, P., Mody, I. (1998). Increased number of synaptic GABA(A) receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature*, 395(6698): 172-177. doi: 10.1038/25999.
- Obinata, H., Hla, T. (2019). Sphingosine 1-phosphate and inflammation. *Int. Immunol.*, 31(9):617-625. doi: 10.1093/intimm/dxz037.
- Olsen, R.W. and Sieghart, W. (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol. Rev.*, 60(3):243-260. doi: 10.1124/pr.108.00505
- Palasz, E., Wysocka, A., Gasiorowska, A., Chalimoniuk, M., Niewiadomski, W., Niewiadomska, G. (2020). BDNF as a Promising Therapeutic Agent in Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(3):1170. doi: 10.3390/ijms21031170.
- Panja, D., Kenney, J.W., D'Andrea, L., Zalfa, F., Vedeler, A., Wibrand, K., Fukunaga, R., Bagni, C., Proud, C.G., Bramham, C.R. (2014). Two-stage translational control of dentate gyrus LTP consolidation is mediated by sustained BDNF-TrkB signaling to MNK. *Cell Rep.*, 9(4):1430-45. doi: 10.1016/j.celrep.2014.10.016.
- Papouin P., Ladépêche L., Ruel J., Sacchi S., Labasque M., Hanini M., Groc L., Pollegioni L., Mothet J.P. Olié S.H. (2012). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell*, 150(3):633-646.
- Parry, G.C., Martin, T., Felts, K.A., Cobb, R.R. (1998). IL-1beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in endothelial cells is blocked by proteasome inhibitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18(6):934-40. doi: 10.1161/01.atv.18.6.934.

- Paul, F., Müller, J., Christe, W., Steinmüller, T., Poewe, W., Wissel, J. (2004). Postural hand tremor before and following liver transplantation and immunosuppression with cyclosporine or tacrolimus in patients without clinical signs of hepatic encephalopathy. *Clin. Transplant.*, 18(4): 429-33. doi: 10.1111/j.1399-0012.2004.00184.x.
- Pawson, T., Nash, P. (2000). Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev.*, 14(9):1027-47.
- Paxinos, G. Watson, C. (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th Edition, Academic Press, San Diego.
- Pébay, A., Toutant, M., Prémont, J., Calvo, C.F., Venance, L., Cordier, J., Glowinski, J., Tencé, M. (2001). Sphingosine-1-phosphate induces proliferation of astrocytes: regulation by intracellular signalling cascades. *Eur. J. Neurosci.*, 13(12):2067-76.
- Porcher, C., Medina, I., Gaiarsa, J.L. (2018). Mechanism of BDNF Modulation in GABAergic Synaptic Transmission in Healthy and Disease Brains. *Front. Cell Neurosci.*, 12:273. doi: 10.3389/fncel.2018.00273.
- Prasad, S., Dhiman, R.K., Duseja, A., Chawla, Y.K., Sharma, A., Agarwal, R. (2007). Lactulose improves cognitive functions and health-related quality of life in patients with cirrhosis who have minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology.*, 45(3):549–559. doi: 10.1002/hep.21533.
- Prius-Mengual, J., Pérez-Rodríguez, M., Andrade-Talavera, Y., Rodríguez-Moreno, A. (2018). NMDA Receptors Containing GluN2B/2C/2D Subunits Mediate an Increase in Glutamate Release at Hippocampal CA3-CA1 Synapses. *Mol. Neurobiol.*, 56(3): 1694-1706. doi: 10.1007/s12035-018-1187-5.
- Puca, F.M., Antonaci, F., Panella, C., Guglielmi, F.W., Barone, M., Francavilla, A., Cerutti, R. (1989). Psychomotor dysfunctions in alcoholic and post -necrotic cirrhotic patients without overt encephalopathy. *Acta Neurol. Scand.*, 79:280–287.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.S., McNamara, J.O., and White, L.E. (2014). *Neuroscience*, 2008. De Boeck, Sinauer, Sunderland, Mass.
- Qiao, L.Y., Yu, S.J., Kay, J.C., Xia, C.M. (2013). In vivo regulation of brain-derived neurotrophic factor in dorsal root ganglia is mediated by nerve growth factor-triggered Akt activation during cystitis. *PLoS One*, 8(11):e81547. doi: 10.1371/journal.pone.0081547.
- Quick, M.W., Hu, J., Wang, D., Zhang, H.Y. (2004). Regulation of a gamma-aminobutyric acid transporter by reciprocal tyrosine and serine phosphorylation. *J. Biol Chem.*, 279(16):15961-7. doi: 10.1074/jbc.M306924200.
- Raabe, W. (1993). Effects of hyperammonemia on neuronal function: NH₄⁺, IPSP and Cl⁻-extrusion. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 341:71-82. doi: 10.1007/978-1-4615-2484-7_7.
- Raftery, G., He, J., Pearce, R., Birchall, D., Newton, J. L., Blamire, A. M., Isaacs, J. D. (2012). Disease activity and cognition in rheumatoid arthritis: an open label pilot study. *Arthritis research & therapy*, 14(6):R263. doi: 10.1186/ar4108

- Ramirez, M., Fernandez, R., Malnic, G. (1999). Permeation of NH₃/NH₄⁺ and cell pH in colonic crypts of the rat. *Pflugers Arch.*, 438(4):508–515. doi: 10.1007/s004249900077.
- Raslau, F.D., Mark, I.T., Klein, A.P., Ulmer, J.L., Mathews, V., Mark, L.P. (2015). Memory part 2: the role of the medial temporal lobe. *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, 36(5):846-9. doi: 10.3174/ajnr.A4169.
- Regehr, W.G. (2012). Short-term presynaptic plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 4, a005702.
- Rehnström, S., Simert, G., Hansson, J.A., Johnson, G., Vang, J. (1977). Chronic hepatic encephalopathy. A psychometrical study. *Scand J Gastroenterol.*, 12(3):305–311. doi: 10.3109/00365527709180932.
- Reichardt, L.F., Fariñas, I. (1997). Neurotrophic factors and their receptors. Roles in neuronal development and function. In: Cowan WM, Jessell TM, Zipursky SL, editors. *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. New York: Oxford Univ. Press; pp. 220–63.
- Rivera, C., Li, H., Thomas-Crusells, J., Lahtinen, H., Viitanen, T., Nanobashvili, A., Kokaia, Z., Airaksinen, M.S., Voipio, J., Kaila, K., Saarma, M. (2002). BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. *J. Cell Biol.*, 159(5):747-52. doi: 10.1083/jcb.200209011.
- Roberts, D.S., Hu, Y., Lund, I.V., Brooks-Kayal, A.R., Russek, S.J. (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced synthesis of early growth response factor 3 (Egr3) controls the levels of type A GABA receptor alpha 4 subunits in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.*, 281(40):29431-5. doi: 10.1074/jbc.C600167200.
- Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez-Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Garcia -Verdugo, J.M., Felipo, V. (2010). Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, 139(2):675-684. doi: 10.1053/j.gastro.2010.03.040.
- Rodrigo, R., Erceg, S., Rodriguez-Diaz, J., Saez-Valero, J., Piedrafita, B., Suarez, I., Felipo, V. (2007). Glutamate-induced activation of nitric oxide synthase is impaired in cerebral cortex in vivo in rats with chronic liver failure. *J. Neurochem.*, 102(1):51–64. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04446.x. Epub 2007 Feb 5.
- Rodrigo, R., Jover, R., Candela, A., Compan, A., Saez-Valero, J., Erceg, S. and Felipo, V. (2005). Bile duct ligation plus hyperammonemia in rats reproduces the alterations in the modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in brain of cirrhotic patients. *Neuroscience*, 130(2):435-443. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.09.027.
- Rodríguez-Moreno, A., Paulsen, O. (2008). Spike timing-dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors. *Nat. Neurosci.*, 11(7):744-745. doi: 10.1038/nm.2125.

