

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Centro de Investigación Príncipe Felipe

Doctorado en Neurociencias



Mecanismos moleculares por los que la hiperamonemia
crónica induce neuroinflamación y alteraciones en la
neurotransmisión en cerebelo de ratas
hiperamonémicas

Tesis doctoral

Autora: Yaiza M^a Arenas Ortiz

Directores:

Vicente Felipo

Tiziano Balzano

Andrea Cabrera Pastor

Tutor académico:

Carmina Montoliu

Diciembre de 2021

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

TIZIANO BALZANO, Doctor en Neurociencias, Investigador del Centro Integral de Neurociencias Abarca Campal (HMCINAC) del Hospital Universitario HM Puerta del Sur,

ANDREA CABRERA PASTOR, Doctora en Bioquímica y Biología Molecular, Investigadora del Hospital Clínico Universitario de Valencia,

CARMINA MONTOLIU, Investigadora Jefa del laboratorio de Deterioro Neurológico del Instituto de Investigación Sanitaria de Valencia (INCLIVA) y profesora del departamento de Patología de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la graduada en Biotecnología Yaiza M^a Arenas Ortiz ha realizado, bajo su supervisión, en el laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigación Príncipe Felipe, el trabajo “*Mecanismos moleculares por los que la hiperamonemia crónica induce neuroinflamación y alteraciones en la neurotransmisión en cerebelo de ratas hiperamonémicas*” y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

En Valencia, 20 de diciembre de 2021

Vicente Felipo

Tiziano Balzano

Andrea Cabrera Pastor

Carmina Montoliu

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mis directores de tesis por su constante ayuda, apoyo y consejos. En particular, me gustaría agradecer al Dr. Vicente Felipo por haber confiado en mí desde un principio, dándome la oportunidad de formar parte de este fantástico grupo investigador y permitiéndome crecer tanto en lo personal como en lo profesional. Gracias por ayudarme y aconsejarme en todo momento siendo mi mayor guía en este período tan importante de mi vida. Deseo agradecer también al Dr. Tiziano Balzano y a la Dra. Andrea Cabrera Pastor por estar siempre presentes en aquellos momentos de necesidad o duda, listos para aportarme su experiencia y consejos valiosos con los cuales poder proseguir mi camino y acercarme cada vez más a mi objetivo final hasta lograrlo, sois una gran referencia para mí.

Quiero agradecer a todos mis compañeros del laboratorio de Neurobiología, los que están actualmente conmigo y los que estuvieron, por haberme ayudado y aconsejado siempre, compartiendo este camino juntos y aportando cada uno de ellos su granito de arena para que esta tesis sea posible.

En especial quiero mencionar a dos compañeras muy importantes para mí, Mar y Sonia, ya que siempre han estado presentes en los momentos más bonitos, pero también en aquellos más difíciles y duros ayudándome y dándome su total apoyo. Me llevo dos grandes amigas que sin duda han logrado hacerme el camino más fácil y llevadero.

Aprovecho también para agradecer al Dr. Bonaventura, a la Dra. Laura Cubas y al resto del equipo del laboratorio de Neuroinmunología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, por el magnífico trato recibido durante la estancia breve donde pude aprender nuevas técnicas, conocer nuevos puntos de vista, desarrollar y perfeccionar mis cualidades como investigadora.

No puedo dejar de agradecer a todo el grupo investigador del Dr. Carlos B. Duarte y Dra. Miranda Mele del Centro de Neurociencias y Biología Celular de Coímbra en Portugal, por darme la oportunidad de seguir creciendo junto a ellos en mi camino como investigadora durante mi estancia doctoral y sobre todo por todo el cariño recibido desde el primer hasta el último día que compartí con ellos, sin olvidar su ayuda constante para y por todo y su implicación en mi aprendizaje y desarrollo profesional. Catarina y Alexandra, gracias por ser mis compañeras de experimentos, risas, confianzas y salidas, sin vosotras la estancia no hubiera sido lo mismo.

Agradezco a mis amigos por haber creído siempre en mí y por seguir haciéndolo actualmente, también por animarme y apoyarme siempre ya que han sido un punto de apoyo fundamental durante estos años permitiéndome compartir y disfrutar infinitas vivencias junto a ellos.

Para terminar, quiero dar gracias a lo más importante de mi vida, mi *familia* y mi *pareja*, eternamente GRACIAS ya que sin vosotros nada de esto hubiera sido posible. Gracias por aguantar en los momentos más duros y difíciles brindándome vuestro apoyo incondicional y motivándome a seguir hasta lograr todas mis metas y objetivos. ¡Qué suerte la mía por teneros!

Y, por último, gracias a mi querido PUMBA. Gracias por estar a mi lado en todo momento cuidándome, dándome alegría y felicidad, siendo mi compañero de estudios y ahora mi ángel protector desde el cielo, siempre te llevaré en mi corazón.

A mi familia

“La vida es como montar en bicicleta, si paras te caes”

Santiago Grisolia

SUMMARY

INTRODUCTION

Hepatic encephalopathy (HE) is a complex neuropsychiatric syndrome that results from acute or chronic liver failure. HE can manifest as a wide spectrum of neurological and / or psychiatric abnormalities ranging from subclinical alterations to coma and death of patients (Felipo, 2013; Vilstrup et al., 2014). HE induces alterations in circadian rhythms and personality, attention problems, cognitive and motor deficits, and leads to a worse prognosis and reduced patient survival (Bustamante et al., 1999; Weissenborn et al., 2005b; Felipo, 2013).

Hepatic encephalopathy may be clinically evident (clinical HE) or not (minimal HE, MHE). Clinical HE is classified according to the temporal pattern of manifestation as occasional, recurrent and persistent. There is a milder early form called minimal hepatic encephalopathy (MHE). This thesis will focus on this initial form of HE, because it is in this phase where the treatment can be most effective to reverse it and prevent its progression. Patients without visible signs of clinical HE may show cognitive (in visual-spatial perception, attention and concentration) and motor (in bimanual and visual-motor coordination) alterations that are not detected in a routine neurological test, but are evident when they are tested using appropriate psychometric (Giménez-Garzó et al., 2017; Gou et al., 2020).

MHE reduces the quality of life of patients (Bajaj et al., 2020), increases the risk of suffering accidents at work, home and traffic, predisposes to suffer clinical HE and reduces survival (Weiner et al., 2004; Felipo, 2013). Between 35% and 50% of adult patients with liver cirrhosis present MHE (Mínguez et al., 2006; Sharma et al., 2008; Felipo et al., 2012a). MHE affects more than 2 million people in the United States and a similar number in Europe. It is therefore an important medical, social and economic problem.

The mechanisms that lead to cognitive and motor alterations associated with MHE are not yet fully understood, but they are beginning to be understood through studies in animal models (Agusti et al., 2011; Hernández-Rabaza et al., 2015; Cabrera- Pastor et al., 2016a; Cabrera-Pastor et al., 2019a).

Rats with chronic hyperammonemia reproduce the cognitive impairment and motor incoordination shown by cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy and are a good model to identify the underlying mechanisms and to test treatments to improve them. Chronic hyperammonemia induces neuroinflammation which alters glutamatergic and GABAergic neurotransmission in cerebellum and hippocampus leading to cognitive and motor impairment (Aguilar, Miñarro and Felipo, 2000; Cauli *et al.*, 2009; Gonzalez-Usano *et al.*, 2014; Rodrigo *et al.*, 2010; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a and b; Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a and 2019a).

Hyperammonemic rats show neuroinflammation in cerebellum, with microglia and astrocytes activation and increased content of TNF α (Tumour Necrosis Factor alpha) and membrane expression of the TNF α receptor 1 (TNFR1). This is associated with translocation to the nucleus of nuclear factor kappa B (NF- κ B), leading to increased glutaminase levels, which increases

glutamate formation and its extracellular concentration. The increased transport of glutamate by activated astrocytes is associated with increased amount and reversal of the function of the GABA transporter type 3 (GAT-3) resulting in increased extracellular γ -aminobutyric acid (GABA) levels, which induce motor incoordination and impairs the ability to learn a conditional discrimination task in the Y maze (Cauli *et al.*, 2009; Gonzalez-Usano *et al.*, 2014; Hernandez-Rabaza *et al.*, 2016a; Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

Hyperammonemia also alters glycinergic neurotransmission in cerebellum in vivo and these alterations contribute to the mechanisms that impair learning in the Y maze in hyperammonemia (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a). As far as we know the effects of glycinergic neurotransmission on neuroinflammation have not been studied.

It has been reported that, in cultured adipocytes, glycine strongly stimulates NF- κ B activation and that this effect is completely prevented by blocking the glycine receptor using the antagonist strychnine. In contrast, glycine inhibits the activation of NF- κ B induced by TNF α in these adipocytes (Contreras-Nuñez *et al.*, 2018).

It is likely that the altered glycinergic neurotransmission in hyperammonemic rats may be involved in the induction of neuroinflammation and in the mechanisms by which it alters glutamatergic and GABAergic neurotransmission in cerebellum.

This idea is supported by the fact that extracellular cyclic guanosine monophosphate (cGMP), at physiological (nM) concentrations, modulates glycine receptors, reducing its activation (Bukanova *et al.*, 2014). In hyperammonemia, the levels of extracellular cGMP are reduced in cerebellum in vivo (Erceg *et al.*, 2005b; EIMlili *et al.*, 2008; Cauli *et al.*, 2009; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016b). Chronic intracerebral administration of extracellular cGMP to rats with chronic hyperammonemia reduces neuroinflammation, including microglia and astrocytes activation and membrane expression of the TNF α receptor 1 (TNFR1). This is associated with reduced nuclear NF- κ B, glutaminase content and extracellular glutamate, reduced amount of the GABA transporter GAT-3 in activated astrocytes, reduced extracellular GABA in cerebellum and restoration of motor coordination (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

However, it has not been studied whether the above effects of extracellular cGMP in cerebellum of hyperammonemic rats could be mediated by the inhibition of glycine receptors.

Hyperammonemia and peripheral inflammation play synergistic roles in inducing the cognitive and motor alterations in MHE (Shawcross *et al.*, 2004; Montoliu *et al.*, 2009; Felipo *et al.*, 2012b; Cabrera-Pastor *et al.*, 2019a).

Studies in animal models of hyperammonemia and MHE have shown that appearance of the neurological alterations is mediated by induction of neuroinflammation, which alters glutamatergic and GABAergic neurotransmission, leading to cognitive and motor impairment (Rodrigo *et al.*, 2010; Hernandez-Rabaza *et al.*, 2015 and 2016a, Dadsetan *et al.*, 2016a and b; Cabrera-Pastor *et al.*, 2017, 2018a and 2019a; Zhang *et al.*, 2017; El-Marasy *et al.*, 2019). Both in patients and in animal models the cerebellum seems to be the first brain area to be affected at early stages of chronic liver diseases (Butz *et al.*, 2010; Rodrigo *et al.*, 2010; Felipo *et al.*,

2012b and 2014; Giménez-Garzó *et al.*, 2017). Neuroinflammation is stronger in cerebellum than in other brain areas in animal models (Rodrigo *et al.*, 2010) and is also prominent in cerebellum of patients with chronic liver disease, even at the steatohepatitis stage, before reaching liver cirrhosis (Balzano *et al.*, 2018a and b).

In agreement with the early appearance of neuroinflammation in cerebellum, one of the earliest alterations in hyperammonemia and MHE is the impairment of motor coordination, which is modulated mainly by GABAergic neurotransmission in cerebellum. Cabrera-Pastor *et al.*, (2018a) have shown that, in hyperammonemic rats, motor in-coordination is a consequence of increased TNF α levels and activation of its receptor TNFR1 in cerebellum, which increases GABAergic neurotransmission. Administration of extracellular cGMP normalizes activation of TNFR1, GABAergic neurotransmission and motor coordination in hyperammonemic rats (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

However, it remains unclear how hyperammonemia induces the increase in TNF α in cerebellum or which cell types show increased TNF α content.

We have recently shown that hyperammonemia per se induces peripheral inflammation, which is a main contributor to neuroinflammation in hippocampus and to cognitive impairment (Balzano *et al.*, 2020a). Sustained peripheral inflammation also leads to cognitive impairment in other pathological situations such as rheumatoid arthritis, diabetes or after strong surgeries (Montoliu *et al.*, 2015). Reducing peripheral inflammation by treatment with anti-TNF α improves cognitive function in patients with chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis or sarcoidosis (Elfferich *et al.*, 2010; Raftery *et al.*, 2012) and also in animal models of MHE (Dadsetan *et al.*, 2016a and b; Balzano *et al.*, 2020a).

It is therefore likely that hyperammonemia-induced peripheral inflammation could be the trigger of TNF α induction in cerebellum in rats. An objective of this thesis was to assess if peripheral inflammation is responsible for induction of neuroinflammation and of TNF α in cerebellum of hyperammonemic rats. To answer this question, we assessed whether preventing peripheral inflammation by treating rats with anti-TNF α (infliximab) prevents neuroinflammation and TNF α induction in hyperammonemic rats.

In the central nervous system, microglia and astrocytes are usually the main sources of TNF α . However, a few studies have shown the induction of TNF α synthesis in neurons in some pathological situations, including stroke (Liu *et al.*, 1994), spinal cord injury (Ohtori *et al.*, 2004) or sciatic nerve injury (Schäfers *et al.*, 2003). TNF α expression is also induced in neurons in hippocampus of rats with hepatic encephalopathy (Dadsetan *et al.*, 2016b).

In the course of the study, we found that sustained hyperammonemia induces the expression of TNF α in Purkinje neurons.

NF- κ B is a main transcription factor which controls the expression of many genes, including TNF α (Ahn and Aggarwal, 2005). In resting cells NF- κ B dimers (predominantly p50/p65 complexes) are retained in the cytoplasm by binding to I κ B. Activation of the I κ B kinase (IKK) complex leads to phosphorylation of I κ B, dissociation of NF- κ B and translocation to the

nucleus of NF- κ B, which binds to specific DNA sequences and promotes transcription of target genes, including TNF α (Hayden and Ghosh, 2012). We assessed whether induction of TNF α by hyperammonemia is associated with increased nuclear expression of NF- κ B and how hyperammonemia activates NF- κ B.

Activation of NF- κ B may be induced by activation of different receptors, including the TNF α receptor TNFR1. As we have previously shown that activation of TNFR1 is increased in cerebellum of hyperammonemic rats (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a), we assessed whether activation of NF- κ B and induction of TNF α in Purkinje neurons is mediated by activation of TNFR1.

Following TNFR1 stimulation, the intracellular death domain (DD) recruits RIP1 and TNFR-associated death domain (TRADD). TRADD engages TNFR-associated factor 2 (TRAF2), inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1) and inhibitor of apoptosis protein 2 (cIAP2) leading to the formation of complex I (Pegoretti *et al.*, 2018), which activates I κ B kinase allowing translocation of NF- κ B to the nucleus (Devin *et al.*, 2000; Blackwell *et al.*, 2009).

To assess if activation of NF- κ B and induction of TNF α expression in Purkinje neurons is mediated by activation of TNFR1 we assessed if they are prevented by R7050. R7050 does not affect binding of TNF α to TNFR1 but selectively inhibits the association of TNFR1 with intracellular adaptor molecules (e.g. TRADD, RIP), thus inhibiting subsequent cellular responses after TNF α binding (King, Alleyne and Dhandapani, 2013).

As mentioned above, hyperammonemia is a main contributor to the induction of hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis. We therefore assessed whether TNF α is also induced in Purkinje neurons of patients died with liver cirrhosis, who have suffered sustained hyperammonemia.

The cerebellum and the functions modulated by the cerebellum, such as motor coordination, are altered at early phases of MHE. This is supported by reports showing that the blood flow is altered in cirrhotic patients before the neurological impairment is detected with the Psychometric Hepatic Encephalopathy Score (PHES), considered the gold standard for detection of MHE (Felipo *et al.*, 2014). Motor incoordination is a general feature in patients with MHE and is even detected in some patients who are classified as without MHE by the PHES (Butz *et al.*, 2010; Felipo *et al.*, 2012a; Giménez-Garzó *et al.*, 2017), indicating that impairment of motor coordination is an early event in the process of MHE and that the PHES is not sensitive enough to detect this alteration in a set of patients and more sensitive tools are necessary (Giménez-Garzó *et al.*, 2017).

Chronic hyperammonemia per se is enough to induce mild cognitive impairment and motor incoordination in rats similar to those present in MHE. Cognitive and motor impairment are mediated by hyperammonemia-induced inflammation which induces neuroinflammation, alters neurotransmission and induces neurological impairment in rats (Cabrera-Pastor *et al.*, 2019a). Rats with chronic hyperammonemia without liver failure show microglia and astrocytes activation and increased inflammatory markers in cerebellum. Neuroinflammation in cerebellum enhances GABAergic neurotransmission leading to motor incoordination and

impaired learning of a conditional discrimination task (Cauli *et al.*, 2009; Hernandez-Rabaza *et al.*, 2016a; Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

One mechanism by which neuroinflammation increases GABAergic tone is by reversal of the GABA transporter GAT3 function in activated astrocytes, leading to GABA release to the extracellular space (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a). This is due to enhanced TNF α -induced activation of TNFR1, leading to translocation of NF- κ B to the nucleus and increased transcription of glutaminase, which increases the formation and extracellular concentration of glutamate. Increased transport of glutamate and Na⁺ through glutamate transporters alters the Na⁺ gradient in activated astrocytes, leading to release of GABA through GAT3 (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a). However, we believe that additional alterations in other pathways and cell types (neurons, microglia) must also contribute to neuroinflammation-induced increase of GABAergic neurotransmission in cerebellum of hyperammonemic rats.