- Rothhammer, V., Kenison, J.E., Tjon, E., Takenaka, M.C., de Lima, K.A., Borucki, D. M., Chao, C.C., Wilz, A., Blain, M., Healy, L., Antel, J., Quintana, F.J. (2017). Sphingosine 1-phosphate receptor modulation suppresses pathogenic astrocyte activation and chronic progressive CNS inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(8):2012-2017. doi: 10.1073/pnas.1615413114.
- Roughneen, P.T., Gouma, D.J., Kulkarni, A.D., Fanslow, W.F., Rowlands, B.J. (1986). Impaired specific cell-mediated immunity in experimental biliary obstruction and its reversibility by internal biliary drainage. *J. Surg. Res.*, 41(2):113–125. doi: 10.1016/0022-4804(86)90016-8.
- Rutten, K., Prickaerts, J., Hendrix, M., van der Staay, F.J., Sik, A., Blokland, A. (2007). Time-dependent involvement of cAMP and cGMP in consolidation of object memory: studies using selective phosphodiesterase type 2, 4 and 5 inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.*, 2558(1-3):107-12. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.11.041.
- Salonen, V., Kallinen, S., Lopez-Picon, F.R., Korpi, E.R., Holopainen, I.E., Uusi-Oukari, M. (2006). AMPA/kainate receptor-mediated up-regulation of GABAA receptor delta subunit mRNA expression in cultured rat cerebellar granule cells is dependent on NMDA receptor activation. *Brain Res.*, 1087(1): 33–40. doi: 10.1016/j.brainres.2006.02.104.
- Sánchez-Huertas, C., Rico, B. (2011). CREB-Dependent Regulation of GAD65 Transcription by BDNF/TrkB in Cortical Interneurons. *Cereb. Cortex*, 21(4):777-88. doi: 10.1093/cercor/bhq150.
- Sanderson, J.L., Gorski, J.A., Dell'Acqua, M.L. (2016). NMDA receptor-dependent LTD requires transient synaptic incorporation of Ca(2)(+)-permeable AMPARs mediated by AKAP150-anchored PKA and calcineurin. *Neuron*, 89: 1000–1015. doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.043.
- Sapkota, A., Gaire, B.P., Kang, M.G., Choi, J.W. (2019). S1P2 contributes to microglial activation and M1 polarization following cerebral ischemia through ERK1/2 and JNK. *Sci. Rep.*, 9(1):12106. doi: 10.1038/s41598-019-48609-z.
- Sassoè-Pognetto, M., Fritschy, J.M. (2000). Mini-review: gephyrin, a major postsynaptic protein of GABAergic synapses. *Eur. J. Neurosci.*, 12(7):2205-10. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00106.x.
- Sassoè-Pognetto, M., Kirsch, J., Grünert, U., Greferath, U., Fritschy, J.M., Möhler, H., Betz, H., Wässle, H. (1995). Colocalization of gephyrin and GABAA-receptor subunits in the rat retina. *J. Comp. Neurol.*, 357(1):1-14. doi: 10.1002/cne.903570102.
- Schafer, D.F., Jones, E.A. (1982). Hepatic encephalopathy and the gamma-aminobutyric-acid neurotransmitter system. *Lancet*, 1(8262): 18-20. doi: 10.1016/s0140-6736(82)92559-4.
- Schomerus, H., Hamster, W. (2001). Quality of life in cirrhotics with minimal hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.*, 16(1-2): 37–41. doi: 10.1023/a:1011610427843.
- Serantes, R., Arnalich, F., Figueroa, M., Salinas, M., Andrés-Mateos, E., Codoceo, R., Renart, J., Matute, C., Cavada, C., Cuadrado, A., Montiel, C. (2006). Interleukin-1beta enhances GABAA receptor cell-surface

expression by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: relevance to sepsis-associated encephalopathy. *J. Biol. Chem.*, 281(21):14632-43. doi: 10.1074/jbc.M512489200.

Shabani, M., Ebrahimipoor, F., Firouzjaei, M.A., Kamali, L., Shid Moosavi, S.M., Noorafshan, A., Haghani, M. (2019). Modulation of sphingosine-1-phosphate receptor by FTY720 contributes in improvement of hepatic encephalopathy induced by bile duct ligation. *Brain Res. Bull.*, 146:253-269. doi: 10.1016/j.brainresbull.2019.01.012.

Sharma, B.C., Sharma, P., Lunia, M.K., Srivastava, S., Goyal, R., Sarin, S.K. (2013). A randomized, double-blind, controlled trial comparing rifaximin plus lactulose with lactulose alone in treatment of overt hepatic encephalopathy. *Am. J. Gastroenterol.*, 108(9):1458–63. doi: 10.1038/ajg.2013.219.

Shawcross, D.L., Davies, N.A., Williams, R., Jalan, R. (2004). Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J. Hepatol.*, 40:247-254. doi: 10.1016/j.jhep.2003.10.016.

Shawcross, D.L., Wright, G., Olde Damink, S.W., Jalan, R. (2007). Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.*, 22(1):125–38.

Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L.A., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (1994). Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature*, 368: 144–147. doi: 10.1038/368144a0.

Shinohara, Y., Hirase, H., Watanabe, M., Itakura, M., Takahashi, M., Shigemoto, R. (2008). Left-right asymmetry of the hippocampal synapses with differential subunit allocation of glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105(49):19498-19503. doi: 10.1073/pnas.0807461105.

Sigel, E., Steinmann, M.E. (2012). Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. *J. Biol. Chem.*, 287(48):40224-31. doi: 10.1074/jbc.R112.386664.

Singh, S., and Trigun, S.K. (2014). Low grade cirrhosis induces cognitive impairment and motor dysfunction in rats: could be a model for minimal hepatic encephalopathy. *Neurosci. Lett.*, 559:136–140. doi: 10.1016/j.neulet.2013.11.058. Epub 2013 Dec 12.

Skoura, A., Michaud, J., Im, D. S., Thangada, S., Xiong, Y., Smith, J. D., Hla, T. (2011). Sphingosine-1-phosphate receptor-2 function in myeloid cells regulates vascular inflammation and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 31(1):81-5. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.213496.

Słowik, A., Ciecćko-Michalska, I., Bogdał, J., Szczudlik, A. (2001). [The diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy]. *Prz. Lek.*, 58, 1059–1062.

Snider, R.M., McKinney, M., Forray, C., Richelson, E. (1984). Neurotransmitter receptors mediate cyclic GMP formation by involvement of arachidonic acid and lipoxigenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 81(12):3905-9. doi: 10.1073/pnas.81.12.3905.

- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.*, 119(1):7-35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8.
- Spahr, L., Butterworth, R.F., Fontaine, S., Bui, L., Therrien, G., Milette, P.C., Lebrun, L.H., Zayed, J., Leblanc, A. Pomier-Layrargues, G. (1996). Increased blood manganese in cirrhotic patients: relationship to pallidal magnetic resonance signal hyperintensity and neurological symptoms. *Hepatology*, 24(5):1116-1120. doi: 10.1002/hep.510240523.
- Spiegel, S., Milstien, S. (2011). The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 11(6):403-15. doi: 10.1038/nri2974.
- Srinivasan, D., Yen, J.H., Joseph, D.J., Friedman, W. (2004). Cell type-specific interleukin-1beta signaling in the CNS. *J. Neurosci.*, 24(29):6482-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5712-03.2004.
- Steindl, P.E., Coy, D.L., Finn, B., Zee, P.C., Blei, A.T. (1996). A low-protein diet ameliorates disrupted diurnal locomotor activity in rats after portacaval anastomosis. *Am. J. Physiol.*, 271:G555-560. doi: 10.1152/ajpgi.1996.271.4.G555.
- Stevens, C.F., Wang, Y. (1993). Reversal of long-term potentiation by inhibitors of haem oxygenase. *Nature*, 364(6433):147-9. doi: 10.1038/364147a0.
- Studer, R., von Boehmer, L., Haenggi, T., Schweizer, C., Benke, D., Rudolph, U., Fritschy, J.M. (2006). Alteration of GABAergic synapses and gephyrin clusters in the thalamic reticular nucleus of GABA α receptor α 3 subunit-null mice. *Eur. J. Neurosci.*, 24(5):1307-15. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05006.x.
- Sutton, M.A., Ito, H.T., Cressy, P., Kempf, C., Woo, J.C., Schuman, E.M. (2006). Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis. *Cell*, 125(4): 785-799. doi: 10.1016/j.cell.2006.03.040.
- Takehara, K., Kawahara, S., Munemoto, Y., Kuriyama, H., Mori, H., Mishina, M., Kirino, Y. (2004). The N-methyl-D-aspartate (NMDA)-type glutamate receptor GluR2 is important for delay and trace eyeblink conditioning in mice. *Neurosci. Lett.*, 364(1): 43-47. doi: 10.1016/j.neulet.2004.04.024.
- Tanaka, T., Saito, H., Matsuki, N. (1997). Inhibition of GABA α synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus. *J. Neurosci.*, (9):2959-66. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-09-02959.1997.
- Tang, Y., Schlumberger, T., Kim, T., Lueker, M. and Zucker, R.S. (2000). Effects of mobile buffers on facilitation: experimental and computational studies. *Biophys. J.*, 78(6):2735-2751. doi: 10.1016/s0006-3495(00)76819-6
- Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., Tsien, J.Z. (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, 401(6748): 63-9. doi: 10.1038/43432.