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is involved in neuroinflammation induction in Alzheimer's and Parkinson's diseases (Lee, Jin and Bae, 2020). S1P induces microglial activation (Ji *et al.*, 2019). The effects of S1P are mediated by activation of S1P receptors (S1PR). There are 5 types of S1PRs. S1PR1 plays a role in the pathogenesis of diseases associated to neuroinflammation such as multiple sclerosis and Alzheimer's disease and its antagonist fingolimod has beneficial effects in these pathologies (Aytan *et al.*, 2016; Hunter *et al.*, 2016).

S1PR2 also modulates neuroinflammation, for example it contributes to microglial activation and M1 polarization following cerebral ischemia (Sapkota *et al.*, 2019). McMillin *et al.* (2014; 2017) proposed that bile acid-mediated activation of S1PR2 promotes neuroinflammation in acute liver failure and hepatic encephalopathy in mice. To choose the steps of the signal transduction pathways to analyze in cerebellum of hyperammonemic rats we took into account different reports on steps of pathways involved in other pathological situations, mainly in different types of pain. One of the consequences of activation of S1PR2 is the enhanced production of the chemokine CCL2 (Oskeritzian *et al.*, 2015). Zhang *et al.* (2017) propose that neuron-derived CCL2 contributes to microglia activation and neurological decline in acute liver failure. Toyomitsu *et al.* (2012) showed that in primary cultures of microglia, addition of CCL2 promotes P2X4 receptor trafficking to the cell surface of microglia. Liu *et al.* (2018) and Long *et al.* (2020) indicate that, in trigeminal allodynia and migraine, activation of P2X4 receptor in microglia increases BDNF synthesis and release via activation of MAP Kinase p38. Ferrini and De Koninck, (2013) propose that in neuropathic pain BDNF released from microglia, activates TrkB-mediated signals in neurons, leading to downregulation of KCC2, disrupting Cl⁻ homeostasis, leading to altered GABAergic and glycinergic neurotransmission. However, Lee-Hotta *et al.* (2019) proposed later that BDNF may increase or decrease KCC2 expression and function depending on the intracellular pathways activated.

HYPOTHESES

Based on the above data we propose the hypotheses:

1. In chronic hyperammonemia, increased activation of glycine receptors in the cerebellum contributes to the activation of microglia and astrocytes and to the induction of neuroinflammation and alterations in glutamatergic and GABAergic neurotransmission.
2. One of the mechanisms by which the alteration of glycinergic neurotransmission in hyperammonemia induces neuroinflammation and alterations in neurotransmission in the cerebellum would be by modulating the ADAM17-TNFR1-NF- κ B pathway.
3. Extracellular cGMP reduces glycine receptor activation. The reduced levels of extracellular cGMP in the cerebellum of hyperammonemic rats would contribute to increase glycinergic neurotransmission.
4. Treatment with extracellular cGMP to normalize its levels or with strychnine (glycine receptor antagonist) would normalize glycinergic neurotransmission in the cerebellum of hyperammonemic rats, leading to a decrease in neuroinflammation and to the normalization of glutamatergic and GABAergic neurotransmission.
5. The peripheral inflammation induced by hyperammonemia would be the trigger for the induction of neuroinflammation and alterations in neurotransmission in the cerebellum and motor incoordination.
6. The reduction of peripheral inflammation by treatment with anti-TNF α (infliximab) should prevent the induction of neuroinflammation in the cerebellum and of motor incoordination in rats with chronic hyperammonemia.
7. The increase in TNF α in the cerebellum would be an early effect that would contribute to triggering neuroinflammation. The induction of TNF α could occur in different cell types and evolve with time from hyperammonemia.
8. In hyperammonemia, the activation of S1PR2 would be increased, leading to an increase in CCL2, which would activate CCR2, which would contribute to the activation of microglia and the induction of neuroinflammation.
9. Activation of CCR2 would also increase BDNF levels in activated microglia. The increase in BDNF could contribute to the alteration of inhibitory neurotransmission through modulation of TrkB and KCC2.
10. Neuroinflammation and alterations in neurotransmission in the cerebellum of hyperammonemic rats could be reversed by inhibiting excessive activation of the S1PR2-CCL2-CCR2-BDNF-TrkB-KCC2 pathway. This could be achieved using S1PR2, CCR2 or TrkB antagonists.

OBJECTIVES

Based on these hypotheses we propose the following objectives:

1. To assess if, in chronic hyperammonemia, the increased activation of glycine receptors in the cerebellum contributes to the activation of microglia and astrocytes and to the induction of neuroinflammation and alterations in glutamatergic and GABAergic neurotransmission. To assess if blocking the glycine receptor with the antagonist strychnine reverses neuroinflammation and alterations in neurotransmission.
2. Identify mechanisms by which the alteration of glycinergic neurotransmission induces neuroinflammation and alterations in neurotransmission in the cerebellum of hyperammonemic rats. To analyze the role of the ADAM17-TNFR1-NF- κ B-glutaminase-glutamate-GABA pathway.
3. Assess if extracellular cyclic GMP could be improving neuroinflammation and neurotransmission in cerebellum of hyperammonemic rats by reducing glycine receptor activation. Assess if strychnine induces the same effects on neuroinflammation and neurotransmission as extracellular cGMP and by the same mechanisms.
4. Assess if peripheral inflammation is responsible for the induction of neuroinflammation and the increase of TNF α in the cerebellum of hyperammonemic rats: Analyze if treatment with anti-TNF α (infliximab) to reduce peripheral inflammation prevents the induction of neuroinflammation and TNF α in cerebellum of hyperammonemic rats.
5. Analyze the cell type(s) in which TNF α increases in the cerebellum of hyperammonemic rats at different times of hyperammonemia as well as the time course of TNF α induction in Purkinje neurons and glial cells. To analyze if TNF α is also induced in Purkinje neurons from patients died with liver cirrhosis.
6. Identify mechanisms by which sustained hyperammonemia induces TNF α in Purkinje neurons. To analyze if the induction of TNF α by hyperammonemia is mediated by the TNFR1-NF- κ B pathway and if blocking the TNFR1 pathway with R7050 reverses neuroinflammation and the increase in TNF α .
7. To study if S1PR2 activation is increased in chronic hyperammonemia and if this contributes to activation of microglia and induction of neuroinflammation and alterations in neurotransmission in the cerebellum and motor coordination in hyperammonemic rats. Assess if ex vivo S1PR2 blockade with the antagonist JTE-013 reduces neuroinflammation and restores neurotransmission in the cerebellum of hyperammonemic rats. To assess if S1PR2 blockade in vivo reduces neuroinflammation and restores motor coordination in hyperammonemic rats.
8. Analyze if the effects of increased activation of S1PR2 on neuroinflammation and neurotransmission are mediated by increased CCL2 and activation of its receptor CCR2. To assess if blocking CCR2 with the antagonist RS504393 reduces neuroinflammation and restores neurotransmission in cerebellum of hyperammonemic rats.

9. Assess if the effects of increased CCR2 activation on neuroinflammation and neurotransmission are mediated by an increase in BDNF and in the activation of its receptor TrkB. To assess if blocking TrkB with the antagonist ANA-12 reduces neuroinflammation and restores neurotransmission in the cerebellum of hyperammonemic rats.

METHODS

Rats

Male Wistar rats were made hyperammonemic by feeding them an ammonium-containing diet as previously described (Felipo, Miñana and Grisolia, 1988). The experiments were approved by the “Comite de Experimentación y Bienestar Animal” (CEBA) of our Center and by the Conselleria de Agricultura of Generalitat Valenciana and were performed in accordance with guidelines of the Directive of the European Commission (2010/63/EU) for care and management of experimental animals.

Post-mortem human samples

Formalin-fixed paraffin-embedded sections (5 μ m thick) from cerebella of 4 patients died with liver cirrhosis and 3 matched controls (subjects with no liver or neurodegenerative diseases) were obtained from Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses (Valencia), Hospital Universitario Fundación Alcorcon and biobank A Coruña. For each case appropriate authorization to collect the tissue for research was obtained.

Effects of chronic hyperammonemia and peripheral anti-TNF α treatment on TNF α expression in cerebellar microglia, astrocytes and Purkinje neurons

Rats were randomly distributed into four groups: control, control+infliximab, hyperammonemic and hyperammonemic+infliximab. Infliximab is an anti-TNF α which does not cross the blood-brain barrier, binds to peripheral TNF α and reduces peripheral inflammation in rats with MHE or hyperammonemia (Dadsetan *et al.*, 2016a and b; Balzano *et al.*, 2020a). Infliximab (Remicade; Merck Sharp & Dohme, Spain) was dissolved in saline (0.9% Sodium Chloride) and administered by intravenous injection (5 mg/kg) in the tail vein as in (Karson *et al.*, 2013). The first administration of infliximab was performed two days before starting the ammonium diet and injections were repeated weekly during 4 weeks. Control rats were injected intravenously with saline. At the end of 4th week, rats were sacrificed and perfused for the in-vivo immunohistochemical analysis on cerebellum of: microglia and astrocytes activation, expression of nuclear NF- κ B and TNF α protein in glia and Purkinje neurons, expression of TNF α mRNA in glia and Purkinje neurons.

Time course of TNF α expression and role of TNFR1-NF- κ B pathway in hyperammonemic rats

Rats were fed the ammonium-containing diet as above and sacrificed at different times (1, 2 or 4 weeks). In vivo analysis of microglia and astrocytes activation was performed at 1 week of hyperammonemia and in-vivo analysis of nuclear NF- κ B and TNF α protein in glia and Purkinje neurons at 1 and 2 weeks of hyperammonemia. To study the role of TNFR1-NF- κ B pathway on TNF α synthesis, cerebellar slices treated or not with R7050 were used for the immunohistochemical analysis of nuclear NF- κ B and TNF α protein in glia and Purkinje neurons at 2 and 4 weeks of hyperammonemia.

Analysis of protein content and phosphorylation in cerebellar slices by western blot

Control and hyperammonemic rats were sacrificed at 4 weeks of hyperammonemia and the cerebelli were immediately immersed into ice-cold Krebs buffer. Cerebellar slices (400µm-thick, transversal) were cut and incubated for 20 min at 35.5°C in Krebs buffer for stabilization. Different treatments such as Strychnine to block the glycine receptor, Bisindolyl for PKC inhibition, JTE-013 for S1PR2 inhibition were added to slices and incubated for 30 min. Slices were collected and homogenized by sonication for 20 s in a buffer for analysis of protein content and phosphorylation by western blot. Samples were subjected to immunoblotting as in Felipo *et al.* (1993), using antibodies against the different proteins. Phosphorylation levels were normalized to the total amount of the respective proteins. As a control for protein loading, the same membranes used to quantify the amount of proteins were incubated with an antibody against Actin (1:5000) from Abcam or GAPDH (1:10000) from Millipore depending on the molecular mass of the other proteins. Secondary antibodies were anti-rabbit (cat# A8025), anti-goat (cat# A7650), or anti-mouse (cat# A3562) IgG, 1:4000 dilution conjugated with alkaline phosphatase from Sigma (St. Louis, MO). The images were captured using the ScanJet 5300C (Hewlett-Packard, Amsterdam, Netherlands), and band intensities quantified using the Alpha Imager 2200, version 3.1.2 (AlphaInnotech Corporation, San Francisco).

Analysis of membrane expression of receptors or transporters

Membrane expression of receptors and transporters in cerebellar slices was analyzed by cross-linking with BS3 (bis sulfosuccinimidyl suberate), Pierce cat# 21580, Rockford, IL) and using antibodies against different receptors or transporters. After the treatments (see above), slices were added to tubes containing ice-cold Krebs buffer with or without 2 mM BS3 and incubated for 30 min at 4 °C with gentle shaking. Cross-linking was terminated by quenching the reaction with 100 mM glycine (10 min, 4°C). The slices were homogenized by sonication for 20s. Samples treated or not with BS3 were analyzed by western blot as describe above. The surface expression of each subunit was calculated as the difference between the intensity of the bands without BS3 (total protein) and with BS3 (non-membrane protein) as described by Cabrera-Pastor *et al.*, 2015.

Immunohistochemistry

Rats were anaesthetized with sodium pentobarbital and transcardially perfused with 0.9 % saline followed by 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Brains were removed and post-fixed in the same fixative solution for 24h at 4 °C. On the other hand, after the incubation of cerebellar slices with different treatments, as described above, slices were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) during 24 hours at 4°C. Paraffin-embedded sections (5 µm) from rats or humans were cut and mounted on coated slide glass, processed with the Envision Flex+kit (DAKO) blocking endogenous peroxidase activity for 5 min and incubated with antibodies against different proteins. The reaction was visualized by Envision Flex+horseradish peroxidase for 20 min and finally diaminobenzidine for 10 min. Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin for 5 min.

Analysis of astrocytes and microglia activation by immunohistochemistry

Analysis of Iba1, CD68 and GFAP staining was performed in the white matter of the cerebellum using the Image J software. Brain sections from six animals per group were used. Microglial activation was assessed by measuring perimeter of Iba1-stained cells in 10 randomly selected 56x fields per section. The results were expressed in micrometers. As an additional procedure to assess microglial activation, staining of CD68, a marker of activated microglia (Hendrickx *et al.*, 2017) was analyzed. The number of CD68⁺ cells, was counted using the cell counter function of Image J and results expressed as cells/cm².

For GFAP quantification the area of interest was selected. Using Auto Local Threshold and analyze particles functions the intensity thresholds and size filter were applied. To measure the total amount of GFAP no size filter was applied. For each rat at least 10 56x fields were quantified. The result was expressed as percentage of area stained by GFAP.

Analysis of different proteins content in white matter and Purkinje layer by immunohistochemistry

Analysis of staining was performed in the white matter and Purkinje layer of the cerebellum using the Image J software. The number of cells expressing in white matter of the cerebellum was manually counted using the Cell Counter plugin of ImageJ and the results are expressed as cells/mm². For the analysis in Purkinje neurons, this region was manually selected using freehand selection of ROI manager function and the mean intensity (M.I.) staining was recorded. The analysis for each region was performed on at least 10 56x-fields (for white matter) and 10 40x-fields (for Purkinje layer) for each rat or subject.

Immunofluorescence analysis of subcellular distribution of glycine receptor, TNFR1, BDNF and NF-κB

Double immunofluorescences were performed to assess glycine receptor colocalization with microglia (using Iba1, 1:300, Abcam), astrocytes (using GFAP, Sigma, 1:400) and Purkinje neurons (using Calbindin, 1:200, Abcam). Double immunofluorescences were performed to assess TNFR1 receptor colocalization with Purkinje neurons and BDNF colocalization with microglia. Moreover, double immunofluorescences were performed to confirm TNFα colocalization in microglia, astrocytes and Purkinje neurons.

Analysis of p50 and p65 subunit of NF-κB was performed by immunofluorescence. Cerebellar slices from six different animals per group were selected, washed in 0.1 M phosphate buffer and blocked with normal serum from the same species as the secondary antibody before being incubated overnight with primary antibody from Abcam diluted in blocking buffer and secondary fluorescent antibody (1:400) from Invitrogen. The nuclei were counterstained with DAPI (Sigma-Aldrich) and sections cover-slipped. The images were observed under confocal microscope (Leica TCS-SP2-AOBS) and photographically recorded.

Nuclear and cytoplasmic intensity of p50 and p65 subunit were analyzed using ImageJ (1.48v). Nuclei was outlined using ROI manager function on DAPI blue channel and the selection was applied on green channel (p50 or p65) to measure fluorescence. Mean intensity (M.I.) for each

nucleus was measured. For cytoplasmic analysis of p50 subunit of NF- κ B, green channels were used and cytosol of each cell was manually outlined using freehand selection of ImageJ and mean intensity (MI) recorded. Results are expressed as nuclear/cytoplasmic ratio of p50 and p65 subunit of NF- κ B.

Fluorescence in situ hybridization

Was performed to detect and assess localization of TNF α mRNA expression in cerebellar slices after the treatments (see above) as in (Dadsetan *et al.*, 2016a). In brief, slices were deparaffined and rehydrated and tissue was digested with proteinase K (Ambion-Life Technologies). A fluorescein-conjugated probe of 23 nucleotides (50 μ M; Exiqon) was diluted in hybridization solution (50 ng/ μ l) with 30% formamide and denatured at 80°C for 2 minutes. The slices were incubated for 16 hours in a humidified hybridization chamber at 60°C. The next day two stringency washes were performed with 1X SSC at 48°C for 15 minutes and 1X SSC at room temperature for 15 minutes. The slices were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma; 5 μ g/ml). The slices were observed under confocal microscope and photographically recorded. To quantify the content of TNF α mRNA in Purkinje neurons, cells were manually outlined using ImageJ and mean intensity (M.I.) was measured. The ROI Manager function was used to quantify the fluorescence intensity of the probe. Cells were selected manually and the value of total TNF α mRNA content was obtained using the 'Mean Gray Value' parameter. The value of this parameter is directly proportional to the intensity of the mRNA expression. The results were expressed as a gray scale mean.

Analysis of extracellular GABA and glutamate in cerebellum by *in vivo* microdialysis

Control and hyperammonemic rats were anesthetized with isoflurane at 5% for induction and 1.5–3% for maintenance. A microdialysis guide was implanted in the cerebellum (AP-10.2, ML-1.6, and DV- 1.2), as in Cabrera-Pastor *et al.* (2016b). After 48 h a microdialysis probe was implanted in the freely moving rat. Probes were perfused (3 μ L/min) with artificial cerebrospinal fluid (in mM): NaCl, 145; KCl, 3.0; CaCl₂, 2.26; buffered at pH 7.4 with 2 mM sodium phosphate. After a 2–3 h stabilization period, samples were collected every 30 min. When indicated, strychnine (4 μ M) was administered through the microdialysis probe to block glycine receptor. All samples were stored at 80°C until analysis of extracellular GABA and glutamate. GABA and glutamate were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) after derivatization with o-phthalaldehyde and fluorescence detection with excitation at 340 nm and emission at 460 nm as previously described (Canales *et al.*, 2003).

Continuous intracerebral administration of JTE-013 to rats using osmotic pumps

Rats were divided into four groups. The osmotic mini-pumps were filled with the corresponding content according to four experimental groups:

1) CV: Control rats implanted with osmotic mini-pumps containing vehicle (sterile saline+1% DMSO).

2) CJ: Control rats implanted with osmotic mini-pumps containing JTE-013 (1.22 mM) as in Kimura *et al.* (2008) JTE-013 was from AXONMEDCHEM CAS [383150-41-2]; diluted in sterile saline + DMSO 1%).

3) HV: Hyperammonemic rats implanted with osmotic mini-pumps containing vehicle.

4) HJ: Hyperammonemic rats implanted with osmotic mini-pumps containing JTE-013.

The pumps were implanted 2 weeks after beginning the ammonia-containing diet. These pumps released 0.25 μ l per hour during 28 days and were connected to a cannula (Brain infusion kit 2, 3–5 mm, ALZET) implanted in the cerebral ventricle as in Erceg *et al.* (2005a).

After 6 weeks of hyperammonemia and 25-27 days of JTE-013 administration some rats were sacrificed for immunohistochemistry analysis and other rats for protein content and membrane expression analysis.

Motor coordination in the beam walking

Motor coordination was assessed using the beam walking test after 3 weeks of hyperammonemia and one week of JTE-013 administration. The number of foot faults (slips) is recorded as a measure of incoordination as described in Jover *et al.* (2006).

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error. All statistical analyses were performed using the software program GraphPad Prism. The number of samples necessary to analyze the content or phosphorylation of different proteins by Western blot was different and was adjusted in each case to reduce variability and to obtain reliable results. The variability was due to different causes: abundance of the protein analyzed, quality of the antibody used or magnitude of the changes induced by hyperammonemia or by treatments. Normality distribution was assessed using the D'Agostino and Pearson Omnibus test and the ShapiroWilk normality tests. Differences in variances of normally distributed data were assessed using Bartlett's test. Data with the same variance across groups were analyzed by a parametric one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Turkey post hoc test when more than two groups. Data with different variance across groups were analyzed using the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunnett's post-hoc test. A confidence level of 95% was accepted as significant. The number of rats used for each parameter and statistical procedure used in each case is indicated in the corresponding Figure legend.

RESULTS AND DISCUSSION

CHAPTER 1

Blocking glycine receptor reduces astrocytes and microglia activation in cerebellum of hyperammonemic rats

It has been shown that hyperammonemia enhances glycinergic neurotransmission in cerebellum *in vivo* (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016c). We assessed whether reducing glycinergic neurotransmission by treatment with strychnine, an antagonist of glycine receptor, reduces microglial and/or astrocytes activation and neuroinflammation in freshly isolated cerebellar slices from hyperammonemic rats.

Microglia was activated in cerebellar slices of hyperammonemic rats, as reflected by changes in morphology to a less ramified form. Strychnine normalized the morphology of microglia, indicating reduction of microglial activation.

Activation of microglia was quantified by measuring its area and perimeter, which are reduced in activated microglia. In white matter, the area stained by Iba-1, was reduced in hyperammonemic rats compared to control rats. Treatment with strychnine normalized the area stained by Iba-1 in hyperammonemic rats.

The perimeter of microglia was reduced in hyperammonemic rats compared in control rats. Treatment with strychnine reduced microglia activation in hyperammonemic rats, increasing the perimeter.

Hyperammonemic rats show also activation of astrocytes in cerebellum, as reflected by the altered morphology of the astrocytes stained with anti-GFAP. Treatment with strychnine normalized astrocytes morphology, indicating that the inhibition of glycine receptor reduces activation of astrocytes in hyperammonemic rats.

Astrocytes activation was quantified by analyzing the area stained by GFAP, which was increased in hyperammonemic rats. Treatment with strychnine reduced the area stained by GFAP in hyperammonemic rats compared to control rats.

Strychnine normalizes the content of TNF α and IL1 β in cerebellar slices of hyperammonemic rats

Activation of microglia and astrocytes are associated with an increase of TNF α and IL1 β in cerebellum (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a). We assessed the effect of strychnine on the content of TNF α and IL1 β in cerebellar slices. Hyperammonemia increased the content of TNF α and of IL1 β compared to control rats. Strychnine normalized the content of both TNF α and IL1 β .

Glycine receptor is mainly localized in Purkinje cells

The reduction of microglia and astrocytes activation by strychnine could be mediated by glycine receptors located in these glial cells or in neurons. To shed light on this point we analyzed the localization of glycine receptor in cerebellum by immunofluorescence. Double fluorescence

staining show that glycine receptor colocalized with Purkinje cells but not with microglia or astrocytes.

These results suggest that in hyperammonemic rats the inhibition of glycine receptor in Purkinje cells would mediate the reduced activation of microglia and astrocytes. We then analyzed the underlying mechanisms.

Blocking glycine receptor normalizes membrane expression of the TNF α receptor TNFR1 through a PKC and ADAM17-dependent mechanism

It has been reported that increased membrane expression of TNFR1 mediates induction of neuroinflammation and motor incoordination in hyperammonemia (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

The amount of TNFR1 in the membrane was increased in cerebellar slices of hyperammonemic rats compared to control rats. Treatment with strychnine completely reversed this effect, reducing TNFR1 in the membrane compared to control rats. Membrane expression of TNFR1 may be modulated by shedding mediated by ADAM17 (Moss *et al.*, 1997; Black *et al.*, 1997). We therefore assessed the effects of hyperammonemia and of strychnine on membrane expression of ADAM17. The amount of ADAM17 in the membrane is reduced in cerebellum of hyperammonemic rats compared to control rats. This suggests that hyperammonemia could increase TNFR1 membrane expression by reducing its shedding mediated by ADAM17. Strychnine also completely reversed this effect, increasing ADAM17 in the membrane compared to control rats.

A main mechanism modulating membrane expression of ADAM17 is mediated by PKC (Doedens and Black, 2000). Bisindolyl, an inhibitor of PKC, normalizes the membrane expression of TNFR1 and ADAM17 compared to control rats, reproducing the effects of strychnine treatment.

Membrane expression of ADAM17 may be modulated by phosphorylation in the residue of threonine 735 mediated by the PKC- ERK/MAPKp38 pathway (Soond *et al.*, 2005; Xu and Derynck, 2010). We then assessed whether strychnine modulates membrane expression of ADAM17 through this pathway. Hyperammonemia reduces the phosphorylation at Tyr204 of Erk, increases the phosphorylation at Thr180/Tyr182 of MAPKp38 and the phosphorylation at Thr735 of ADAM17 compared to control rats, and these effects are not reversed by strychnine.

These data indicate that reduced membrane expression of ADAM17 in hyperammonemic rats is due to increased PKC activity but is not mediated by the ERK/p38-ADAM17-Thr735 pathway.

Strychnine normalizes the nuclear content of NF- κ B and the levels of glutaminase, TNF α , IL1 β and HMGB1 in Purkinje cells of hyperammonemic rats

Increased membrane expression of TNFR1 in rats with chronic hyperammonemia leads to increased nuclear translocation of p50 subunit of NF- κ B and, as a consequence, an increase of TNF α , IL1 β and glutaminase expression (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a; Balzano *et al.*, 2020a).

We then assessed whether reduction of TNFR1 membrane expression by strychnine reduces the NF- κ B pathway in cerebellar slices of hyperammonemic rats. The nuclear content of the p50 subunit of NF- κ B in Purkinje cells is increased in hyperammonemia and is normalized by strychnine. Strychnine also normalized the content of glutaminase, the amount of mRNA for TNF α and the protein content of TNF α and IL1 β in Purkinje cells.

It has been shown that increased nuclear translocation of NF- κ B increases HMGB1 expression in neurons which induces microglia activation (Zou and Crews, 2014; Crews and Vetreno, 2016). In Purkinje neurons the intensity of HMGB1 staining was higher in hyperammonemic rats than in control rats and strychnine normalized it. This indicates that strychnine could be reducing the activation of microglia by reducing HMGB1 expression in Purkinje neurons.

Strychnine reduces extracellular glutamate and GABA concentration and surface expression of GAT3 in cerebellum of hyperammonemic rats

The increase in glutaminase in hyperammonemia is associated with increased production and extracellular levels of glutamate, increased amount and reversal of the function of the GABA transporter GAT-3, increased extracellular GABA in cerebellum and motor in-coordination (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

We assessed the effects of in vivo treatment with strychnine on extracellular glutamate and GABA by microdialysis in vivo in freely moving rats. Hyperammonemic rats show increased extracellular glutamate and GABA in cerebellum compared to controls and strychnine administration through the microdialysis probe normalizes extracellular glutamate and GABA in hyperammonemic rats. We then assessed the effects of hyperammonemia and of strychnine on membrane expression of the glutamate transporters GLAST and GLT1 and of the GABA transporter GAT3 in cerebellar slices.

Hyperammonemia reduced the surface expression of GLAST and GLT-1 compared to control rats. The surface expression of these transporters is not restored by strychnine.

Hyperammonemia increases the surface expression of GAT3. Treatment with strychnine normalizes GAT3 in cerebellar slices of hyperammonemic rats.

These results show that enhanced glycinergic neurotransmission contributes to neuroinflammation in hyperammonemia. Another aim of this study was to shed light on the mechanisms by which hyperammonemia enhances glycinergic neurotransmission. It has been shown that glycine receptors are modulated by extracellular cGMP at physiological (nM) concentrations, reducing its activation by glycine (Bukanova *et al.*, 2014). Extracellular cGMP

levels are reduced in cerebellum of hyperammonemic rats (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016b). We hypothesized that enhanced glycinergic neurotransmission and neuroinflammation in cerebellum of hyperammonemic rats may be due to the reduced levels of cGMP and that the normalization of their levels could reverse them.

To test this hypothesis, we assessed if addition of extracellular cGMP to cerebellar slices of hyperammonemic rats normalizes the above mechanisms.

Extracellular cGMP reduces astrocytes and microglia activation and normalizes membrane expression of ADAM17 and TNFR1 in cerebellar slices of hyperammonemic rats

We assessed the effects of addition of extracellular cGMP on activation of microglia and astrocytes by immunohistochemistry. Extracellular cGMP normalized the area stained by Iba-1 and the perimeter of microglia in hyperammonemic rats. Extracellular cGMP also reduced significantly the area stained by GFAP in hyperammonemic rats compared to control rats. Extracellular cGMP also normalized the content of TNF α and IL1 β in cerebellar slices of hyperammonemic rats.

Extracellular cGMP, as strychnine completely normalized the membrane expression of ADAM17 and of TNFR1 compared to control rats. This indicates that extracellular cGMP could reduce TNFR1 membrane expression by normalizing membrane expression of ADAM17 which would be due to inhibition of the glycine receptor.

Extracellular cGMP normalizes the nuclear content of NF- κ B, glutaminase, mRNA and protein of TNF α , IL1 β and HMGB1 in Purkinje cells of hyperammonemic rats

We then assessed the effect of extracellular cGMP on the TNFR1 downstream pathway as described above. Extracellular cGMP normalizes the nuclear content of the p50 subunit of NF- κ B, glutaminase, the amount of mRNA for TNF α , the total content of TNF α , IL1 β and HMGB1 in Purkinje cells.

This indicates that extracellular cGMP, as strychnine, could be reducing the activation of microglia by a process mediated by the inhibition of glycine receptor and the TNFR1 downstream pathway and by the normalization of HMGB1 in hyperammonemic rats. This supports the idea that enhanced activation of glycine receptor in hyperammonemia would be due to reduced tonic inhibition by extracellular cGMP and may be normalized by increasing it.

The results reported provide several relevant new contributions.

A main contribution is the clear demonstration that glycinergic neurotransmission modulates neuroinflammation and activation of microglia and astrocytes. This opens new possibilities to reduce neuroinflammation by acting, for example, on glycine receptors. We show that strychnine, an antagonist of glycine receptors, reduces neuroinflammation, inducing beneficial effects in cerebellum of hyperammonemic rats. The inhibitory glycinergic neurotransmission in the spinal cord dorsal horn also plays a main role in regulating nociceptive signaling. It has

been proposed that targeting glycinergic neurotransmission in dorsal horn is a good therapeutic strategy to treat specific pathologies such as pain. In chronic pain this may include approaches to increase glycinergic transmission in spinal pain circuits with agonists and positive modulators of glycine receptors, through inhibition of glycine transporters, gene therapy and through inhibition of inflammatory mediated pathways (Imlach WI., 2017).

We show here that strychnine, an antagonist of glycine receptors, reduces neuroinflammation and activation of microglia and astrocytes in cerebellum of hyperammonemic rats.

The results support that enhanced activation of glycine receptors in hyperammonemic rats leads to reduced membrane expression of ADAM17, a metalloprotease that is responsible for shedding of TNFR1 (Moss *et al.*, 1997; Black *et al.*, 1997). This reduction of ADAM17 would be responsible for the increased TNFR1 in the membrane and activation of the associated pathway.

Immunofluorescence analysis shows that glycine receptors are mainly expressed in Purkinje neurons, with comparatively poor or no expression in microglia and astrocytes. We therefore studied the steps associated to TNFR1 activation in Purkinje neurons.

Chronic hyperammonemia increases NF- κ B levels in the nucleus of Purkinje neurons and this is a consequence of increased activation of TNFR1 (Balzano *et al.*, 2020a). It is shown that increased NF- κ B in the nucleus increases the content in Purkinje neurons of TNF α , IL-1 β , glutaminase and HMGB1. The increased levels of glutaminase produce more glutamate resulting in increased levels of extracellular glutamate and glutamate uptake by activated astrocytes. In these activated astrocytes the function of the GABA transporter GAT3 is reversed and instead of taking up GABA, releases GABA to the extracellular fluid, resulting in increased levels of extracellular GABA which, in turn, induce motor incoordination in hyperammonemic rats.

In the spinal cord dorsal horn neurons, it has also been shown that synaptic inhibition mediated by glycinergic and GABAergic receptors on excitatory neurons is modulated by inflammation associated to pain, through a change in functioning of existing glycine and GABA_A receptors (Takazawa *et al.*, 2017).

There are at least two mechanisms by which these changes in Purkinje neurons are transmitted to microglia to keep them in an activated form. One mediator synthesized in Purkinje neurons which is released and activates microglia is HMGB1 and another is glutamate itself. We discuss below in some detail the different steps of this general process.

The results reported a consequence of enhanced activation of glycine receptors in Purkinje neurons of hyperammonemic rats, as demonstrated by the fact that blocking glycine receptors with strychnine completely prevents all the process.

Moreover, it is also shown that the enhanced glycinergic neurotransmission in cerebellum of hyperammonemic rats would be a consequence of the lower levels of extracellular cGMP, which physiologically inhibits tonically glycine receptors. We show that increasing extracellular cGMP in cerebellar slices of hyperammonemic rats prevents all the process exactly

as strychnine, thus supporting that the lower levels of extracellular cGMP in hyperammonemia lead to reduced inhibition of the receptors, resulting in increased glycinergic neurotransmission which, in turn induces neuroinflammation.

Some details of the above general process are discussed below. A main step in the process is the increased membrane expression and activation of TNFR1. It has been already shown that increased membrane expression of TNFR1 mediates induction of neuroinflammation and motor incoordination in cerebellum of hyperammonemic rats (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018b). It is now shown that increased membrane expression of TNFR1 in hyperammonemia would be due to enhanced glycinergic neurotransmission and reduced membrane expression of ADAM17. TNFR1 in membrane may be modulated by shedding mediated by ADAM17 (Moss *et al.*, 1997; Black *et al.*, 1997; Doedens and Black, 2000). Hyperammonemia reduces ADAM17 in the membrane, reducing TNFR1 shedding and resulting in increased TNFR1 in the membrane. Hyperammonemia reduces ADAM17 in the membrane by increasing PKC activity, as supported by the fact that inhibition of PKC normalizes the levels in the membrane of both ADAM17 and TNFR1.