- Taoro-Gonzalez, L., Arenas, Y.M., Cabrera-Pastor, A., Felipo, V. (2019a) Extracellular cGMP Reverses Altered Membrane Expression of AMPA Receptors in Hippocampus of Hyperammonemic Rats: Underlying Mechanisms. *Mol. Neurobiol.*, 56(6): 4428-4439. doi: 10.1007/s12035-018-1387-z.
- Taoro-Gonzalez, L., Arenas, Y.M., Cabrera-Pastor, A., Felipo, V. (2018). Extracellular cGMP Reverses Altered Membrane Expression of AMPA Receptors in Hippocampus of Hyperammonemic Rats: Underlying Mechanisms. *Mol. Neurobiol.*, 56(6):4428-4439. doi: 10.1007/s12035-018-1387-z..
- Taoro-González, L., Cabrera-Pastor, A., Sancho-Alonso, M., Arenas, Y.M., Meseguer-Estornell, F., Balzano, T., ElMlili, N., Felipo, V. (2019b). Differential role of interleukin-1 β in neuroinflammation-induced impairment of spatial and nonspatial memory in hyperammonemic rats. *FASEB J.*, 33(9): 9913-9928. doi: 10.1096/fj.201900230RR.
- Terunuma, M., Xu, J., Vithlani, M., Sieghart, W., Kittler, J., Pangalos, M., Haydon, P.G., Coulter, D.A., Moss, S.J. (2008). Deficits in phosphorylation of GABA(A) receptors by intimately associated protein kinase C activity underlie compromised synaptic inhibition during status epilepticus. *J. Neurosci.*, 28(2):376-84. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4346-07.2008.
- Thiagarajan, T.C., Lindskog, M., Tsien, R.W. (2005). Adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons. *Neuron*, 47(5): 725-37. doi: 10.1016/j.neuron.2005.06.037.
- Thompson, W.L., Van Eldik, L.J. (2009). Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-3 through NF κ B and MAPK dependent pathways in rat astrocytes [corrected]. *Brain Res.*, 1287:47-57. doi: 10.1016/j.brainres.2009.06.081.
- Tian, D.S., Peng, J., Murugan, M., Feng, L.J., Liu, J.L., Eyo, U.B., Zhou, L.J., Mogilevsky, R., Wang, W., Wu, L.J. (2017). Chemokine CCL2-CCR2 Signaling Induces Neuronal Cell Death via STAT3 Activation and IL-1 β Production after Status Epilepticus. *J. Neurosci.*, 37(33):7878-7892. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0315-17.2017.
- Timmermann, L., Butz, M., Gross, J., Kircheis, G., Häussinger, D., Schnitzler, A. (2005). Neural synchronization in hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.*, 20(4):337-346. doi: 10.1007/s11011-005-7916-2. PMID: 16382344.
- Timmermann, L., Gross, J., Kircheis, G., Häussinger, D., Schnitzler, A. (2002). Cortical origin of mini-asterixis in hepatic encephalopathy. *Neurology*, 58(2):295-8. doi: 10.1212/wnl.58.2.295. PMID: 11805261.
- Tjalkens, R.B., Popichak, K.A., Kirkley, K.A. (2017). Inflammatory Activation of Microglia and Astrocytes in Manganese Neurotoxicity. *Adv. Neurobiol.*, 18:159-181. doi: 10.1007/978-3-319-60189-2_8.
- Touyz, R.M., Picard, S., Schiffrin, E.L., Deschepper, C.F. (1997). Cyclic GMP inhibits a pharmacologically distinct Na⁺/H⁺ exchanger variant in cultured rat astrocytes via an extracellular site of action. *J. Neurochem.*, 68(4):1451-61. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.68041451.x.

- Tovar, K.R., Westbrook, G.L. (1999). The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J. Neurosci.*, 19(10): 4180–4188. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-10-04180.1999.
- Toyomitsu, E., Tsuda, M., Yamashita, T., Tozaki-Saitoh, H., Tanaka, Y., Inoue, K. (2012). CCL2 promotes P2X4 receptor trafficking to the cell surface of microglia. *Purinergic Signal*, 8(2):301-10. doi: 10.1007/s11302-011-9288-x.
- Trang, T., Beggs, S., Salter, M.W. (2012). Brain-derived neurotrophic factor from microglia: a molecular substrate for neuropathic pain. *Neuron Glia Biol.*, 7(1):99-108. doi: 10.1017/S1740925X12000087.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*, 62(3):405–496. doi: 10.1124/pr.109.002451.
- Tretter, V., Jacob, T.C., Mukherjee, J., Fritschy, J.M., Pangalos, M.N., Moss, S.J. (2008). The clustering of GABA(A) receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the direct binding of receptor alpha 2 subunits to gephyrin. *J. Neurosci.*, 28(6):1356-65. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5050-07.2008.
- Tretter, V., Kerschner, B., Milenkovic, I., Ramsden, S.L., Ramerstorfer, J., Saiepour, L., Maric, H.M., Moss, S.J., Schindelin, H., Harvey, R.J., Sieghart, W., Harvey, K. (2011). Molecular basis of the γ -aminobutyric acid A receptor $\alpha 3$ subunit interaction with the clustering protein gephyrin. *J. Biol. Chem.*, 286(43):37702-11. doi: 10.1074/jbc.M111.291336.
- Tsakiri, N., Kimber, I., Rothwell, N.J., Pinteaux, E. (2008a). Differential effects of interleukin-1 alpha and beta on interleukin-6 and chemokine synthesis in neurones. *Mol. Cell Neurosci.*, 38(2):259-65. doi: 10.1016/j.mcn.2008.02.015.
- Tsakiri, N., Kimber, I., Rothwell, N.J., Pinteaux, E. (2008b). Interleukin-1-induced interleukin-6 synthesis is mediated by the neutral sphingomyelinase/Src kinase pathway in neurones. *Br. J. Pharmacol.*, 153(4):775-83. doi: 10.1038/sj.bjp.0707610.
- Turrigiano, G.G. (2008). The Self-Tuning Neuron: Synaptic Scaling of Excitatory Synapses. *Cell*, 135(3):422–435. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.008
- Ulbrich MH, Isacoff EY. (2008). Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 105(37):14163-14168. doi: 10.1073/pnas.0802075105.
- Uribe, M., Márquez, M.A., García-Ramos, G., Escobedo, V., Murillo, H., Guevara, L. Lisker, R. (1980). Treatment of chronic portal-systemic encephalopathy with lactose in lactase-deficient patients. *Dig. Dis. Sci.*, 25(12):924-8. doi: 10.1007/BF01308043.
- VanDongen, A. (2009). *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton: CRC Press
- Vaz, S. H., Jørgensen, T. N., Cristóvão-Ferreira, S., Dufлот, S., Ribeiro, J. A., Gether, U., Sebastião, A. M. (2011). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) enhances GABA transport by modulating the trafficking

- of GABA transporter-1 (GAT-1) from the plasma membrane of rat cortical astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 286(47):40464-76. doi: 10.1074/jbc.M111.232009.
- Vaz, S.H., Cristóvão-Ferreira, S., Ribeiro, J.A., Sebastião, A.M. (2008). Brain-derived neurotrophic factor inhibits GABA uptake by the rat hippocampal nerve terminals. *Brain Res.* 1219:19-25. doi: 10.1016/j.brainres.2008.04.008.
- Vaz, S.H., Jørgensen, T.N., Cristóvão-Ferreira, S., Dufлот, S., Ribeiro, J.A., Gether, U., Sebastião, A.M. (2011). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) enhances GABA transport by modulating the trafficking of GABA transporter-1 (GAT-1) from the plasma membrane of rat cortical astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 286(47):40464-76. doi: 10.1074/jbc.M111.232009.
- Vereker, E., O'Donnell, E., Lynch, M.A. (2000). The inhibitory effect of interleukin-1beta on long-term potentiation is coupled with increased activity of stress-activated protein kinases. *J. Neurosci.*, 20(18):6811-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-18-06811.2000.
- Verma, A., Hirsch, D.J., Glatt, C.E., Ronnett, G.V., Snyder, S.H. (1993). Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science*, 259(5093):381-4. doi: 10.1126/science.7678352.
- Vicini, S., Wang, J.F., Li, J.H., Zhu, W.J., Wang, Y.H., Luo, J.H., Wolfe, B.B., Grayson, D.R. (1998). Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurophysiol.*, 79(2): 555–566. doi: 10.1152/jn.1998.79.2.555.
- Vithlani, M., Moss, S.J. (2009). The role of GABAAR phosphorylation in the construction of inhibitory synapses and the efficacy of neuronal inhibition. *Biochem. Soci. Trans.*, 37(Pt 6): 1355–1358. doi:10.1042/BST0371355
- Vithlani, M., Terunuma, M., and Moss, S.J. (2011). The dynamic modulation of GABA(A) receptor trafficking and its role in regulating the plasticity of inhibitory synapses. *Physiol. Rev.*, 91(3):1009–1022. doi: 10.1152/physrev.00015.2010.
- Viviani, B., Gardoni, F., Bartesaghi, S., Corsini, E., Facchi, A., Galli, C.L., Di Luca, M., Marinovich, M. (2006). Interleukin-1 beta released by gp120 drives neural death through tyrosine phosphorylation and trafficking of NMDA receptors. *J. Biol. Chem.*, 281(40):30212-22. doi: 10.1074/jbc.M602156200.
- Wang, C., Shimizu-Okabe, C., Watanabe, K., Okabe, A., Matsuzaki, H., Ogawa, T., Mori, N., Fukuda, A., Sato, K. (2002). Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 139(1): 59-66. doi: 10.1016/s0165-3806(02)00536-9.
- Wang, D., Quick, M.W. (2005). Trafficking of the plasma membrane gamma-aminobutyric acid transporter GAT1. Size and rates of an acutely recycling pool. *J. Biol. Chem.*, 280(19):18703-9. doi: 10.1074/jbc.M500381200.

- Wang, W., Jia, Y., Pham, D.T., Palmer, L.C., Jung, K.M., Cox, C.D., Rumbaugh, G., Piomelli, D., Gall, C.M. and Lynch, G. (2018). Atypical Endocannabinoid Signaling Initiates a New Form of Memory-Related Plasticity at a Cortical Input to Hippocampus. *Cerebral cortex* (New York, N.Y.: 1991). 28, 2253–2266.
- Wang, W., Xiang, P., Chew, W.S., Torta, F., Bandla, A., Lopez, V., Seow, W.L., Lam, B.W.S., Chang, J.K., Wong, P., Chayaburakul, K., Ong, W.Y., Wenk, M.R., Sundar, R., Herr, D.R. (2020). Activation of sphingosine 1-phosphate receptor 2 attenuates chemotherapy-induced neuropathy. *J. Biol. Chem.*, 295(4):1143-1152. doi: 10.1074/jbc.RA119.011699.
- Wardle, R.A., Poo, M.M. (2003). Brain-derived neurotrophic factor modulation of GABAergic synapses by postsynaptic regulation of chloride transport. *J. Neurosci.*, 23(25):8722-32. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-25-08722.2003.
- Weber, M., Hartmann, A.-M., Beyer, T., Ripperger, A., Nothwang, H.G. (2014). A novel regulatory locus of phosphorylation in the C-terminus of the potassium chloride cotransporter KCC2 that interferes with N-ethylmaleimide or staurosporine mediated activation. *J. Biol. Chem.* 289:18668–18679. doi: 10.1074/jbc.M114.567834
- Weiner, I.D. (2004). The Rh gene family and renal ammonium transport. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 13(5):533–540. doi: 10.1097/00041552-200409000-00009.
- Weissenborn, K., Bokemeyer, M., Krause, J., Ennen, J., Ahl, B. (2005a). Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease. *AIDS 19 Suppl.*, 3: S93-98. doi: 10.1097/01.aids.0000192076.03443.6d
- Weissenborn, K., Ennen, J.C., Schomerus, H., Rückert, N., Hecker, H. (2001). Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J. Hepatol.*, 34(5):768–773. doi: 10.1016/s0168-8278(01)00026-5.
- Weissenborn, K., Giewekemeyer, K., Heidenreich, S., Bokemeyer, M., Berding, G., Ahl, B. (2005b). Attention, memory, and cognitive function in hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.*, 20: 359–367. doi: 10.1007/s11011-005-7919-z.
- Weissenborn, K., Heidenreich, S., Giewekemeyer, K., Rückert, N., and Hecker, H. (2003). Memory function in early hepatic encephalopathy. *J. Hepatol.*, 39(3):320–325. doi: 10.1016/s0168-8278(03)00295-2.
- Wenthold, R.J., Petralia, R.S., Blahos, J.I.I., Niedzielski, A.S. (1996). Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J. Neurosci.*, 16: 1982–1989. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-06-01982.1996.
- Whiting, P.J. (2003). GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov. Today*, 8(10):445–450. doi: 10.1016/s1359-6446(03)02703-x.

- Whitworth, T.L., Quick, M.W. (2001). Substrate-induced regulation of gamma-aminobutyric acid transporter trafficking requires tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 276(46):42932-7. doi: 10.1074/jbc.M107638200.
- Williams, S., Johnston, D. (1989). Long-term potentiation of hippocampal mossy fiber synapses is blocked by postsynaptic injection of calcium chelators. *Neuron*, 3(5):583-8. doi: 10.1016/0896-6273(89)90268-7.
- Winsky-Sommerer, R., Knapman, A., Fedele, D. E., Schofield, C. M., Vyazovskiy, V. V., Rudolph, U., Huguenard, J. R., Fritschy, J. M., Tobler, I. (2008). Normal sleep homeostasis and lack of epilepsy phenotype in GABA A receptor alpha3 subunit-knockout mice. *Neuroscience*, 154(2):595-605. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.081.
- Wojcicki, M., Haagsma, E.B., Gouw, A.S.H., Slooff, M.J.H., Porte, R.J. (2004). Orthotopic liver transplantation for portosystemic encephalopathy in an adult with congenital absence of the portal vein. *Liver Transpl.*, 10(9): 1203–1207. doi: 10.1002/lt.20170
- Wu, X.S., Lee, S.H., Sheng, J., Zhang, Z., Zhao, W. D., Wang, D., Jin, Y., Charnay, P., Ervasti, J.M. Wu, L.G. (2016). Actin Is Crucial for All Kinetically Distinguishable Forms of Endocytosis at Synapses. *Neuron*, 92:1020–1035. doi: 10.1016/j.neuron.2016.10.014.
- Wu, Y.P., Mizugishi, K., Bektas, M., Sandhoff, R., Proia, R.L. (2008). Sphingosine kinase 1/S1P receptor signaling axis controls glial proliferation in mice with Sandhoff disease. *Hum. Mol. Genet.*, 17(15):2257-64. doi: 10.1093/hmg/ddn126.
- Xin, W.K., Kwan, C.L., Zhao, X.H., Xu, J., Ellen, R.P., McCulloch, C.A., Yu, X.M. (2005). A functional interaction of sodium and calcium in the regulation of NMDA receptor activity by remote NMDA receptors. *J. Neurosci.*, 25(1): 139–148. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3791-04.2005.
- Yachha, S.K., Khanduri, A., Sharma, B.C., Kumar, M. (1996). Gastrointestinal bleeding in children. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 11:903–907. doi: 10.3748/wjg.v23.i8.1328
- Yadav, S.K., Srivastava, A., Srivastava, A., Thomas, M.A., Agarwal, J., Pandey, C.M., Lal, R., Yachha, S.K., Saraswat, V.A., Gupta, R.K. (2010). Encephalopathy assessment in children with extra -hepatic portal vein obstruction with MR, psychometry and critical flicker frequency. *J. Hepatol.*, 52:348–354.
- Yamada, M.K., Nakanishi, K., Ohba, S., Nakamura, T., Ikegaya, Y., Nishiyama, N., Matsuki, N. (2002). Brain-derived neurotrophic factor promotes the maturation of GABAergic mechanisms in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 22(17):7580–7585. doi: 10.1074/jbc.M910283199.
- Yen, C.L., Liaw, Y.F. (1990). Somatosensory evoked potentials and number connection test in the detection of subclinical hepatic encephalopathy. *Hepatogastroenterology*, 37(3): 332–334.
- Ymer, S., Schofield, P.R., Draguhn, A., Werner, P., Köhler, M. and Seeburg, P.H. (1989). GABAA receptor beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNAs. *EMBO J.*, 8(6):1665–1670.