The mechanism by which hyperammonemia increases PKC activity in cerebellum has been already described and is mediated by increased activity of CaMKII which in turn, indirectly, enhances PKC activity (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a). Increased activity of CaMKII in hyperammonemia is due to increased phosphorylation at the residue Thr286, which is biphasically modulated by calcium concentration (Graupner and Brunel, 2007). In hyperammonemia basal levels of calcium in Purkinje neurons are reduced resulting in increased phosphorylation and activity of CaMKII (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a). Blocking glycine receptors in hyperammonemic rats induces a voltage-dependent calcium-channels-mediated increase of calcium in Purkinje neurons that reduces CaMKII phosphorylation and activity (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a) thus reducing PKC activity.

A main mechanism by which PKC modulates membrane expression of ADAM17 is mediated by phosphorylation in threonine 735 through the PKC- ERK/p38 pathway (Soond *et al.*, 2005; Xu and Derynck, 2010). However, the results reported here show that this mechanism is not responsible for the effects of hyperammonemia on ADAM17. Another mechanism by which the membrane expression of ADAM17 can be reduced by PKC is by enhancing its release in exosomes. This has been shown in cells stimulated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), a PKC activator, or lipopolysaccharide (LPS) (Groth *et al.*, 2016). It is possible that a similar mechanism would contribute to the reduced levels of ADAM17 in the membrane in cerebellum of hyperammonemic rats.

Blocking glycine receptors in hyperammonemic rats reduces CaMKII phosphorylation and activity (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a) thus reducing PKC activity and normalizing ADAM17 and TNFR1 levels in the membrane.

In rats with chronic hyperammonemia increased membrane expression of TNFR1 leads to increased nuclear translocation of NF- κ B and, as a consequence, an increase of TNF α , IL1 β and glutaminase expression (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a; Balzano *et al.*, 2020a). We show here that, in addition, this pathway also increases the levels of HMGB1 in Purkinje neurons. All

these steps are also reversed by blocking glycine receptors with strychnine, indicating that they are also a consequence of enhanced glycinergic neurotransmission in hyperammonemia.

The increase of glutaminase results in increased formation of glutamate. An increase in TNF α -induced formation of glutamate through increased glutaminase expression has been reported in several pathological situations (Tilleux and Hermans 2008; Lehmann *et al.*, 2009; Takaki *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2013). TNF α -induced increase of glutamate has been proposed as the central mechanism by which excessive TNF α harms cerebral function and structure across the range of neurodegenerative diseases including Parkinson's, Huntington's and Alzheimer diseases, amyotrophic lateral sclerosis or in septic encephalopathy (Clark and Vissel, 2016). TNF α -induced glutamate increase has been also proposed as the most logical therapeutic target in these situations (Clark and Vissel, 2016). TNF α -induced increase of glutaminase expression and glutamate levels occur both in microglia (Takeuchi *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2012) and in neurons (Pais *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2013). The results reported here show that in cerebellum of hyperammonemic rats there is also a TNF α -induced increase of glutaminase expression in Purkinje neurons and of extracellular glutamate. A similar increase has been reported in microglia in cerebellum of hyperammonemic rats (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a). However, glycinergic neurotransmission would modulate this pathway mainly in neurons because glycine receptor is strongly expressed in Purkinje neurons but not in microglia. The inhibition of this pathway in Purkinje cells of hyperammonemic rats by strychnine supports this idea.

In some of the above pathological situations in which TNF α levels and extracellular glutamate reach high levels, this pathway may lead to excitotoxicity and neuronal degeneration and the associated cognitive impairment (Clark and Vissel, 2016). In the model of chronic hyperammonemia used here the increase of TNF α and extracellular glutamate in cerebellum seems to be milder and do not reach levels high enough to induce neuronal death. However, they are enough to alter neurotransmission, cognitive function and motor coordination.

The excess of glutamate in the extracellular space must be removed to protect from glutamate excitotoxicity and keep normal synaptic transmission. Extracellular glutamate is removed mainly by astrocytes through the glutamate transporters GLAST and GLT-1 (Lehre *et al.* 1995; Chen *et al.*, 2004; Furness *et al.*, 2008; Petr *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2019). In cerebellum of hyperammonemic rats the increased levels of extracellular glutamate would result in increased transport through glutamate transporters in activated astrocytes, thus increasing intracellular Na⁺ which would reverse the function of the GABA transporter GAT-3, leading to increased extracellular GABA (Hernandez-Rabaza *et al.*, 2016a; Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a). This is supported by the fact that blocking the glutamate transporters GLT-1 and GLAST in microdialysis experiments *in vivo* reduced extracellular GABA in cerebellum of hyperammonemic rats (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a). In agreement with this, it has been shown that in activated astrocytes the function of the GAT-3 transporter of GABA is reversed and, instead of taking up GABA into the astrocyte, releases GABA, thus increasing extracellular GABA levels (Wu *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2018b).

Blocking glycine receptors with strychnine prevents all the pathway in hyperammonemic rats, normalizing TNF α -induced expression of glutaminase and extracellular glutamate levels. This

is associated with normalization of astrocytes activation, expression of GAT-3 and extracellular levels of GABA.

To confirm that blocking glycine receptors normalizes extracellular glutamate and GABA in cerebellum of hyperammonemic rats *in vivo*, we analyzed these neurotransmitters by microdialysis in cerebellum of freely moving rats. Both extracellular glutamate and GABA concentrations were increased in hyperammonemic rats. Blocking glycine receptors by administration of strychnine through the microdialysis probe reduced extracellular glutamate and GABA to normal levels, thus supporting that the above process is also occurring in cerebellum *in vivo*.

Similar effects are obtained when activation of glycine receptor is reduced by adding extracellular cGMP. Normalization of extracellular GABA levels is associated with restoration of motor coordination in hyperammonemic rats (Gonzalez-Usano *et al.*, 2014; Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

The activation of the TNFR1-NF- κ B pathway in Purkinje neurons of hyperammonemic rats not only alters neurotransmission, but also promotes neuroinflammation and microglial activation. Increased nuclear NF- κ B also enhances transcription of IL1 β , TNF α and HMGB1 in Purkinje neurons. IL1 β and TNF α are pro-inflammatory cytokines that promote neuroinflammation by activating their receptors in different cell types, including microglia.

HMGB1 is released from neurons in situations associated with neuroinflammation such as ischemic injury, traumatic injury, intracerebral hemorrhage, and spinal cord injury (Wang *et al.*, 2020). HMGB1 released by neurons leads to activation of microglia by binding to TLR4 receptor (Kim *et al.*, 2006; Zou and Crews, 2014; Crews and Vetreno, 2016). In hyperammonemic rats, release of HMGB1 from Purkinje neurons would contribute to keep activation of microglia by a similar mechanism. Moreover, strychnine would be reducing the activation of microglia by reducing HMGB1 expression and release in Purkinje neurons.

Another mediator released by Purkinje neurons in hyperammonemic rats that would contribute to microglia activation is glutamate itself. Microglia expresses most types of glutamate receptors, including NMDA receptors. Activation of NMDA receptors by glutamate in microglia leads to morphological activation and release of inflammatory mediators that promote microglial polarization (Kaindl *et al.*, 2012; Raghunatha *et al.*, 2019). Glutamate released from Purkinje neurons in hyperammonemic rats would also contribute to keep microglial activation. The reduction of this glutamate release by strychnine would contribute to reduced activation of microglia.

This report also shows that addition of extracellular cGMP, which does not cross the cell membrane, also prevents all the process triggered by enhanced activation of glycine receptors in Purkinje neurons of hyperammonemic rats. Extracellular cGMP restores membrane expression of ADAM17 and TNFR1, normalizes nuclear expression of NF- κ B and expression of glutaminase, IL1 β , TNF α and HMGB1 in Purkinje neurons and activation of microglia and astrocytes. It has been already shown that extracellular cGMP also normalizes GAT-3 and

extracellular levels of glutamate and GABA in cerebellum of hyperammonemic rats and restores motor coordination (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

These results support the idea that increased glycinergic neurotransmission in hyperammonemic rats (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016c) would be a consequence of reduced inhibition of the receptor by extracellular cGMP, which concentration is reduced in cerebellum of hyperammonemic rats (Erceg *et al.*, 2005b; EIMlili *et al.*, 2008; Cauli *et al.*, 2009; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a).

It has been repeatedly shown that increasing cGMP levels by using inhibitors of the phosphodiesterases (PDEs) that degrades it (mainly PDE5) prevents or reverses neuroinflammation in models of different pathologies including hepatic encephalopathy, hyperammonemia, focal ischemia, multiple sclerosis, Huntington's, or Alzheimer's diseases (Pifarre *et al.*, 2011; Saavedra *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013a; Hernandez-Rabaza *et al.*, 2015; Peixoto, Nunes and Garcia-Osta, 2015; Moretti *et al.*, 2016; Agusti *et al.*, 2017). Increasing only extracellular cGMP also reverses neuroinflammation in models of chronic hyperammonemia and hepatic encephalopathy (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a and 2018a). This report also identifies a mechanism by which these protective effects could be occurring, by reducing increased activation of glycine receptors and the associated activation of the TNFR1-NF- κ B pathway.

The results obtained in the first chapter of this thesis are summarized in Figures 1 and 2. In summary in this first chapter of the thesis, we show that glycinergic neurotransmission modulates neuroinflammation. In hyperammonemic rats, enhanced glycinergic neurotransmission leads to reduced membrane expression of ADAM17, resulting in increased surface expression and activation of TNFR1 and of the associated NF- κ B pathway. This leads to increased expression in Purkinje neurons of TNF α , IL1 β , HMGB1 and glutaminase. Increased glutaminase activity leads to increased extracellular levels of glutamate, which lead to increased extracellular levels of GABA. This altered neurotransmission leads to motor incoordination. Increased extracellular glutamate and HMGB1 potentiate microglial activation by acting on TLR4 and NMDA receptors, respectively. Blocking glycine receptors with strychnine or extracellular cGMP completely prevents the above pathway in hyperammonemic rats. This indicates that enhanced glycinergic neurotransmission in hyperammonemia would be due to reduced extracellular levels of cGMP. These results shed some light on possible new therapeutic target pathways for pathologies associated to neuroinflammation.

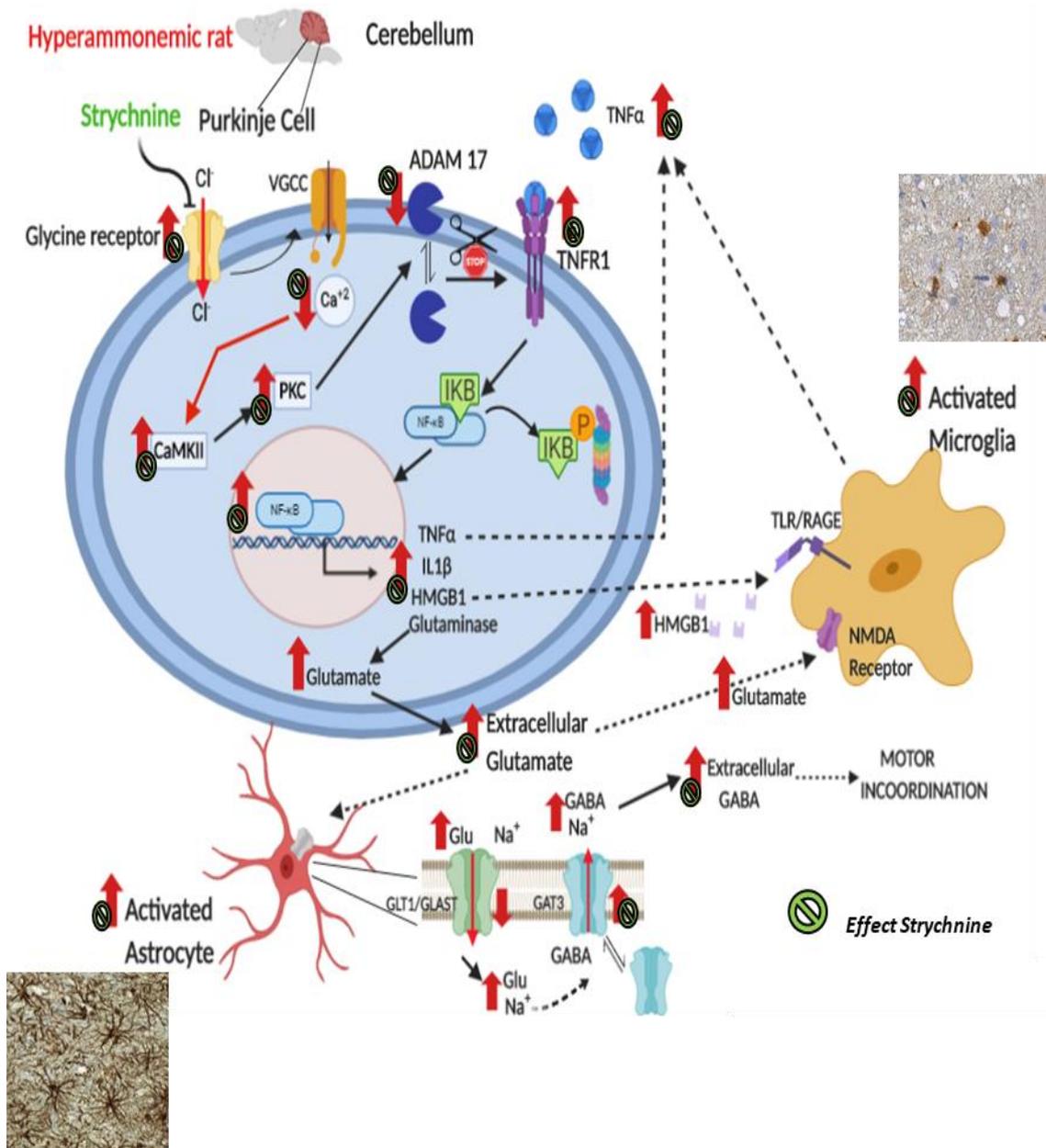


Figure 1. Proposed pathway by which blocking glycine receptors reduces neuroinflammation and restores neurotransmission in cerebellum of hyperammonemic rats through an ADAM17-TNFR1-NF- κ B pathway in Purkinje neurons. Glycine receptors are expressed mainly in Purkinje cells. In hyperammonemic rats, enhanced glycinergic neurotransmission leads to reduced membrane expression of ADAM17, resulting in increased surface expression and activation of TNFR1 and of the associated NF- κ B pathway. This increases the expression in Purkinje neurons of TNF α , IL-1 β , HMGB1, and glutaminase. Increased glutaminase activity leads to increased extracellular glutamate, which increases extracellular GABA. Increased extracellular glutamate and HMGB1 potentiate microglial activation. The effects of hyperammonemia are indicated by red arrows (\uparrow). The effects of strychnine by the green symbol \textcircled{S}

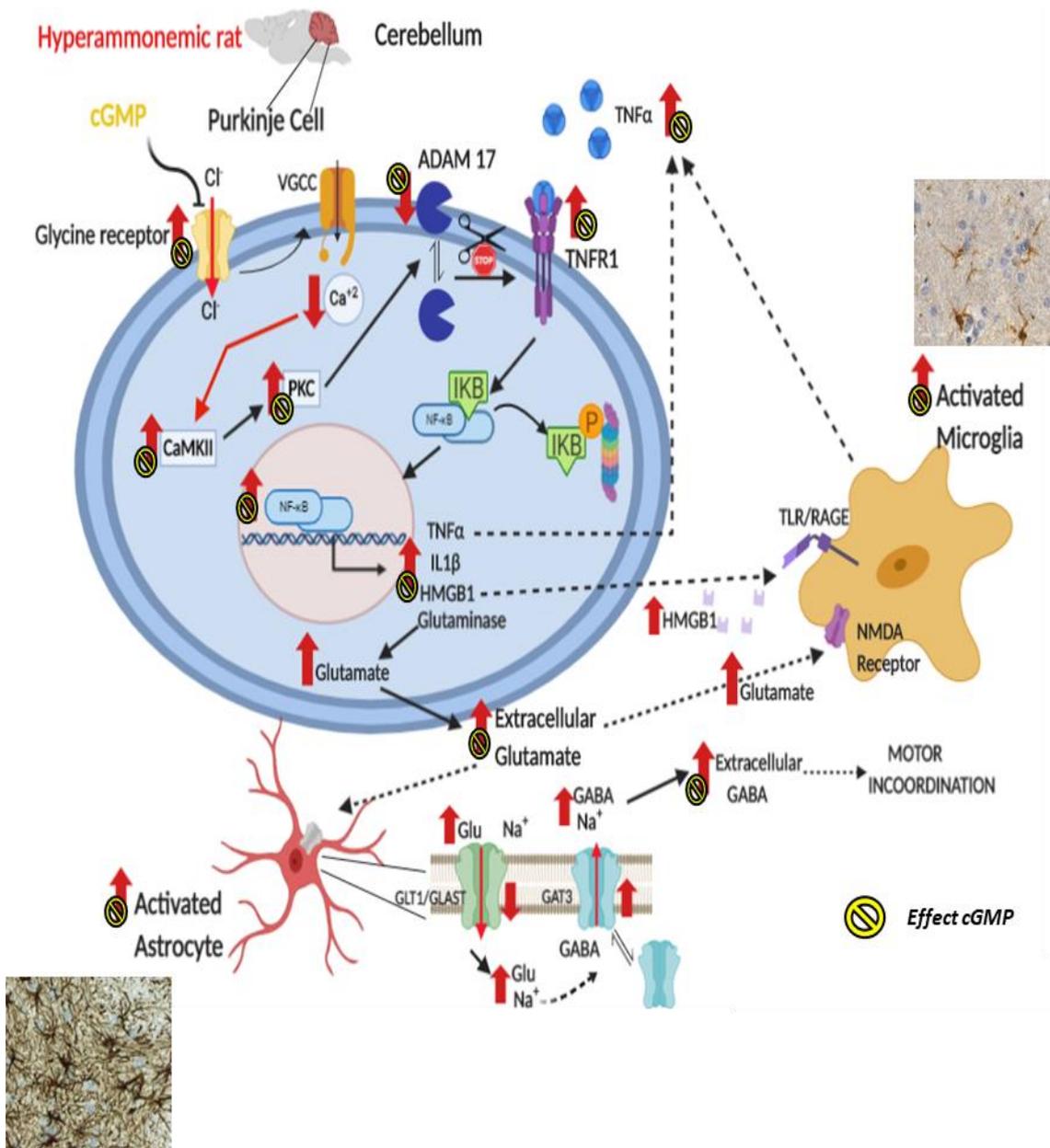


Figure 2. Proposed pathway by which extracellular cGMP through the inhibition of glycine receptors reduces neuroinflammation and restores neurotransmission in the cerebellum of hyperammonemic rats through an ADAM17-TNFR1-NF-κB pathway in Purkinje neurons. The effects of cGMP are the same induced by strychnine, indicating that enhanced glycinergic neurotransmission in hyperammonemia would be due to reduced extracellular cGMP. The effects of hyperammonemia are indicated by red arrows (↑). The effects of cGMP by the yellow symbol (Ⓢ)