- Yu, J., Francisco, A.M.C., Patel, B.G., Cline, J.M., Zou, E., Berga, S.L., Taylor, R.N. (2018). IL-1 β Stimulates Brain-Derived Neurotrophic Factor Production in Eutopic Endometriosis Stromal Cell Cultures: A Model for Cytokine Regulation of Neuroangiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 188(10):2281-2292. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.06.011.
- Zafra, F., Lindholm, D., Castrén, E., Hartikka, J., Thoenen, H. (1992). Regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes. *J. Neurosci.*, 12(12):4793-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.12-12-04793.1992.
- Zhang, G., Yang, L., Kim, G.S., Ryan, K., Lu, S., O'Donnell, R.K., Spokes, K., Shapiro, N., Aird, W.C., Kluk, M.J., Yano, K., Sanchez, T. (2013). Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) in acute vascular inflammation. *Blood*, 122(3):443-55. doi: 10.1182/blood-2012-11-467191.
- Zhang, J.C., Wu, J., Fujita, Y., Yao, W., Ren, Q., Yang, C., Li, S.X., Shirayama, Y., Hashimoto, K. (2014). Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 18(4):pyu077. doi: 10.1093/ijnp/pyu077.
- Zhang, J.M., An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *Int. Anesthesiol. Clin.*, 45(2):27-37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e.
- Zhang, L., Tan, J., Jiang, X., Qian, W., Yang, T., Sun, X., Chen, Z., Zhu, Q. (2017). Neuron-derived CCL2 contributes to microglia activation and neurological decline in hepatic encephalopathy. *Biol. Res.*, 50(1):26. doi: 10.1186/s40659-017-0130-y.
- Zhang, S., Zhou, J., Zhang, Y., Liu, T., Friedel, P., Zhuo, W., Somasekharan, S., Roy, K., Zhang, L., Liu, Y., Meng, X., Deng, H., Zeng, W., Li, G., Forbush, B., Yang, M. (2021). The structural basis of function and regulation of neuronal cotransporters NKCC1 and KCC2. *Commun. Biol.*, 4(1):226. doi: 10.1038/s42003-021-01750-w.
- Zhu, L., Polley, N., Mathews, G.C., Delpire, E. (2008). NKCC1 and KCC2 prevent hyperexcitability in the mouse hippocampus. *Epilepsy research*, 79(2-3): 201–212. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2008.02.005.
- Zhuo, M., Kandel, E.R., Hawkins, R.D. (1994). Nitric oxide and cGMP can produce either synaptic depression or potentiation depending on the frequency of presynaptic stimulation in the hippocampus. *Neuroreport*, 5(9):1033-6. doi: 10.1097/00001756-199405000-00004.
- Zhuo, M., Small, S.A., Kandel, E.R., Hawkins, R.D. (1993). Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science*, 260(5116):1946-50. doi: 10.1126/science.8100368.
- Zucker, R.S. Regehr, W.G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.*, 64:355-405. doi: 10.1146/annurev.ne.12.030189.000305. doi: 10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547.

ANEXO

MEA_LTPmeasures.

Rutina de determinación de parámetros derivados de los potenciales evocados.

```
function [data]=MEA_LTPmeasures (recording)

plotting = 0;
fs = 10000;

g = recording;

g_raw = g(15:end);
t_end = size(recording,1)/fs;

g_t = linspace(0,t_end,size(recording,1));
g_t = g_t(15:end);

d = diff(g_raw);
d = find(d>0);
d = diff(d);
d = find(d~=1);
first_peak = d(1);

g_event = g_raw(first_peak:end);
g_t = g_t(first_peak:end);

fc = 1000;

[b,a] = butter(2,fc/(fs/2));
g_filt = filter(b,a,g_event); % Filter applied in forward and backward
direction

data.event = g_event;
data.filtered = g_filt;
data.t = g_t;
```

```

% Segment
lower = min(g_filt);
n_lower = find(g_filt==lower);
higher = max(g_filt(1:n_lower));
n_higher = find(g_filt==higher);

seg = g_filt(n_higher:n_lower);
tseg = g_t(n_higher:n_lower);

%% Measures

% Peak to peak

data.peak2peak =abs(higher-lower); % mV

% Slope 10-90
segs = smooth(seg,0.5,'loess');

n10 = 1 + floor(0.1*length(seg));
n90 = 1 + floor(0.9*length(seg));

data.slope1090 = (segs(n90)-segs(n10))/(tseg(n90)-tseg(n10)); % mV/s

% Max slope
segs = smooth(seg,0.5,'loess');
d_segs = diff(segs);
data.max_slope = 10000*min(d_segs); % mv/s

% Area
data.area = sum(abs(g_event(n10:end)));

% Area epochs
basal_area = g_filt(1);
low_t = find(g_event(n10:end)<basal_area);
low_values = g_event(low_t);
high_t = find(g_event(n10:end)>=basal_area);
high_values = g_event(high_t);

```

```

data.area_low = sum(abs(low_values));
data.area_high = sum(abs(high_values));

% Delay
data.delay = 1000*g_t(n_lower); % ms

% Desensitization time ; or full delay

basal = g_filt(1);
t_delay = g_t(n_lower:end);
v_delay = g_filt(n_lower:end);

basal_times = t_delay(v_delay>=basal);

while isempty(basal_times)
    basal = basal-1e2;
    basal_times = t_delay(v_delay>=basal);
end
data.full_delay = 1000*basal_times(1);

% Desensitization area
des_seg = g_filt(n_lower:find(g_t==basal_times(1)));
data.des_area = sum(abs(des_seg));

if plotting
    plot(data.t,data.event,'color',[0.8 0.8 0.8]);
    vline([data.full_delay/1000],'b');
    vline([g_t(n_lower)],'b');

end
end

```

MEA_mean_curves

Rutina de determinación de las curvas medias de los potenciales evocados.

```

function MEA_mean_curves(channels,varargin)

% -----
% -----

% Analysis of evoked-potentials from MEA recordings
% Usage: MEA_mean_curves(channels)
%       Input:      'AMPA-NMDA',
%                   'GABA'
%       Example: MEA_mean_curves('AMPA-NMDA');
%                   MEA_mean_curves('GABA');

% Vicent Teruel, Lucas Taoro and Maria Sancho.
% Neuronal Circuits Lab (UV) and Neurobiology Lab (CIPF)
% november 2018
% -----
% -----

if ~isempty(varargin)
    groups = varargin{1};
    if groups(end)>16
        fprintf('\n\tNumber of curves > 16\n\n');
        return;
    end
end

if strcmpi('AMPA',channels) || strcmpi('NMDA',channels) ...
    || strcmpi('GABA',channels) || strcmpi('Gly',channels)
    cd 'channel_mean_curves';
    switch channels
        case 'AMPA'
            filelist = dir('*AMPA.mat');
        case 'NMDA'
            filelist = dir('*NMDA.mat');
        case 'GABA'
            filelist = dir('*GABA.mat');
        case 'Gly'
            filelist = dir('*Gly.mat');
    end

    for m=1:length(filelist)

```

```

file = filelist(m).name;
if contains(file, 'mean')
    load(file);
    b = 'mean_curve';
    mean_curve = genvarname(b);
    eval([mean_curve '= mean_', channels, '_curve;']);

end

end

if ~isempty(varargin)

    j=1;
    for i=1:length(groups)
        if i~=length(groups)
            num_curves = groups(i+1)-groups(i);
        else
            num_curves = size(mean_curve,1)-groups(end)+1;
        end
        curve=[];
        for k=0:num_curves-1
            curve(k+1,:) = mean_curve{groups(i)+k,1};
        end
        mean_curves{j} = mean(curve);
        j=j+1;
    end

    [filepath,name,ext] = fileparts(file);
    save([name, '_groups.mat'], 'mean_curves');

end

end

```

MEA_extract_data

Rutina para la extracción de datos a partir de los parámetros de los potenciales evocados.

```
function MEA_extract_data(channels)

channel_name = [channels, '_curves'];

if strcmpi(channels, 'AMPA-NMDA'),
    if ~exist(channel_name, 'dir')
        mkdir(channel_name);
        cd(channel_name);
        mkdir('AMPA_curves');
        mkdir('NMDA_curves');
        cd ..;
    end
    folder_list = dir;
    folder_list=folder_list(~ismember({folder_list.name},{'.', '..', 'AMPA-
NMDA_curves', 'AMPA-NMDA_data'}));
    warning off MATLAB:MKDIR:DirectoryExists
    for i=1:length(folder_list)
        if folder_list(i).isdir==1
            if ~strcmpi(folder_list(i).name(1), '.') &&
~strcmpi(folder_list(i).name, channel_name)
                copyfile([folder_list(i).name, ...
'/channel_curves/*AMPA*.mat'], [channel_name, '/AMPA_curves']);
                copyfile([folder_list(i).name, ...
'/channel_curves/*NMDA*.mat'], [channel_name, '/NMDA_curves']);
            end
        end
    end

    mkdir('AMPA-NMDA_data/AMPA');
    mkdir('AMPA-NMDA_data/NMDA');

    csv_AMPAfiles = dir('*/Data_AMPA.csv');
    csv_NMDAfiles = dir('*/Data_NMDA.csv');
    full_AMPA_table = array2table(zeros(1,13), 'VariableNames', ...
```

```

        {'group' 'treatment' 'slice' 'stimulus' 'Slope' 'Slope_max' 'Delay'...
        'Full_delay' 'Peak2peak' 'Area' 'Area_low' 'Area_high'
'Desens_Area'}});

    for i=1:length(csv_AMPAfiles)
        csv_name = fullfile(csv_AMPAfiles(i).folder, csv_AMPAfiles(i).name);
        csv_table = readtable(csv_name);
        full_AMPA_table = [full_AMPA_table; csv_table];
    end

    full_AMPA_table([1], :) = [];
    writetable(full_AMPA_table, 'AMPA-NMDA_data/AMPA/Data_AMPA.csv');

    full_NMDA_table = array2table(zeros(1,13), 'VariableNames',...
        {'group' 'treatment' 'slice' 'stimulus' 'Slope' 'Slope_max' 'Delay'...
        'Full_delay' 'Peak2peak' 'Area' 'Area_low' 'Area_high'
'Desens_Area'}});

    for i=1:length(csv_NMDAfiles)
        csv_name = fullfile(csv_NMDAfiles(i).folder, csv_NMDAfiles(i).name);
        csv_table = readtable(csv_name);
        full_NMDA_table = [full_NMDA_table; csv_table];
    end

    full_NMDA_table([1], :) = [];
    writetable(full_NMDA_table, 'AMPA-NMDA_data/NMDA/Data_NMDA.csv');

end

if strcmpi(channels, 'GABA')
    if ~exist(channel_name, 'dir')
        mkdir(channel_name);
    end

    folder_list = dir;

    folder_list=folder_list(~ismember({folder_list.name}, {'.', '..', 'GABA_curves', '
GABA_data'}));

    for i=1:length(folder_list)
        if folder_list(i).isdir==1
            if ~strcmpi(folder_list(i).name(1), '.') &&
~strcmpi(folder_list(i).name, channel_name)
                copyfile([folder_list(i).name, ...
                    '/channel_curves/*GABA*.mat'], channel_name);
            end
        end
    end
end

```

```

        end
    end

    mkdir('GABA_data');
    csv_GABAfiles = dir('*/DataGABA.csv');
    full_GABA_table = array2table(zeros(1,13), 'VariableNames',...
        {'group' 'treatment' 'slice' 'stimulus' 'Slope' 'Slope_max' 'Delay'...
        'Full_delay' 'Peak2peak' 'Area' 'Area_low' 'Area_high'
        'Desens_Area'});
    for i=1:length(csv_GABAfiles)
        csv_name = fullfile(csv_GABAfiles(i).folder, csv_GABAfiles(i).name);
        csv_table = readtable(csv_name);
        full_GABA_table = [full_GABA_table; csv_table];
    end
    full_GABA_table([1], :) = [];
    writetable(full_GABA_table, 'GABA_data/Data_GABA.csv');
end

if strcmpi(channels, 'Gly')
    if ~exist(channel_name, 'dir')
        mkdir(channel_name);
    end
    folder_list = dir;

    folder_list=folder_list(~ismember({folder_list.name}, {'.', '..', 'Gly_curves', 'Gly_data'}));
    for i=1:length(folder_list)
        if folder_list(i).isdir==1
            if ~strcmpi(folder_list(i).name(1), '.') &&
                ~strcmpi(folder_list(i).name, channel_name)
                copyfile([folder_list(i).name, ...
                    '/channel_curves/*Gly*.mat'], channel_name);
            end
        end
    end
end

mkdir('Gly_data');
csv_Glyfiles = dir('*/DataGly.csv');

```

```

full_Gly_table = array2table(zeros(1,13), 'VariableNames',...
    {'group' 'treatment' 'slice' 'stimulus' 'Slope' 'Slope_max' 'Delay'...
    'Full_delay' 'Peak2peak' 'Area' 'Area_low' 'Area_high'
'Desens_Area'});
for i=1:length(csv_Glyfiles)
    csv_name = fullfile(csv_Glyfiles(i).folder, csv_Glyfiles(i).name);
    csv_table = readtable(csv_name);
    full_Gly_table = [full_Gly_table; csv_table];
end
full_Gly_table([1], :) = [];
writetable(full_Gly_table, 'Gly_data/Data_Gly.csv');
end
end

```

MEA_channels

Rutina la organización de datos y confección de tablas.

```

function MEA_channels(channels)
% -----
% -----

if strcmpi('AMPA-NMDA', channels)
    % AMPA-NMDA
    % Working with file list

    DataTable = [];
    filelist = dir('*.h5');
    for m=1:length(filelist)
        file = filelist(m).name;
        % Detect parameters
        T_mark = find(isletter(file)==1);
        date = file(1:T_mark-1); % date mark
        if contains(file, 'ontrol') || contains(file, 'ONTROL')
            experiment = 0;
        end
    end
end

```

```

else
    experiment = 1;
end

if contains(file, 'G40')
    GMPc = 1;
else
    GMPc = 0;
end

if contains(file, 'lice')
    pos_slice = strfind(file, 'lice');
end
if contains(file, 'LICE')
    pos_slice = strfind(file, 'LICE');
end

if file(pos_slice+4) ~= ' '
    slice_number = str2num(file(pos_slice+4));
else
    slice_number = str2num(file(pos_slice+5));
end

data = McsData(file);

% Select channel

segs1 = data.Recording{1, 1}.SegmentStream{1, 1}.SegmentData{1, 1};
segs2 = data.Recording{1, 1}.SegmentStream{1, 1}.SegmentData{1, 2};

if max(abs(segs1)) > max(abs(segs2))
    curve_select(m, :) = segs1(:, 28);
else
    curve_select(m, :) = segs2(:, 28);
end

fprintf(['\n\tSaving curve', num2str(m), '\n']);