CHAPTER 2

Peripheral treatment with infliximab prevents neuroinflammation in the cerebellum of hyperammonemic rats

In the previous data, it is striking that TNF α increases in Purkinje neurons in the cerebellum of hyperammonemic rats, when TNF α is normally induced in glial cells. TNF α synthesis is known to be induced in neurons in certain pathological situations (Liu et al., 1994; Schäfers et al., 2003; Ohtori et al., 2004 and Zhang et al., 2019). However, the mechanisms involved are not well understood (Balzano et al., 2020b). For these reasons, we studied in which cell types TNF α is induced at different times of hyperammonemia and the role of peripheral inflammation in this process in the cerebellum of hyperammonemic rats.

In the second chapter of the thesis, we show that at 4 weeks of hyperammonemia rats show activated microglia, with a decrease of the length and number of processes and an increase of cell body size. These morphological changes are reflected in a reduction of the perimeter compared with that observed in control rats. Treatment with Infliximab completely prevents this activation of microglia. The perimeter of microglia in hyperammonemic rats treated with infliximab was similar to that of control rats treated or not with infliximab.

Microglial activation was also analyzed by assessing the effects on CD68, a specific marker for activated microglia. Hyperammonemia strongly increases the number of cells stained with CD68 in white matter compared to control rats. Treatment with infliximab prevented activation of microglia, reducing the number of cells expressing CD68 as in control rats.

Hyperammonemia also induced activation of astrocytes in white matter of cerebellum, which was also prevented by treatment with infliximab. The area covered by GFAP staining was increased in hyperammonemic rats as compared to control rats. Peripheral treatment with infliximab also reduced astrocytes activation in hyperammonemic rats, showing less GFAP staining in white matter than untreated rats.

We then analyzed by immunohistochemistry the effects of hyperammonemia and of infliximab treatment on expression of TNF α in white matter. The number of cells expressing TNF α was increased in hyperammonemic rats compared to control rats. Treatment with infliximab completely prevented this increase. To assess whether the increase occurs in microglia or astrocytes we performed double fluorescence staining of TNF α with Iba-1 or GFAP. The increase of TNF α in white matter was observed both in microglia and astrocytes, with a similar proportion.

TNF α mRNA expression increases in cerebellum at 4 weeks of hyperammonemia and it is normalized by treatment with infliximab

Unexpectedly, we also observed an increase of TNF α expression in Purkinje neurons in rats with 4 weeks of hyperammonemia. The intensity of TNF α staining in Purkinje neurons was higher in hyperammonemic rats than in control rats. Treatment with infliximab prevented the increase of TNF α in Purkinje neurons.

To confirm that the staining of TNF α in Purkinje neurons is due to its synthesis in these neurons we analyzed the content of mRNA for TNF α by fluorescent in situ hybridization. Hyperammonemic rats show a high content of TNF α mRNA in Purkinje neurons which is lower in control rats and in hyperammonemic rats treated with infliximab.

The expression of mRNA for TNF α was also increased in glial cells in white matter of hyperammonemic rats as compared to control rats. Hyperammonemic rats treated with infliximab showed values similar to control rats. Again, double immunofluorescence shows that the increase of TNF α mRNA in white matter occurs both in microglia and in astrocytes.

Infliximab prevents nuclear translocation of NF- κ B subunits p50 and p65 in Purkinje neurons and glial cells in chronic hyperammonemia

We then assessed whether hyperammonemia could be inducing TNF α expression in Purkinje neurons through p50 and p65 subunits of NF- κ B. Hyperammonemia strongly alters the intracellular distribution of p50, with increased nucleus/cytosol ratio as compared to control rats and a strong reduction of p50 in nucleoli. Treatment with infliximab prevented all these changes in distribution of p50.

The intensity of the p65 subunit of NF- κ B staining in the nuclei was also increased in Purkinje neurons of hyperammonemic rats and this was also prevented by infliximab.

Expression of p50 of NF- κ B was also increased in glial cells in hyperammonemic rats. The number of cells expressing p50 in microglia and astrocytes was increased more than 3-fold in hyperammonemic rats and this was prevented by the treatment with infliximab.

The nuclear translocation of NF- κ B and the increase in TNF α are reversed by R7050, indicating that they are mediated by the activation of TNFR1

We then assessed whether induction of nuclear transport of p50 of NF- κ B and of TNF α expression in hyperammonemic rats is mediated by activation of the TNF α receptor TNFR1. To do this we blocked the formation of the TNFR1-TRADD/RIP1/TRAF2 complex using R7050. These experiments were performed ex vivo in freshly isolated cerebellar slices from control and hyperammonemic rats. Incubation with R7050 reduced TNF α expression in Purkinje neurons, microglia and astrocytes of hyperammonemic rats to values similar to those of control rats.

We then assessed if normalization of TNF α levels by R7050 was associated with normalization of subcellular distribution of p50 of NF- κ B. R7050 normalized the nucleus/cytosol distribution of p50 and restored the nucleolar content of p50 in Purkinje neurons of hyperammonemic rats. R7050 also normalized expression of p50 in microglia and astrocytes in white matter of hyperammonemic rats.

All the above studies were performed when the rats were hyperammonemic for 4 weeks and show that hyperammonemia induces TNF α expression in Purkinje neurons. As this is not usual, we assessed whether sustained hyperammonemia is necessary for this induction of TNF α or it also occurs at shorter periods of hyperammonemia.

TNF α increases in glial cells, but not in Purkinje neurons in the cerebellum at 2 weeks of hyperammonemia

We repeated the analysis of TNF α expression at 2 weeks of hyperammonemia. We did not observe any increase of TNF α in Purkinje neurons, while TNF α was increased in glial cells of white matter, both in microglia and astrocytes. The increase of TNF α was slightly higher in microglial cells than in astrocytes.

We also analyzed nuclear translocation of p50 of NF- κ B at 2 weeks of hyperammonemia. In agreement with the lack of effect on TNF α , we did not observe any effect of hyperammonemia on subcellular distribution of p50 in Purkinje neurons, which remain similar to control rats. Also, in agreement with the increase in TNF α , rats with 2 weeks of hyperammonemia show increased expression of p50 in microglia and astrocytes.

R7050 normalizes p50 expression in microglia and astrocytes in rat white matter at 2 weeks of hyperammonemia

We also used R7050 to assess the role of activation of TNFR1 in the induction of nuclear transport of p50 of NF- κ B and of TNF α expression at 2 weeks of hyperammonemia.

Incubation with R7050 reduced TNF α expression in microglia and astrocytes of hyperammonemic rats to values similar to those of control rats.

At 2 weeks of hyperammonemia the nucleus/cytosol distribution of p50 was not altered in Purkinje neurons or by R7050. R7050 normalized the expression of p50 in microglia and astrocytes in white matter of rats with 2 weeks of hyperammonemia.

TNF α and NF- κ B activation do not increase but if there is activation of microglia and astrocytes in cerebellum of hyperammonemic rats at 1 week of hyperammonemia

We then analyzed the changes in TNF α expression and NF- κ B at 1 week of hyperammonemia. At this time, we did not observe any increase in TNF α expression in Purkinje neurons, microglia or astrocytes. NF- κ B also remained unaltered in Purkinje neurons, microglia or astrocytes.

In spite of this lack of effect on TNF α and NF- κ B at 1 week of hyperammonemia, both microglia and astrocytes were activated in cerebellum. This was reflected in reduced perimeter of microglia, increased expression of CD68, and increased area stained by GFAP.

Cirrhotic patients have increased TNF α in Purkinje neurons

Patients with liver cirrhosis show sustained hyperammonemia. We assessed whether this also leads to increased content of TNF α in Purkinje neurons. The content of TNF α in Purkinje neurons of patients died with liver cirrhosis show an increased content of TNF α compared to controls subjects died without liver or neurodegenerative diseases.

This study shows that sustained (4 weeks), but not short-term (2 weeks) hyperammonemia induces the expression of TNF α in Purkinje neurons in rats. Moreover, TNF α expression is also

increased in Purkinje neurons of patients died with liver cirrhosis, who have been also exposed to sustained hyperammonemia.

As discussed below, this induction of TNF α may contribute to the neurological alterations in hyperammonemia and hepatic encephalopathy by altering the function of Purkinje neurons, neurotransmission and by inducing neuronal death. Induction of TNF α in Purkinje neurons is associated with increased nuclear localization of NF- κ B, a transcription factor that promotes the transcription of TNF α mRNA (Ahn and Aggarwal, 2005). We show that the mRNA for TNF α is also increased in Purkinje neurons, indicating that TNF α is synthesized inside Purkinje cells, likely due to the increased nuclear translocation of NF- κ B.

Both nuclear translocation of NF- κ B and increased content of TNF α in Purkinje neurons are reversed by blocking the signal transduction pathway TNFR1-TRADD/RIP1/TRAF2 associated to activation of the TNF α receptor TNFR1. This suggests that TNF α produced in glia activates TNFR1 in Purkinje neurons, inducing the translocation of NF- κ B to the nucleus, increased transcription of TNF α mRNA and synthesis of the TNF α protein.

In fact, the data reported show that hyperammonemia induces the synthesis of TNF α in activated microglia and astrocytes at 2 weeks of hyperammonemia, when TNF α is not increased in Purkinje cells. We also show that 1 week of hyperammonemia both microglia and astrocytes are activated but TNF α expression is not yet induced. This indicates that the process would follow a time-course in which hyperammonemia induces activation of microglia and astrocytes at 1 week. This is followed by induction of TNF α in both types of glial cells (but not in Purkinje cells) at 2 weeks. The TNF α released by glial cells would activate TNFR1 in Purkinje neurons leading to induction of TNF α expression.

It is also shown that blocking peripheral TNF α with anti-TNF α (infliximab) prevents activation of microglia and astrocytes and induction of TNF α , indicating that peripheral TNF α and inflammation trigger glial activation and all the above process leading to TNF α expression in Purkinje neurons.

TNF α synthesis in neurons has been already reported in some pathological situations, including spinal cord injury (Ohtori *et al.*, 2004), stroke (Liu *et al.*, 1994), and sciatic nerve injury (Schäfers *et al.*, 2003). TNF α and IL1 β are expressed in hippocampal neurons in vivo in response to lesions (Tchélingérian *et al.*, 1996) or to pneumococcal meningitis (Izadpanah *et al.*, 2014). In situ hybridization studies show that in murine pneumococcal meningitis TNF α mRNA was first upregulated in astroglial cells but at 18-24 hours was strongly increased in hippocampal neurons (Izadpanah *et al.*, 2014). TNF α mRNA and protein expression are also induced in neurons in hippocampus of rats with hepatic encephalopathy (Dadsetan *et al.*, 2016b). *Phoneutria nigriventer* spider venom causes blood-brain barrier permeability and induces the expression of TNF α in Purkinje neurons in rats (da Cruz-Höfling *et al.*, 2009).

These studies support that induction of TNF α expression in neurons, including Purkinje neurons may occur in different pathological situations and would be preceded by TNF α induction in glial cells. However, the underlying mechanisms remained unclear.

We show here that sustained hyperammonemia and peripheral inflammation induce TNF α expression in Purkinje neurons in rats and in patients died after chronic liver cirrhosis and hyperammonemia. Moreover, we provide some insights on the time-course and mechanisms involved in this process. Hyperammonemia induces activation of microglia and astrocytes at 1 week. This is followed by induction of TNF α in both types of glial cells (but not in Purkinje cells) at 2 weeks. The TNF α released by glial cells would activate TNFR1 in Purkinje neurons leading to nuclear translocation of NF- κ B and induction of TNF α expression.

Induction of TNF α by sustained hyperammonemia may contribute to the neurological alterations in hyperammonemia and hepatic encephalopathy by altering the function of Purkinje neurons, neurotransmission and by inducing neuronal death.

Trafficking and surface membrane expression of AMPA and NMDA receptors is altered by high levels of TNF α . (Beattie *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 2008; Wheeler *et al.*, 2009; Weaver-Mikaere *et al.*, 2013; Olmos and Lladó, 2014). Increased TNF α may alter membrane expression and function of AMPA and NMDA receptors in Purkinje neurons, thus altering their activity and associated neurotransmission. This may contribute to the impaired motor function in hyperammonemia and hepatic encephalopathy.

Moreover, TNF α has been shown to induce excitotoxicity-mediated neuronal loss in some neurodegenerative diseases (Clark and Vissel, 2016). Under neuroinflammatory conditions, TNF α induces glutamate release from microglia and astrocytes via TNFR1 stimulation, induction of glutaminase and increased synthesis and release of glutamate. TNF α also inhibits glutamate uptake in astrocytes increasing even more extracellular glutamate levels (Olmos and Lladó, 2014). Furthermore, in neurons TNF α , via TNFR1, rapidly increases the excitatory synaptic strength, inducing an excessive calcium entry producing excitotoxic neuronal death (Olmos and Lladó, 2014). Increased TNF α may also contribute to the degeneration of Purkinje neurons in cerebellum of patients died with liver cirrhosis reported recently by our group (Balzano *et al.*, 2018a and b).

The results obtained in the second chapter of this thesis are summarized in Figure 3. In summary, this study shows that sustained (but not short term) hyperammonemia induces TNF α expression in Purkinje neurons, which would be due to activation of TNFR1 by TNF α produced in glia (and later also by the TNF α produced in Purkinje) which would induce nuclear translocation of NF- κ B and induction of TNF α mRNA transcription. Induction of TNF α in Purkinje neurons would alter their function and contribute to altered neurotransmission and neurological impairment. TNF α is also induced in Purkinje neurons of patients died with liver cirrhosis, which would contribute to the loss of Purkinje cells in these patients. Induction of TNF α in Purkinje neurons of hyperammonemic rats is prevented by in vivo peripheral treatment with anti-TNF α or by ex-vivo treatment with R7050, which prevents transduction of signals from TNFR1 into Purkinje neurons, nuclear translocation of NF- κ B and induction of TNF α . This suggests that treatments to reduce peripheral inflammation or activation of NF- κ B may reduce the deleterious effects of sustained hyperammonemia and hepatic encephalopathy. The use of molecules inhibiting elements of the NF- κ B signaling pathway has been also suggested as therapeutic options in neurological disorders such as Multiple Sclerosis (Leibowitz and Yan,

2016), Parkinson disease (Ghosh *et al.*, 2007), Alzheimer disease (Jones and Kounatidis, 2017) or spontaneous intracerebral hemorrhage (King, Alleyne and Dhandapani, 2013).