```

```

[~,file_name,~] = fileparts(file);
save([file_name, '.mat'], 'curve_select');

measure1 = mea_LTPmeasures(segs1(:,size(segs1,2)));
measure2 = mea_LTPmeasures(segs2(:,size(segs2,2)));

if measure1.peak2peak > measure2.peak2peak
    segs = data.Recording{1, 1}.SegmentStream{1, 1}.SegmentData{1, 1};
else
    segs = data.Recording{1, 1}.SegmentStream{1, 1}.SegmentData{1, 2};
end

segs = segs*1e-9;

j=1;
for i=10:size(segs,2)
    curve{j,:} = mea_LTPmeasures(segs(:,i));
    j=j+1;
end

seg_size = size(segs1,1)-size(segs1,1)*0.1;

j=1;
for i=1:3:length(curve)
    type(j,1)=experiment;
    treatment(j,1) = GMPc;
    slice(j,1)=slice_number;
    stim(j,1)=j;

    mean_curves{j,m} =
    mean([curve{i,1}.filtered(1:seg_size),curve{i+1,1}.filtered(1:seg_size),curve{i+2,1}.filtered(1:seg_size)],2); %% CURVES

    Mp2p(j,1) =
    mean([curve{i,1}.peak2peak,curve{i+1,1}.peak2peak,curve{i+2,1}.peak2peak]);

    Mslope(j,1) =
    mean([curve{i,1}.slope1090,curve{i+1,1}.slope1090,curve{i+2,1}.slope1090]);

    Mslopemax(j,1) =
    mean([curve{i,1}.max_slope,curve{i+1,1}.max_slope,curve{i+2,1}.max_slope]);

```

```

        Marea(j,1) =
mean([curve{i,1}.area,curve{i+1,1}.area,curve{i+2,1}.area]);

        Marea_low(j,1) =
mean([curve{i,1}.area_low,curve{i+1,1}.area_low,curve{i+2,1}.area_low]);

        Marea_high(j,1) =
mean([curve{i,1}.area_high,curve{i+1,1}.area_high,curve{i+2,1}.area_high]);

        Mdelay(j,1) =
mean([curve{i,1}.delay,curve{i+1,1}.delay,curve{i+2,1}.delay]);

        Mfull_delay(j,1) =
mean([curve{i,1}.full_delay,curve{i+1,1}.full_delay,curve{i+2,1}.full_delay]);

        Mdes_area(j,1) =
mean([curve{i,1}.des_area,curve{i+1,1}.des_area,curve{i+2,1}.des_area]);

        j=j+1;

end

```

```

DataTable{m} =
table(Mp2p,Mslope,Mslopemax,Marea,Marea_low,Marea_high,Mdelay,Mfull_delay,Mdes_area,...

```

```

    'VariableNames',...
    {'Peak2peak' 'Slope' 'Slope_max' 'Area' 'Area_low'...
    'Area_high' 'Delay' 'Full_delay' 'Desens_Area'});

```

```

    DataIdentity =
table(type,treatment,slice,stim,'VariableNames',{'group' 'treatment' 'slice'
'stimulus'});

```

```

fprintf(['\n\tSaving measures of curve ',num2str(m),'\n']);

```

```

end

```

```

for h=1:length(DataTable)

```

```

    DataTable_temp{h} = DataTable{h};

```

```

    DataTable_temp{h} = removevars(DataTable_temp{h},{'Peak2peak' 'Area'
'Area_low' 'Area_high' 'Desens_Area'});

```

```

    DataTable_temp{h} = [DataIdentity,DataTable_temp{h}];

```

```

    writetable(DataTable_temp{h},['Data',num2str(h),'.csv']);

```

```

end

```

```

A1 = table2array(DataTable{1});

```

```

A2 = table2array(DataTable{2});

```

```

A3 = table2array(DataTable{3});

```

```

A4 = table2array(DataTable{4});

AMPA = (A1 - A2);
NMDA = (A3 - A4);

% Curves
for n = 1:size(mean_curves,1)
    mean_AMPA_curve{n,1} = mean_curves{n,1}-mean_curves{n,2};
    mean_NMDA_curve{n,1} = mean_curves{n,3}-mean_curves{n,4};
end

Ratio_AMPA_NMDA = AMPA./NMDA;
Ratio_AMPA_NMDA_2 = A1./A3;

T_AMPA = array2table(AMPA);
T_NMDA = array2table(NMDA);
T_Ratio_AMPA_NMDA = array2table(Ratio_AMPA_NMDA);
T_Ratio_AMPA_NMDA_2 = array2table(Ratio_AMPA_NMDA_2);

T_AMPA.Properties.VariableNames={'Peak2peak' 'Slope' 'Slope_max' 'Area'
'Area_low' 'Area_high' 'Delay' 'Full_delay' 'Desens_Area'};
T_NMDA.Properties.VariableNames={'Peak2peak' 'Slope' 'Slope_max' 'Area'
'Area_low' 'Area_high' 'Delay' 'Full_delay' 'Desens_Area'};

T_AMPA = removevars(T_AMPA,{'Delay','Full_delay' 'Slope' 'Slope_max'});
T_NMDA = removevars(T_NMDA,{'Delay','Full_delay' 'Slope' 'Slope_max'});

T_Ratio_AMPA_NMDA.Properties.VariableNames={'Peak2peak' 'Slope'
'Slope_max' 'Area' 'Area_low' 'Area_high' 'Delay' 'Full_delay' 'Desens_Area'};
T_Ratio_AMPA_NMDA_2.Properties.VariableNames={'Peak2peak' 'Slope'
'Slope_max' 'Area' 'Area_low' 'Area_high' 'Delay' 'Full_delay' 'Desens_Area'};
T_Ratio_AMPA_NMDA = removevars(T_Ratio_AMPA_NMDA,{'Delay' 'Full_delay'
'Slope' 'Slope_max'});
T_Ratio_AMPA_NMDA_2 = removevars(T_Ratio_AMPA_NMDA_2,{'Peak2peak' 'Area'
'Area_low' 'Area_high' 'Desens_Area'});

```

```

T_Ratio_AMPA_NMDA = [T_Ratio_AMPA_NMDA T_Ratio_AMPA_NMDA_2];

data_AMPA = [DataTable_temp{1},T_AMPA];
data_NMDA = [DataTable_temp{3},T_NMDA];

fprintf(['\n\tSaving AMPA and NMDA measures\n']);
writetable(data_AMPA,'Data_AMPA.csv');
writetable(data_NMDA,'Data_NMDA.csv');

fprintf(['\n\tSaving AMPA and NMDA tables\n']);
writetable(T_AMPA,'T_AMPA.csv');
writetable(T_NMDA,'T_NMDA.csv');
writetable(T_Ratio_AMPA_NMDA,'T_Ratio_AMPA_NMDA.csv');

% Curves

filename2 = file_name(1:end-6);
curveAMPA = curve_select(1,:)-curve_select(2,:);
curveNMDA = curve_select(3,:)-curve_select(4,:);

save([filename2,'AMPA.mat'],'curveAMPA');
%xlswrite([filename2,'AMPA.xls'],curveAMPA);

save([filename2,'NMDA.mat'],'curveNMDA');
%xlswrite([filename2,'NMDA.xls'],curveNMDA);

save([filename2,'mean_AMPA.mat'],'mean_AMPA_curve');
save([filename2,'mean_NMDA.mat'],'mean_NMDA_curve');

% Moving files in subfolders

if ~exist('channel_mean_curves','dir')
    mkdir('channel_mean_curves');
end