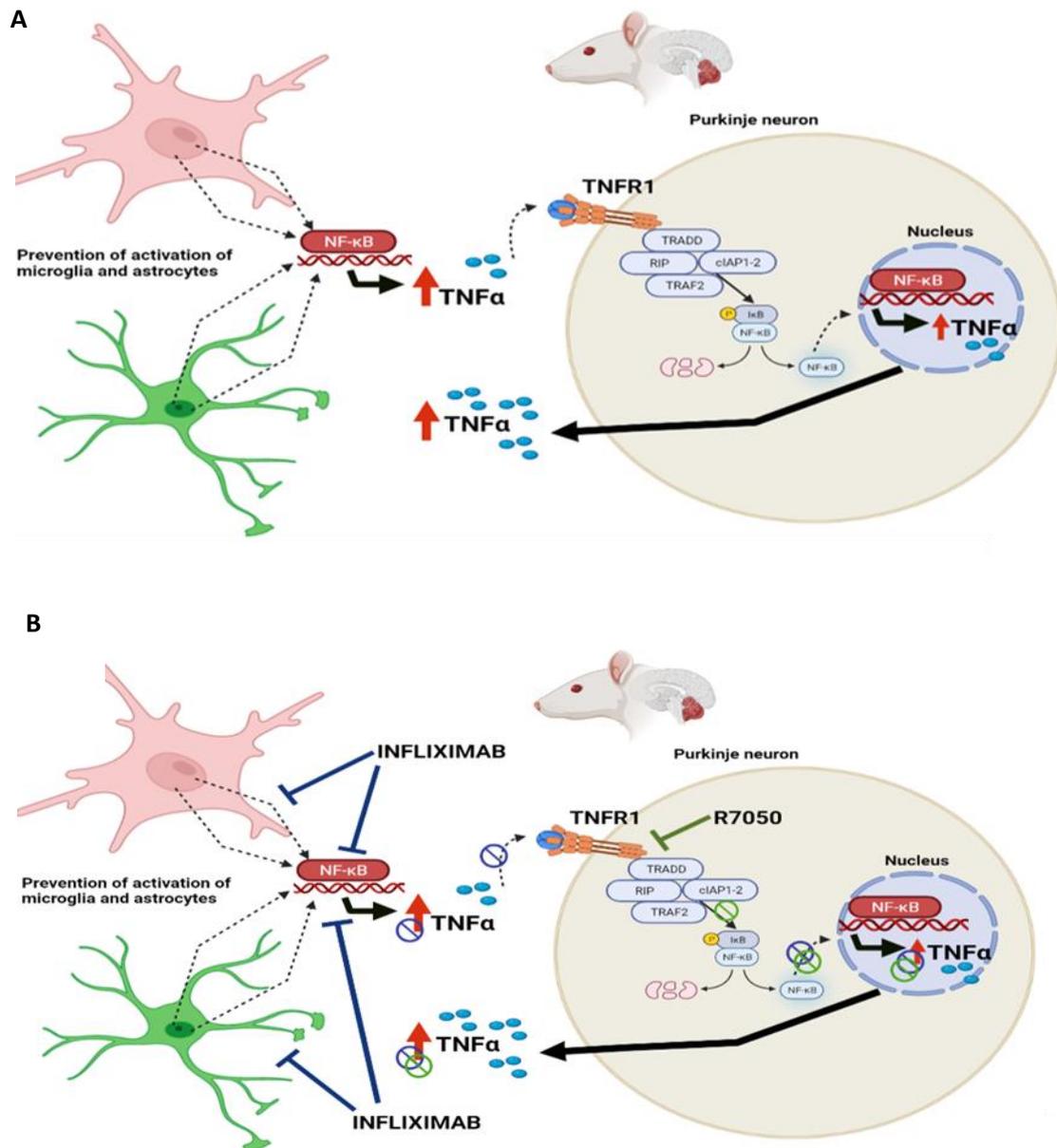


Figure 3. Proposed mechanisms by which chronic hyperammonemia increases TNF α in neurons and glial cells. **A)** Chronic hyperammonemia induces the activation of microglia and astrocytes in the white matter of the cerebellum. Activated glial cells increase the nuclear translocation of NF- κ B, which induces the transcription of pro-inflammatory TNF α . Glial TNF α binds to the TNFR1 receptor in Purkinje cells, leading to the activation of the NF- κ B pathway and TNF α synthesis in these neurons. **B)** Peripheral treatment with infliximab reduces glial cell activation and TNF α synthesis, which prevents the activation of the NF- κ B pathway and TNF α synthesis in Purkinje neurons. Finally, ex vivo treatment of cerebellar slices from hyperammonemic rats with R7050 shows that TNF α synthesis in glial cells and neurons is mediated by the activation of the TNFR1-TRAD/RIP1-NF- κ B pathway. The effects of hyperammonemia are indicated by red arrows (↑). The effects of infliximab and R7050 are indicated by the blue and green symbol respectively (⊖).

The above data indicate that increased TNF α and activation of TNFR1 play a key role in the induction of neuroinflammation and alterations in Purkinje neurons, but the detailed mechanisms of how hyperammonemia induces an increase in neurons are not well understood. In the next chapter we study these mechanisms. The activation of TNFR1 could increase S1P and the activation of S1PR2, which would contribute to the induction and maintenance of neuroinflammation and to alter neurotransmission. We study in the third chapter of this thesis if the activation of TNRF1 induces these alterations by enhancing the activation of the CCL2-CCR2-BDNF pathway as a consequence of the activation of sphingosine-1-phosphate receptors in the cerebellum of hyperammonemic rats.

CHAPTER 3

Enhanced activation of TNFR1 increases membrane expression and activation of S1PR2 in cerebellum of hyperammonemic rats, especially in Purkinje neurons.

Chronic hyperammonemia increases the content of S1PR2 in whole cerebellum compared to control rats, as assessed by Western blot. We analyzed by immunohistochemistry the cell types in which this increase occurs and found that S1PR2 increases especially in Purkinje neurons. Hyperammonemia also increased the membrane surface expression of S1PR2 compared to control rats. These data support the idea that activation of S1PR2 is increased in cerebellum of hyperammonemic rats, especially in Purkinje neurons.

We hypothesized that these changes in S1PR2 would be due to enhanced activation of the TNF α receptor TNFR1. To assess this hypothesis, we tested if blocking intracellular responses to TNFR1 activation with R7050 prevents the changes in S1PR2 *ex vivo* in freshly isolated slices from hyperammonemic rats. R7050 did not prevent the increase in the total content of S1PR2 in Purkinje neurons or in the whole cerebellum.

In contrast, R7050 completely reversed the increase in membrane expression of S1PR2, returning to normal levels. As only the S1PR2 exposed in the membrane surface may be activated by S1P, these data indicate that blocking signal transduction associated to TNFR1 activation completely prevents the enhanced activation of S1PR2 in cerebellum and Purkinje cells of hyperammonemic rats.

Double immunofluorescence with calbindin shows that TNFR1 is expressed in Purkinje neurons, allowing direct modulation of S1PR2 membrane expression in Purkinje neurons.

We assessed if hyperammonemia alters the levels of S1P, the agonist of S1PR2. The levels of S1P in cerebellum were not different in hyperammonemic rats and control rats. However, as the membrane expression of the receptor is remarkably increased in hyperammonemia, activation of associated signal transduction pathways is also increased.

Enhanced activation of S1PR2 increases CCL2, especially in Purkinje neurons. This leads to microglia and astrocytes activation in the cerebellum of hyperammonemic rats

One of the consequences of activation of S1PR2 is the enhanced production of the chemokine CCL2 (Oskeritzian *et al.*, 2015). Chronic hyperammonemia increases the content of CCL2 in whole cerebellum compared to control rats, as assessed by Western blot. CCL2 increases especially in Purkinje cells as assessed by immunohistochemistry. The increase in CCL2 in Purkinje neurons of hyperammonemic rats is reversed by blocking the S1PR2 with JTE-013, decreasing compared to control rats, thus confirming that it is mediated by enhanced activation of S1PR2. JTE-013 also normalized the content of CCL2 in whole cerebellum compared to control rats as assessed by Western blot. The fact that the increase in CCL2 in hyperammonemic

rats is reversed by blocking S1PR2 with JTE-013 supports that activation of S1PR2 is enhanced in hyperammonemia and this must be due to the enhanced S1PR2 membrane expression.

CCL2 content in hyperammonemic rats was also reduced by R7050 in Purkinje neurons and in whole cerebellum compared to control rats. This supports the idea that in hyperammonemic rats, enhanced activation of TNFR1 increases membrane expression of S1PR2, especially in Purkinje neurons and this increases the expression of CCL2.

It has been reported that CCL2 overexpression in brain promotes microglia and astrocytes activation (Joly-Amado *et al.*, 2020). To assess if excessive activation of S1PR2 is involved in induction of microglia and astrocytes activation in cerebellum of hyperammonemic rats we assessed if they are reversed by blocking the S1PR2 *ex vivo* with JTE-013 in freshly isolated slices. Hyperammonemic rats show activation of microglia in cerebellum. The area of microglia was reduced compared to control rats. Treatment with JTE-013 increased the area of microglia in hyperammonemic rats, indicating reduction of microglial activation.

Similar results were obtained for the perimeter of microglial cells. The perimeter of microglia was reduced compared to control rats. Treatment with JTE-013 increased the perimeter of microglia in hyperammonemic rats, indicating reduction of microglial activation.

Hyperammonemic rats also show activation of astrocytes in cerebellum, GFAP stained of the area, which was more than for control rats. Treatment with JTE-013 reduced the area stained by GFAP, indicating that it reverses activation of astrocytes in hyperammonemic rats.

The above data indicate that enhanced activation of S1PR2 plays a main role in the induction of microglia and astrocytes activation and neuroinflammation in cerebellum of hyperammonemic rats.

Increased levels of CCL2 activate CCR2 in microglia leading to microglia activation, increased membrane expression of P2X4R, phosphorylation of MAPK p38 and BDNF levels in microglia of hyperammonemic rats

It has been proposed that CCL2 contributes to microglial activation in neuropathic pain through activation of its receptor CCR2 in microglia. To assess if CCL2 released from Purkinje neurons in hyperammonemic rats mediates activation of microglia and/or astrocytes we tested if blocking the CCR2 receptor *ex vivo* with RS504393 reduces these activations. This treatment completely reversed microglial activation in hyperammonemic rats, increasing the area of microglia and the perimeter similar to those of control rats. In contrast, RS504393 did not reverse activation of astrocytes.

These data indicate that hyperammonemia increases membrane expression of S1PR2, increasing its activation, mainly in Purkinje neurons. This mediates activation of microglia and astrocytes, which are prevented by blocking the S1PR2 with JTE-013. The activation of microglia would be mediated by the enhanced production of CCL2 in Purkinje neurons, which activates its receptor CCR2 in microglia leading to microglial activation. Activation of astrocytes would be mediated by a different process, not involving the CCR2 receptor.

Hyperammonemia-induced neuroinflammation alters GABAergic neurotransmission in cerebellum leading to motor incoordination and reduced learning ability (Cauli *et al.*, 2009; Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a). We therefore aimed to identify signal transduction pathways by which activation of this S1PR2-CCL2-CCR2 pathway could contribute to induce neuroinflammation and alter neurotransmission in cerebellum of hyperammonemic rats.

Membrane expression of P2X4R is increased in hyperammonemic rats and this increase is reversed by blocking the S1PR2 with JTE-013 which reduces membrane expression of P2X4R compared to control rats. Blocking CCR2 and TNFR1 receptors with RS504393 and R7050, respectively also reduce membrane expression of P2X4R compared to control rats. This indicates that increased membrane expression of P2X4R of hyperammonemic rats is a consequence of enhanced activation of S1PR2 in Purkinje neurons, the release of CCL2 and activation of CCR2 in microglia.

Activation of MAPKp38 is associated to increased phosphorylation at the residues Thr180/Tyr182. Hyperammonemia increases phosphorylation of p38 compared to control rats. However, this phosphorylation is not reversed by treatments with JTE-013 or RS504393. In contrast, R7050 reduced p38 phosphorylation to normal levels. This indicates that hyperammonemia increases phosphorylation and activity of p38, but by mechanisms independent of S1PR2 and of CCR2 and dependent on TNFR1.

BDNF content was not increased in Purkinje neurons in hyperammonemic rats, but was increased in microglia and in whole cerebellum compared to control rats. This increase was completely reversed by treatment with JTE-013, RS504393 or R7050, indicating that it is mediated by activation of S1PR2, release of CCL2 by Purkinje neurons and activation of CCR2, but not by activation of p38.

Increased levels of BDNF induce activation of TrkB which increases membrane expression of KCC2, especially in Purkinje neurons

We then assessed the effects of hyperammonemia on KCC2. Hyperammonemia increases membrane expression of KCC2 compared to control rats. This increase is completely reversed by blocking S1PR2 with JTE-013, CCR2 with RS504393 or TNFR1 signaling with R7050, indicating that it is mediated by the activation of S1PR2, CCL2, activation of CCR2 in microglia and increased BDNF levels.

BDNF-induced changes in KCC2 would be mediated by activation of TrkB by BDNF in Purkinje neurons (Huang *et al.*, 2012). We then assessed the effects of hyperammonemia on the amount and membrane expression of TrkB. Hyperammonemia increases total amount of TrkB in whole cerebellum. Treatments with JTE-013 or RS504393 reduced the amount of TrkB in cerebellum of hyperammonemic rats.

Membrane expression of TrkB was increased in hyperammonemic rats compared to control rats and this increase was reversed by treatment with JTE-013, RS504393 or R7050.

We then assessed the effects of blocking TrkB receptors with ANA12 on all the steps of the process.

ANA12 did not reverse the increase in CCL2 in hyperammonemic rats, nor the increased membrane expression of CCR2 or P2X4R or the increase in BDNF content.

These data indicate that blocking TrkB with ANA12 did not prevent any of the effects occurring before TrkB activation. In contrast, ANA12 reversed the increase in hyperammonemic rats in content of TrkB and in membrane expression of TrkB and KCC2. This supports the idea that increased membrane expression of TrkB and KCC2 in cerebellum of hyperammonemic rats is a consequence of activation by BDNF of TrkB, most likely in Purkinje neurons.

The increased membrane expression of KCC2 would contribute to enhance GABAergic neurotransmission in cerebellum and induce motor incoordination in hyperammonemic rats.

Blockade of S1PR2 with JTE-013 in vivo reverses activation of the S1PR2-CCR2-BDNF-TrkB-KCC2 pathway in cerebellum and restores motor coordination in hyperammonemic rats

To assess if enhanced activation of S1PR2 plays a role in motor incoordination we tested whether blocking S1PR2 in vivo by continuous administration of JTE-013 through osmotic mini-pumps restores motor coordination in hyperammonemic rats. Hyperammonemic rats show motor incoordination in the beam walking. They performed more slips than control rats. Treatment with JTE-013 restored motor coordination in hyperammonemic rats, not different from control rats.

In vivo treatment with JTE-013 also reversed the increase in membrane expression of S1PR2, CCR2, P2X4R, TrkB and KCC2, as well as microglia and astrocytes activation, thus confirming that the results obtained above ex vivo reproduce the effects of blocking the S1PR2 in vivo.

This chapter shows that chronic hyperammonemia enhances activation of S1PR2 by increasing its membrane surface expression. This leads to increased CCL2 levels, especially in Purkinje neurons. CCL2 released by neurons activates CCR2 in microglia, leading to microglia activation and increased membrane expression of P2X4R and content of BDNF, which activates TrkB in Purkinje neurons, leading to increased membrane expression of KCC2. This would contribute to enhanced GABAergic neurotransmission, leading to motor incoordination. We show that blocking S1PR2 in vivo reverses all the steps of the above pathway and restores motor coordination in hyperammonemic rats, supporting that enhanced activation of the S1PR2-CCL2-BDNF-TrkB-KCC2 pathway contributes to motor incoordination in hyperammonemia.

Hyperammonemia increases both the total content and membrane expression of S1PR2. The increase in membrane expression of S1PR2 is reversed by R7050, indicating that it is mediated by enhanced activation of TNFR1 by TNF α . As only the S1PR2 exposed in the membrane surface may be activated by S1P, these data indicate that blocking signal transduction associated to TNFR1 activation completely prevents the enhanced activation of S1PR2 in cerebellum and Purkinje cells of hyperammonemic rats. This is further supported by the reversal by R7050 of the S1PR2-induced increase of CCL2.

The increase in the content and membrane expression of S1PR2 seem to occur mainly in Purkinje neurons, as indicated by the increased content of S1PR2 and of CCL2 (consequence of S1PR2 activation) in Purkinje neurons in hyperammonemic rats and by their reduction by blocking S1PR2 with JTE-013. It is therefore likely that enhanced activation of TNFR1 in Purkinje neurons triggers the trafficking of S1PR2 to the membrane and the increase in CCL2.

The increase in membrane expression of S1PR2 in hyperammonemic rats would explain its enhanced activation in spite of a lack of changes in the concentration of its agonist S1P. S1P level is tightly regulated by several enzymes, S1P is formed intracellularly by the phosphorylation of sphingosine, a process that is catalyzed by two sphingosine kinases: SPHK1 and SPHK2. S1P is also regulated by enzymes responsible for its degradation (S1P phosphatases and S1P lyase) (Adada *et al.*, 2013). Manipulating these enzymes could be used to modulate S1P levels. However, as S1P levels are not altered in hyperammonemia, it seems more convenient to act on S1PR2 to reverse the effects of its enhanced activation in hyperammonemia, as discussed below.

S1P may also act on intracellular targets (Adada *et al.*, 2013), however, the results reported here clearly show that the alterations are mainly due to enhanced activation of S1PR2 and not to changes in S1P or in its intracellular actions.

It should be noted that Kempf *et al.* (2014) reported that S1PR2 is also a receptor for Nogo-A- Δ 20. They showed that S1PR2 is expressed mainly in neurons, including Purkinje neurons in cerebellum and pyramidal neurons in hippocampus. Nogo-A- Δ 20 binds the S1PR2 at a different site than S1P and activates pathways leading to impairment of hippocampal LTP (Kempf *et al.*, 2014). Hyperammonemia-induced changes in Nogo-A- Δ 20 could also contribute to the enhanced activation of S1PR2 in cerebellum.

One of the consequences of activation of S1PR2 is the enhanced production of the chemokine CCL2. We show that CCL2 content is increased mainly in Purkinje neurons in hyperammonemic rats. Moreover, the increase in CCL2 is reversed by blocking S1PR2 with JTE-013 or TNFR1 signaling with R7050, indicating that it is mediated by the TNF α -TNFR1-S1PR2 pathway.

It has been reported that CCL2 promotes microglia activation through activation of its receptor CCR2 (Xu *et al.*, 2017). We show here that in hyperammonemic rats microglial activation in cerebellum is reversed by R7050, by JTE-013 and by RS504393 an antagonist of CCR2, indicating that it is mediated by enhanced activation of TNFR1 and of S1PR2 and by the subsequent increase in CCL2 and the increased activation of its receptor CCR2. Blocking CCR2 with RS504393 does not affect the increase of S1PR2 in Purkinje, of total content of S1PR2 in cerebellum or membrane expression of S1PR2. This indicates that activation of the S1PR2-CCL2 pathway in Purkinje neurons is necessary for glial activation in hyperammonemia and precedes CCR2 and microglia activation in cerebellum.

Other objective of this thesis was to identify signal transduction pathways involved in the effects of enhanced S1PR2 activation on neuroinflammation and neurotransmission. We hypothesized that in cerebellum of hyperammonemic rats, CCL2 released by neurons would

activate CCR2 in microglia, leading to microglia activation and increased membrane expression of P2X4R and content of BDNF, which would activate TrkB in Purkinje neurons, leading to increased membrane expression of KCC2, which would alter GABAergic neurotransmission, leading to motor incoordination.

We show here that hyperammonemia increases membrane expression of P2X4R, which is also reversed by R7050, by JTE-013 and by RS504393, indicating that it is mediated by enhanced activation of the TNFR1-S1PR2-CCL2-CCR2 pathway. We found that in cerebellum of hyperammonemic rats CCR2 is mainly expressed in microglia. This suggests that CCL2 released from Purkinje neurons would activate CCR2 in microglia, leading to translocation of P2X4R to the cell membrane, which would result in increased activation of P2X4R. This agrees with a report from Toyomitsu *et al.* (2012) showing in primary cultures of microglia that CCL2 promotes P2X4 receptor trafficking to the cell membrane.

The P2X4R-induced synthesis of BDNF in microglia has been clearly demonstrated in neuropathic pain and it has been proposed to be mediated by calcium influx and activation of p38 MAP kinase (Trang *et al.*, 2009). Here we show that in cerebellum of hyperammonemic rats there is an increase of P2X4R in the membrane surface and in the content of BDNF.

BDNF is initially synthesized as a precursor (proBDNF), which is cleaved into a mature isoform (mBDNF) by intracellular or extracellular proteases. The BDNF isoforms, pro-BDNF and mBDNF, bind to different receptors to mediate divergent neuronal actions. Pro-BDNF preferentially interacts with p75, while mBDNF selectively binds and activates its specific TrkB receptor (Hurtado *et al.*, 2017). In this thesis we focus on mature BDNF and its action on TrkB.

The increase of BDNF occurs in microglia but not in Purkinje neurons of hyperammonemic rats, supporting that it would be due to activation of CCR2 and of P2X4. However, the increase in BDNF is not mediated by increased phosphorylation of p38. The hyperammonemia-induced increase of BDNF is reversed by R7050, JTE-013 and RS504393, indicating that it is mediated by activation of TNFR1, S1PR2 and CCR2. Hyperammonemic rats also show increased phosphorylation of p38 in cerebellum, however, this increase is not reversed by JTE-013 or RS504393 but is completely reversed by R7050. This indicates that increased phosphorylation of p38 is due to enhanced activation of TNFR1 but not to activation of S1PR2 or CCR2. As these treatments reverse the increase in BDNF but not of phosphorylation of p38, this indicates that the increase in BDNF is not mediated by increased phosphorylation of p38.

We show that chronic hyperammonemia increases the total content of TrkB and that blocking TrkB with ANA12 reverses this increase, returning to normal values in 30 min. This suggests that the excess of TrkB is rapidly degraded likely by induction of activity of a protease. A similar rapid degradation of TrkB has been reported following incubation of cultured hippocampal neurons with glutamate or NMDA, which increases intracellular calcium leading to a rapid activation of the calcium-dependent protease calpain that rapidly degrades TrkB, reducing its content by 40-50% in 30-60 min (Gomes *et al.*, 2012; Tejada *et al.*, 2016 and 2019). A similar mechanism could be involved in the downregulation of TrkB by ANA12 in hyperammonemic rats.

The increase in BDNF in cerebellum would contribute to the enhanced inhibitory neurotransmission reported in hyperammonemia (Cauli *et al.*, 2009). Enhanced activation of TrkB by BDNF would alter GABAergic neurotransmission by inducing changes in the neuronal K-Cl co-transporter KCC2. It is well established that the BDNF-TrkB-KCC2 pathway plays a main role in altered inhibitory neurotransmission in neuropathic pain. Ferrini and De Koninck, 2013 propose that in neuropathic pain BDNF released from microglia, activates TrkB-mediated signals in neurons, leading to downregulation of KCC2, disrupting Cl⁻ homeostasis, leading to altered GABAergic and glycinergic neurotransmission. However, Lee-Hotta *et al.* (2019) proposed later that BDNF may increase or decrease KCC2 expression and function depending on the intracellular pathways activated.

Activation of TrkB by BDNF also modulates inhibitory neurotransmission in Purkinje neurons (Drake-Baumann *et al.*, 2005). Cheng and Yeh, (2005) showed that in cerebellar slices, addition of BDNF potentiates GABA_A receptor function in cerebellar Purkinje cells via the TrkB receptor. The increase in GABAergic neurotransmission observed in cerebellum of hyperammonemic rats could be mediated, at least in part, by the increased levels of BDNF and activation of TrkB in Purkinje neurons, leading to enhanced membrane surface expression and function of KCC2.

The intracellular concentration of Cl⁻ ions is regulated by KCC2 membrane transporter extruding Cl⁻ regulating the influx of Cl⁻. KCC2 is a neuron-specific chloride-extruding K⁺-Cl⁻ cotransporter. In cerebellum, Purkinje neurons express only KCC2. GABA-mediated fast-hyperpolarizing inhibition depends on extrusion of chloride by KCC2. KCC2-mediated K-Cl co-transport determines the electrochemical gradient of chloride ions in neurons, thus determining the efficacy or even the polarity of synaptic GABAergic and glycinergic neurotransmissions which both rely on chloride fluxes, their polarity and functional impact are therefore dependent on the magnitude of the transmembrane gradients of chloride (Chamma *et al.*, 2012; Tillman and Zhang, 2019). Up-regulation of KCC2 increases the efficacy of neuronal Cl⁻ extrusion (Rivera, Voipio and Kaila, 2005). Increased membrane expression of KCC2 in neurons of hyperammonemic rats would enhance its activity and Cl⁻ extrusion, resulting in reduced intracellular Cl⁻ concentration and increased Cl⁻ gradient between the intra- and extracellular compartments of Purkinje neurons which, in turn, would enhance the responses to activation of GABA_A receptors. A similar increase in the magnitude of GABAergic response due to upregulation of KCC2 activity has been reported by Granados-Rojas *et al.* (2020) who propose that the increase of KCC2 could be responsible for the beneficial effect of ketogenic diet in diseases where the GABAergic system is altered, by increasing its inhibitory efficiency.

In addition to the effects on KCC2, the enhanced activation of the S1PR2-CCL2-CCR2 pathway would also enhance GABAergic neurotransmission in hyperammonemia by contributing to the reversal of the function of the GABA transporter GAT3. It has been shown that in hyperammonemic rats, neuroinflammation and activation of microglia increases glutaminase I level and glutamate formation, leading to increased extracellular glutamate. The increased uptake of glutamate and Na⁺ by glutamate transporters alters the Na⁺ gradient in activated astrocytes, leading to reversal of the function of GAT3, which instead of taking up GABA from the extracellular fluid, releases GABA, increasing extracellular GABA and GABAergic tone,

which contributes to motor incoordination (Hernandez-Rabaza *et al.*, 2016a). As S1PR2 overactivation induces microglia activation in cerebellum of hyperammonemic rats, this will contribute to the reversal of GAT3 function by the process detailed above.

The results reported show that chronic hyperammonemia enhances activation of S1PR2 by increasing its membrane surface expression. This leads to increased CCL2 levels, especially in Purkinje neurons. CCL2 released by neurons activates CCR2 in microglia, leading to microglia activation and increased membrane expression of P2X4R and content of BDNF, which activates TrkB in Purkinje neurons, leading to increased membrane expression of KCC2. This in turn will enhance both GABAergic and glycinergic neurotransmission, which is responsible for impairment of learning of a conditional task in the Y maze and for motor incoordination in hyperammonemic rats (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

The results obtained in the third chapter of this thesis are summarized in Figure 4. The results reported may have clinical relevance. They suggest that the function of the S1PR2-CCL2-CCR2-BDNF-KCC2 pathway would be also increased in patients with MHE, showing also similar levels of chronic hyperammonemia than the rats used in this work. Moreover, the results support the idea that blocking the S1PR2-CCL2-CCR2-BDNF-KCC2 pathway by inhibiting the overactivation of the S1PR2 with specific antagonists such as JTE would improve inhibitory neurotransmission and motor incoordination and learning ability in patients with hyperammonemia and MHE. Moreover, it is likely that similar beneficial effects could be obtained by reducing overactivation of the S1PR2-CCL2-CCR2-BDNF-KCC2 pathway at any other step such as for example the CCR2 receptor. There is increasing evidence for the therapeutic potential of S1PR2 antagonists, which seem to be promising tools for different pathologies. Blankenbach *et al.* (2016) propose that selective S1PR2 receptor antagonists might be helpful in pulmonary hypertension, chronic obstructive pulmonary disease, lung fibrosis, portal hypertension and liver fibrosis. They also suggest a possible beneficial effect in type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis. Reducing activation of S1PR2 has also been proposed to improve multiple sclerosis (Seyedsadr *et al.*, 2019), stroke (Kim *et al.*, 2015) and for rescuing the peri-infarct lesion in cerebral ischemia (Matsumoto *et al.*, 2020).

The results reported show that S1PR2 antagonists have beneficial effects to reduce glial activation and neuroinflammation and improve inhibitory neurotransmission in cerebellum and motor incoordination in chronic hyperammonemia and, likely, in liver cirrhosis patients and MHE.

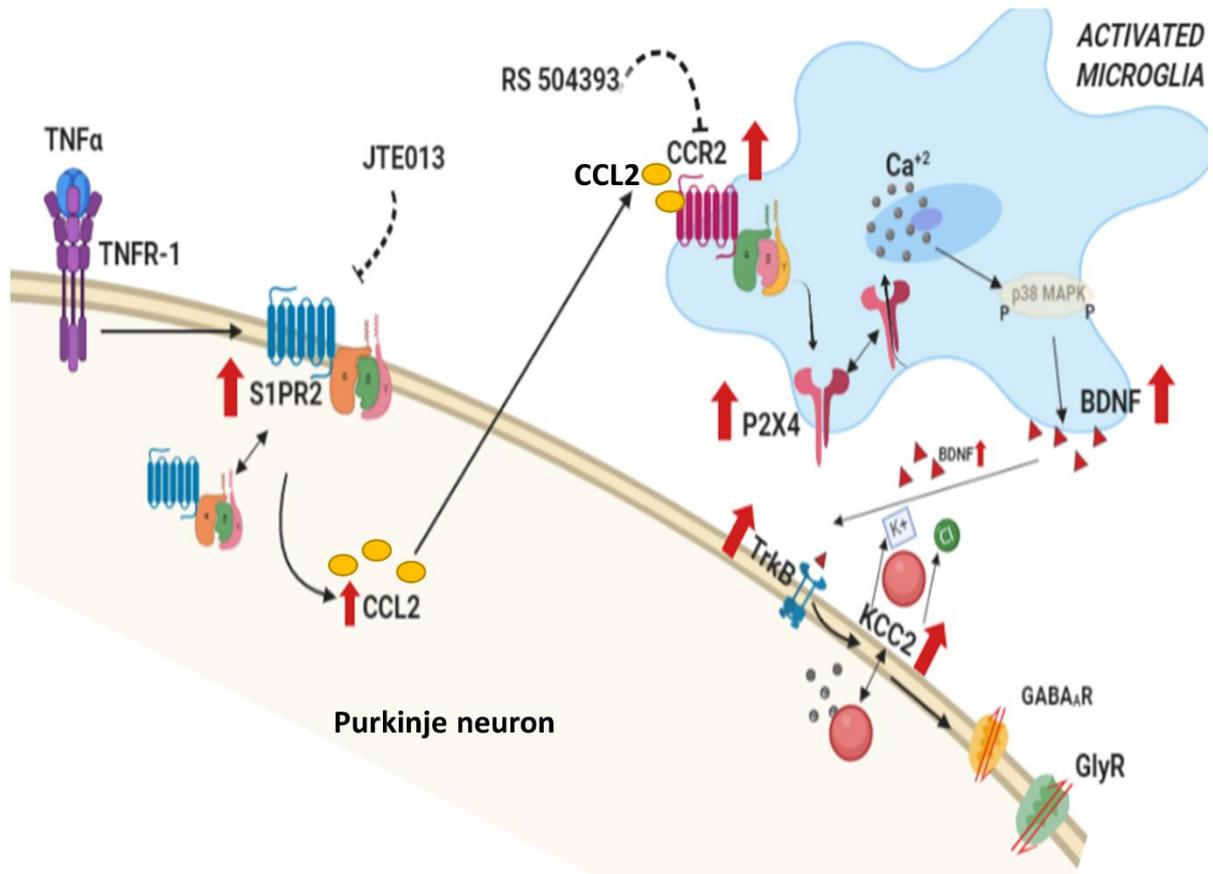


Figure 4. Proposed pathway by which enhanced activation of the TNFR1-S1PR2-CCR2-TrkB pathway induces neuroinflammation and alters inhibitory neurotransmission in cerebellum of hyperammonemic rats. Membrane expression and activation of TNFR1 and S1PR2 are enhanced mainly in Purkinje neurons of hyperammonemic rats, leading to increased formation of CCL2. CCL2 released by Purkinje neurons activates its receptor CCR2 in microglia, leading to activation of microglia with increased surface expression of CCR2 and P2X4 receptor and increased BDNF synthesis. BDNF released from microglia, activates TrkB-mediated signals in neurons, leading to increased membrane expression of KCC2, which alters the transmembrane Cl⁻ gradient, resulting in enhanced GABAergic and glycinergic neurotransmission. The effects of hyperammonemia are indicated by red arrows (↑).

CONCLUSIONS

1. Glycinergic neurotransmission modulates neuroinflammation in cerebellum. This opens up new possibilities to reduce neuroinflammation by acting on glycine receptors.
2. In hyperammonemic rats, increased glycinergic neurotransmission leads to reduced membrane expression of ADAM17, resulting in increased membrane expression and activation of TNFR1 and of the associated pro-inflammatory NF- κ B pathway.
3. This leads to increased expression in Purkinje neurons of TNF α , IL-1 β , HMGB1 and glutaminase I. Increased glutaminase activity leads to increased extracellular glutamate, leading to increased extracellular GABA concentration. This altered neurotransmission leads to motor incoordination. The increase in extracellular glutamate and HMGB1 would enhance microglial activation by acting on the TLR4 and NMDA receptors, respectively.
4. Reducing glycine receptors activation with strychnine or by increasing extracellular cGMP reverses activation of the above ADAM17-TNFR1-NF- κ B pathway in hyperammonemic rats. This supports that the increase in glycinergic neurotransmission in hyperammonemia is due to the reduced levels of extracellular cGMP which enhance activation of the glycine receptor. These results suggest that glycine receptor or the steps of the ADAM17-TNFR1-NF- κ B pathway could be new therapeutic targets for the treatment of motor incoordination and other neurological alterations due to increased glycinergic and/or GABAergic neurotransmission in chronic hyperammonemia, hepatic encephalopathy and other pathologies associated with neuroinflammation.
5. Sustained (but not short-term) hyperammonemia induces TNF α expression in Purkinje neurons. This is due to the activation of TNFR1 by TNF α produced in glia (and later also by TNF α produced in Purkinje cells), which induces nuclear translocation of NF- κ B and enhances transcription of the mRNA for TNF α .
6. TNF α is also induced in Purkinje neurons of patients who die with liver cirrhosis. This would contribute to the loss of Purkinje cells in these patients.
7. Induction of TNF α in Purkinje neurons of hyperammonemic rats is prevented in vivo by peripheral treatment with an anti-TNF α antibody (Infliximab) and ex vivo by treatment with R7050, which prevents signal transduction of TNFR1, nuclear translocation of NF- κ B and induction of TNF α in Purkinje neurons. This supports that treatments that reduce peripheral inflammation or NF- κ B activation may reduce the deleterious effects of sustained hyperammonemia and hepatic encephalopathy.
8. Chronic hyperammonemia induces the activation of S1PR2 by increasing its membrane expression. This leads to increased CCL2 levels, especially in Purkinje neurons. CCL2 released by neurons activates CCR2 in microglia, leading to microglial activation and increased membrane expression of P2X4R and BDNF content, which activates TrkB in Purkinje neurons, leading to increased membrane expression of KCC2.