```

```

movefile('*mean_AMPA.mat','channel_mean_curves');
movefile('*mean_NMDA.mat','channel_mean_curves');

if ~exist('channel_curves', 'dir')
    mkdir('channel_curves');
end
movefile('*AMPA.mat','channel_curves');
movefile('*NMDA.mat','channel_curves');

if ~exist('curves', 'dir')
    mkdir('curves');
end
movefile('*.mat','curves');

if ~exist('csv', 'dir')
    mkdir('csv');
end
movefile('*.csv','csv');
return
end

if strcmpi('GABA',channels) || strcmpi('Gly',channels)
    % GABA
    % Working with file list
    % clear
    DataTable = [];
    filelist = dir('*.h5');
    for m=1:length(filelist)
        file = filelist(m).name;

        % Detect parameters
        T_mark = find(isletter(file)==1);
        date = file(1:T_mark-1); % date mark
        if contains(file,'ontrol') || contains(file,'ONTROL')
            experiment = 0;
        else
            experiment = 1;
        end
    end
end

```

```

end

if contains(file, 'G40')
    GMPc = 1;
else
    GMPc = 0;
end

if contains(file, 'lice')
    pos_slice = strfind(file, 'lice');
end
if contains(file, 'LICE')
    pos_slice = strfind(file, 'LICE');
end

if file(pos_slice+4) ~= ' '
    slice_number = str2num(file(pos_slice+4));
else
    slice_number = str2num(file(pos_slice+5));
end

% Reading h5 file
data = McsHDF5.McsData(file);

segs1 = data.Recording{1, 1}.SegmentStream{1, 1}.SegmentData{1, 1};
segs2 = data.Recording{1, 1}.SegmentStream{1, 1}.SegmentData{1, 2};

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% CAUTION
% Verify the polarity of the evoked potential
if segs1(12,1) < 0
    segs1 = -segs1;
end

if segs2(12,1) < 0
    segs2 = -segs2;
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% CAUTION

```

```

if max(abs(segs1)) > max(abs(segs2))
    curve_select(m,:) = segs1(:,28);
else
    curve_select(m,:) = segs2(:,28);
end

fprintf(['\n\tSaving curve',num2str(m),'\n']);
[~,file_name,~] = fileparts(file);
save([file_name, '.mat'],'curve_select');
%xlswrite([file_name, '.xls'],curve_select(m,:));

measure1 = mea_LTPmeasures(segs1(:,size(segs1,2)));
measure2 = mea_LTPmeasures(segs2(:,size(segs2,2)));

if measure1.peak2peak > measure2.peak2peak
    segs = data.Recording{1, 1}.SegmentStream{1, 1}.SegmentData{1, 1};
else
    segs = data.Recording{1, 1}.SegmentStream{1, 1}.SegmentData{1, 2};
end

segs = segs*1e-9;

seg_size = size(segs1,1)-size(segs1,1)*0.1;

j=1;
for i=10:size(segs,2)
    curve{j,:} = mea_LTPmeasures(segs(:,i));
    j=j+1;
end

remainder = rem(length(curve),3);
if remainder == 0
    n_groups = length(curve);
else
    n_groups = length(curve)-remainder;

```

```

end

j=1;
for i=1:3:n_groups
    type(j,1)=experiment;
    treatment(j,1) = GMPc;
    slice(j,1)=slice_number;
    stim(j,1)=j;

    mean_curves{j,m} =
    mean([curve{i,1}.filtered(1:seg_size),curve{i+1,1}.filtered(1:seg_size),
    curve{i+2,1}.filtered(1:seg_size)],2); %% CURVES

    Mp2p(j,1) =
    mean([curve{i,1}.peak2peak,curve{i+1,1}.peak2peak,curve{i+2,1}.peak2peak
    ]);

    Mslope(j,1) =
    mean([curve{i,1}.slope1090,curve{i+1,1}.slope1090,curve{i+2,1}.slop
    e1090]);

    Mslopemax(j,1) =
    mean([curve{i,1}.max_slope,curve{i+1,1}.max_slope,curve{i+2,1}.max_
    slope]);

    Marea(j,1) =
    mean([curve{i,1}.area,curve{i+1,1}.area,curve{i+2,1}.area]);

    Marea_low(j,1) =
    mean([curve{i,1}.area_low,curve{i+1,1}.area_low,curve{i+2,1}.area_low]);

    Marea_high(j,1) =
    mean([curve{i,1}.area_high,curve{i+1,1}.area_high,curve{i+2,1}.area_high
    ]);

    Mdelay(j,1) =
    mean([curve{i,1}.delay,curve{i+1,1}.delay,curve{i+2,1}.delay]);

    Mfull_delay(j,1) =
    mean([curve{i,1}.full_delay,curve{i+1,1}.full_delay,curve{i+2,1}.full_de
    lay]);

    Mdes_area(j,1) =
    mean([curve{i,1}.des_area,curve{i+1,1}.des_area,curve{i+2,1}.des_area]);

    j=j+1;
end

DataTable{m} =
table(Mp2p,Mslope,Mslopemax,Marea,Marea_low,Marea_high,Mdelay,Mfull_delay,Mdes
_area,'VariableNames',...

    {'Peak2peak' 'Slope' 'Slope_max' 'Area' 'Area_low' 'Area_high'
    'Delay' 'Full_delay' 'Desens_Area'});

DataIdentity =
table(type,treatment,slice,stim,'VariableNames',{'group' 'treatment' 'slice'
'stimulus'});

end

```

```

size_curve(1) = height(DataTable{1,1});
size_curve(2) = height(DataTable{1,2});

if size_curve(1) ~= size_curve(2)
    a = max(size_curve) - min(size_curve);
    DataTable{1,find(size_curve==max(size_curve))}(end-a+1:end,:) = [];
    DataIdentity(end-a+1:end,:) = [];
    mean_curves = mean_curves(1:end-a,:);
end

fprintf(['\n\tSaving measures of curve ',num2str(m),'\n\n']);
for h=1:length(DataTable)
    DataTable_temp{h} = [DataIdentity,DataTable{h}];
    writetable(DataTable_temp{h},['Data',num2str(h),'.csv']);
end

A0 = table2array(DataTable{1});
A1 = table2array(DataTable{2});

for n = 1:size(mean_curves,1)
    switch channels
        case 'GABA'
            mean_GABA_curve{n,1} = mean_curves{n,1} - mean_curves{n,2}; %%
CURVES 0 - 1 ATENCION
        case 'Gly'
            mean_Gly_curve{n,1} = mean_curves{n,1} - mean_curves{n,2}; %%
CURVES 0 - 1 ATENCION
        otherwise
            return
    end
end

if isequal(size(A0), size(A1))
    inc_picro = (A0 - A1); % GABA - Picrotoxin
    ratio_picro = 100-(A0./A1*100);
end

```

```

fprintf(['\n\tSaving picrotoxin curves\n\n']);
T_picro = array2table(inc_picro);
T_picro.Properties.VariableNames={'Peak2peak' 'Slope' 'Slope_max'
'Area' 'Area_low' 'Area_high' 'Delay' 'Full_delay' 'Desens_Area'};
T_picro = [DataIdentity,T_picro];
writetable(T_picro,'T_picro.csv');

T_ratio = array2table(ratio_picro);
T_ratio.Properties.VariableNames={'Peak2peak' 'Slope' 'Slope_max'
'Area' 'Area_low' 'Area_high' 'Delay' 'Full_delay' 'Desens_Area'};
T_ratio = [DataIdentity,T_ratio];
writetable(T_ratio,['Data',channels,'.csv']);
end

filename2 = erase(upper(file_name),'CURVE');
%filename2 = file_name(1:end-6);
curveGABA = curve_select(1,:)-curve_select(2,:);

fprintf(['\n\tSaving ',channels,' curve\n']);
save([filename2,channels,'.mat'],['curveGABA']);
%xlswrite([filename2,'GABA.xls'],curveGABA);

save([filename2,'mean_',channels,'.mat'],['mean_',channels,'_curve']);

if ~exist('channel_mean_curves','dir')
    mkdir('channel_mean_curves');
end
movefile(['*mean_',channels,'.mat'],'channel_mean_curves');

if ~exist('channel_curves','dir')
    mkdir('channel_curves');
end
movefile(['*',channels,'.mat'],'channel_curves');
if ~exist('curves','dir')
    mkdir('curves');
end
movefile(['*.mat'],'curves');

```

```
if ~exist('csv', 'dir')
    mkdir('csv');
end
movefile('*.csv', 'csv');
return
end
end
```