9. This, in turn, would alter both GABAergic and glycinergic neurotransmission, leading to motor incoordination in hyperammonemic rats.

10. Blocking S1PR2 with JTE-013 reduces glial activation and neuroinflammation and improves inhibitory neurotransmission in cerebellum and motor incoordination in rats with chronic hyperammonemia.

11. Blocking the S1PR2-CCL2-CCR2-BDNF-TrkB pathway at any of its steps would improve inhibitory neurotransmission and motor incoordination in hyperammonemic rats. Compounds targeting any step of the S1PR2-CCL2-CCR2-BDNF-TrkB pathway could improve motor coordination in patients with liver cirrhosis and hepatic encephalopathy.

ÍNDICE Y ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN	1
1. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA	3
1.1. Patogénesis de la EHM: sinergia entre hiperamonemia e inflamación periférica en la inducción de neuroinflamación y deterioro neurológico	4
1.2. Modelos animales de EHM crónica.....	5
1.2.1. Modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático	5
1.3. Metabolismo del amonio y ciclo glutamato-glutamina	6
2. ALTERACIONES DE LA NEUROTRANSMISIÓN EN HIPERAMONEMIA Y EH.....	8
2.1. Efectos de la hiperamonemia sobre los transportadores de glutamato, glutamina y GABA	8
2.2. Neurotransmisión glutamatérgica. Alteraciones en hiperamonemia.....	9
2.3. Neurotransmisión GABAérgica. Alteraciones en hiperamonemia.....	10
2.4. Neurotransmisión glicinérgica. Alteraciones en hiperamonemia.....	11
3. EL CEREBELO: ESTRUCTURA	15
3.1. Célula de Purkinje	17
3.2. Las funciones motoras y cognitivas moduladas por el cerebelo se alteran de forma temprana en hiperamonemia y EHM	18
4. PAPEL DE LA INFLAMACIÓN PERIFÉRICA EN LA EHM	19
5. NEUROINFLAMACIÓN	21
5.1. Células gliales: Microglía y astrocitos.....	21
5.2. Papel de la neuroinflamación en la inducción del deterioro neurológico en EHM	24
5.3. Vía de señalización TNF α -TNFR1-NF- κ B	26
5.4. Vía CCL2-CCR2. Papel en la neuroinflamación.....	29
5.4.1. CCL2-CCR2 en el cerebro.....	30
5.5. BDNF. Vía de señalización BDNF-TrkB-KCC2	32
5.5.1. BDNF y neuroinflamación.....	33
5.5.2. Modulación de la neurotransmisión por BDNF.....	35
6. VÍA CCL2-BDNF EN MICROGLÍA ACTIVADA Y SU EFECTO SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN INHIBITORIA	35
7. ESFINGOLÍPIDOS: PAPEL DE LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO EN LA NEUROINFLAMACIÓN	37
7.1. S1P, un esfingolípido de señalización	39
7.2. Modulación de vías de transducción de señales por S1P	39
7.3. Papel de S1P en neuronas y en células gliales	40
7.4. Papel de S1P en procesos patológicos.....	41
8. GMPC EXTRACELULAR. PAPEL EN LAS ALTERACIONES INDUCIDAS EN CEREBELO POR LA HIPERAMONEMIA CRÓNICA Y EN ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA	43
8.1. Funciones fisiológicas del GMPC extracelular	44
8.2. Vía de señalización Glutamato-Óxido nítrico- GMPC en el cerebelo	45
8.3. Modulación de la neurotransmisión por GMPC extracelular en cerebelo	45
8.4. Modulación de la neuroinflamación por GMPC extracelular	47

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	49
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
1. MODELO ANIMAL DE HIPERAMONEMIA CRÓNICA SIN FALLO HEPÁTICO	57
1.1. Tratamiento con infliximab	57
2. MUESTRAS HUMANAS POST MORTEM	58
3. EXPERIMENTOS EX VIVO EN CORTES FRESCOS DE CEREBELO	58
4. ANÁLISIS DEL CONTENIDO Y FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS Y DE LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE TRANSPORTADORES Y RECEPTORES POR WESTERN BLOT	60
5. ANÁLISIS DE NEUROINFLAMACIÓN MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA	63
5.1. Preparación del tejido	63
5.2. Inmunohistoquímica	64
5.3. Inmunofluorescencia	65
5.4. Hibridación in situ por fluorescencia (FISH) de TNF α	67
5.4.1. Cuantificación del mRNA de TNF α por la técnica FISH.....	67
6. ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES DE INMUNOHISTOQUÍMICA	68
6.1. Análisis de la activación de microglía.....	68
6.2. Análisis de la activación de astrocitos (GFAP).....	68
6.3. Análisis del contenido de TNF α , IL-1 β , HMGB1, Glutaminasa, CCL2 y BDNF en sustancia blanca o neuronas de Purkinje.....	68
6.4. Análisis de la distribución subcelular de NF- κ B p50 y p65	69
6.5. Análisis de expresión de NF- κ B y TNF α en microglía y astrocitos.....	69
7. MICRODIÁLISIS EN CEREBELO IN VIVO.....	70
8. DETERMINACIÓN DE GLUTAMATO Y GABA EXTRACELULAR POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) EN MUESTRAS DE MICRODIÁLISIS DEL CEREBELO.....	71
9. EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES MOTORAS	71
9.1. Procedimiento quirúrgico: implantación de mini-bombas osmóticas	71
9.2. Beam Walking Test: coordinación motora.....	72
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	73
CAPÍTULO 1: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	75
RESULTADOS	77
1. EL AUMENTO DE LA NEUROTRANSMISIÓN GLICINÉRGICA INDUCE NEUROINFLAMACIÓN EN CEREBELO DE RATAS HIPERAMONÉMICAS. EL GMPC EXTRACELULAR REDUCE LA NEUROINFLAMACIÓN REDUCIENDO LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE GLICINA.....	77
1.1. El GMPc extracelular reduce la activación de astrocitos y microglía y normaliza la expresión en membrana de ADAM17 y TNFR1 en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas.....	78

1.2. El GMPc extracelular normaliza el contenido nuclear de NF- κ B y los niveles de glutaminasa, TNF α , IL1 β y HMGB1 en neuronas de Purkinje de ratas hiperamonémicas	81
1.3. El bloqueo del receptor de glicina reduce la activación de astrocitos y microglía en el cerebelo de ratas hiperamonémicas	84
1.4. La estricnina normaliza el contenido de TNF α e IL1 β en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas	85
1.5. El receptor de glicina se localiza principalmente en las neuronas de Purkinje	86
1.6. El bloqueo del receptor de glicina normaliza la expresión en membrana del receptor TNF α TNFR1 a través de un mecanismo dependiente de PKC y ADAM17	86
1.7. La estricnina normaliza el contenido nuclear de NF- κ B y los niveles de glutaminasa, TNF α , IL1 β y HMGB1 en las neuronas de Purkinje de ratas hiperamonémicas	88
1.8. La estricnina reduce la concentración extracelular de glutamato y GABA y la expresión en membrana de GAT3 en el cerebelo de ratas hiperamonémicas	90
DISCUSIÓN	93
<i>CAPÍTULO 2: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</i>	99
RESULTADOS	101
1. LA HIPERAMONEMIA SOSTENIDA, PERO NO A CORTO PLAZO, INDUCE TNF α EN LAS NEURONAS DE PURKINJE EN RATAS HIPERAMONÉMICAS	101
1.1. El tratamiento periférico con infliximab previene la neuroinflamación en cerebelo de las ratas hiperamonémicas.....	102
1.2. La expresión del ARNm de TNF α aumenta en cerebelo a las 4 semanas de hiperamonemia y se normaliza con infliximab	106
1.3. El infliximab previene la translocación nuclear de las subunidades p50 y p65 de NF- κ B en neuronas de Purkinje y células gliales en hiperamonemia crónica	107
1.4. La translocación nuclear de NF- κ B y el aumento de TNF α son revertidos por R7050, lo que indica que están mediados por la activación de TNFR1	109
1.5. El TNF α aumenta en las células gliales, pero no en las neuronas de Purkinje en cerebelo a las 2 semanas de hiperamonemia	112
1.6. R7050 normaliza la expresión de p50 en microglía y astrocitos en la sustancia blanca de ratas a las 2 semanas de hiperamonemia	115
1.7. El TNF α y la activación de NF- κ B no aumentan en ratas hiperamonémicas a 1 semana de hiperamonemia.....	117
1.8. Activación de microglía y astrocitos en cerebelo de ratas hiperamonémicas a 1 semana de hiperamonemia.....	117
1.9. Los pacientes cirróticos presentan un aumento de TNF α en las neuronas de Purkinje.....	119

DISCUSIÓN	121
<i>CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</i>	<i>125</i>
RESULTADOS	127
1. LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR 2 DE ESFINGOSINA-1-FOSFATO (S1PR2) ESTÁ AUMENTADA EN CEREBELO DE RATAS HIPERAMONÉMICAS E INDUCE NEUROINFLAMACIÓN Y ALTERACIONES EN LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA Y GLICINÉRGICA	127
1.1. La expresión en membrana y la activación de S1PR2 aumentan en cerebelo de ratas hiperamonémicas, especialmente en las neuronas de Purkinje.....	127
1.2. En ratas hiperamonémicas, la activación de TNFR1 y el aumento de la expresión en membrana de S1PR2 inducen un aumento de CCL2, especialmente en las neuronas de Purkinje, que contribuye a la activación de microglía	129
1.3. La activación de S1PR2 desempeña un papel en la inducción de neuroinflamación y activación de microglía y astrocitos en el cerebelo de ratas hiperamonémicas	131
1.4. El aumento de la expresión en membrana de P2X4R en ratas hiperamonémicas es una consecuencia de la activación de S1PR2 en las neuronas de Purkinje, la liberación de CCL2 y la activación de CCR2 en microglía	134
1.5. La hiperamonemia aumenta la fosforilación y la actividad de la MAPKp38, pero por mecanismos independientes de S1PR2 y de CCR2 y dependientes de TNFR1	135
1.6. La hiperamonemia aumenta el contenido de BDNF en microglía en el cerebelo, pero no en las neuronas de Purkinje.....	136
1.7. La activación de S1PR2, CCL2, activación del CCR2 en microglía y la activación de TrkB por el aumento de los niveles de BDNF conducen a un aumento de la expresión en membrana de KCC2	137
1.8. El bloqueo de S1PR2 con JTE-013 in vivo revierte la activación de la vía S1PR2-CCR2-BDNF-TrkB-KCC2 y restaura la coordinación motora en ratas hiperamonémicas	140
DISCUSIÓN	143
<i>DISCUSIÓN GENERAL</i>	<i>147</i>
<i>CONCLUSIONS.....</i>	<i>151</i>
<i>BIBLIOGRAFÍA.....</i>	<i>155</i>

ABC	Transportador dependiente de ATP
ABCC	Del inglés “ <i>ATP-Binding Casette transporters, family C</i> ”
ADAM17/TACE	Del inglés “ <i>Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme</i> ”
AF	Fibras aminérgicas
AKT	<i>Proteína</i> quinasa B
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ANP	Péptido atrial natriurético
AP-1	Proteína activadora 1
APS	Persulfato de amonio
ATC	Ácido taurocólico
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BCIP	Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BDL	Ligadura del conducto biliar
BDNF	Actor neurotrófico derivado del cerebro
BHE	La barrera hematoencefálica
BMSC	Células madre mesenquimales de médula ósea
BS3	Del inglés “ <i>bis-sulfosuccinimidyl-suberate</i> ”
BSA	Albumina de suero bovino
CaMKII	Proteína quinasa II dependiente de calmodulina
CCC	Cotransportadores electroneutros acoplados a cloro
CCL2	Del inglés “ <i>C-C Motif Chemokine Ligand 2</i> ” o MCP-1 del inglés “ <i>monocyte chemotactic protein-1</i> ”
CCL20	Del inglés “ <i>C-C Motif Chemokine Ligand 20</i> ”
CCR2	Del inglés “ <i>C-C Motif Chemokine Receptor 2</i> ”
CerK	Ceramida quinasa
CerS	Ceramida sintasa
CF	Fibras trepadoras. Del inglés “ <i>climbing fiber</i> ”
cIAP1	Inhibidor de la proteína de apoptosis 1
cIAP2	Inhibidor de la proteína de apoptosis 2
COX	Ciclooxigenasa
CRDs	Dominio rico en cisteína
CREB	Del inglés “ <i>cAMP response element-binding</i> ”
DAB	Diaminobenzidina
DAMP	Moléculas de patrones moleculares asociadas al daño
DD	Dominio de muerte
DISC	Del inglés “ <i>death-inducing signaling complex</i> ”
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAAT	Del inglés “ <i>excitatory amino acid transporter</i> ”
EGR-3	Proteína de respuesta temprana al crecimiento 3
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-N', N', N', N'-tetraacético
EH	Encefalopatía hepática
EHM	Encefalopatía hepática mínima
EP	Enfermedad de Parkinson

ÍNDICE Y ABREVIATURAS

ERK	Proteína cinasas activadas por mitógenos
FADD	Dominio de muerte asociado a FAS
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA _A	Receptor de GABA tipo A
GABA _B	Receptor de GABA tipo B
GABA _C	Receptor de GABA tipo C
GAD	Enzima glutamato descarboxilasa
GAT-1	Transportador de GABA 1
GAT-3	Transportador de GABA 1
GC	Guanilato ciclasa
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLAST	Transportador de glutamato/aspartato
GLT-1/EAAT2	Del inglés “ <i>excitatory amino acid transporter2</i> ”
GluA1	Subunidad 1 del receptor AMPA
GluA2	Subunidad 2 del receptor AMPA
GlyRs	Receptores de glicina
GLYT1	Transportador de glicina tipo 1
GLYT2	Transportador de glicina tipo 1
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GTP	Guanosín trifosfato
GTP	Guanosín trifosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HMGB1	Proteína 1 del grupo de alta movilidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IBA1	Del inglés “ <i>ionized calcium binding adaptor molecule 1</i> ”
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
ILs	Interleucinas
JNK	Quinasa c-Jun
KCC2	Del inglés “ <i>potassium chloride cotransporter 2</i> ”
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LPS	Lipopolisacárido
LTD	Depresión a largo plazo (long term depression)
LTP	Potenciación a largo plazo (long term potentiation)
MAPKp38	MAP quinasa p38
M1	Fenotipo microglia pro-inflamatorio
M2	Fenotipo microglia anti-inflamatorio
MF	Fibras musgosas
MMP	Metaloproteinasas
MRP	Proteínas de resistencia a drogas
MVB	Cuerpos multivesiculares
NASH	Esteatohepatitis no-alcohólica
NBT	Del inglés “ <i>nitroblue tetrazolium</i> ”

NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NH ₄ ⁺	Ión amonio
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetasa neuronal
NT	Neurotrofinas
OPA	Dialdehído ftálico
PB	Tampón fosfato
PBS	Tampón fosfato salino
PCS	Anastomosis porta-cava
PDE	Fosfodiesterasas
PFA	Paraformaldehído
PHES	Del inglés " <i>Psychometric Hepatic Encephalopathy Score</i> "
PI3K	Fosfatidilinositol-3-OH quinasa
PKC	Proteína quinasa C
PLC-γ	Fosfolipasa C-gamma
PMA	Del inglés " <i>phorbol-12-myristate-13-acetate</i> "
PRX	Del inglés " <i>protein periaxin</i> "
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RIP	Del inglés " <i>receptor-interacting protein</i> "
S1P	Esfingosina-1-fosfato
S1PR	Receptores de S1P
SEM	Error estándar de la media
SHC	Del inglés " <i>Src Homology 2</i> "
SLC	Del inglés " <i>Solute Carrier Family</i> "
SM	Esfingomielina
SMasa	Esfingomielinasa
SNAT	Transportadores de aminoácidos neutros acoplados con transporte de sodio
SNC	Sistema nervioso central
SphK	Esfingosinas quinastas
SPP	S1P fosfatasas
SPT	Palmitoil-CoA transferasa
TEMED	Tretrametilenetilendiamina
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
Th17	Del inglés " <i>T helper 17</i> "
Th22	Del inglés " <i>T helper 22</i> "
Tfh	Del inglés " <i>T helper follicular</i> "
tMCAO	Oclusión transitoria de la arteria cerebral media
TNFR1	Receptor 1 del factor de necrosis tumoral
TNFR2	Receptor 2 del factor de necrosis tumoral
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa

ÍNDICE Y ABREVIATURAS

TRAF2	Del inglés “ <i>TNF receptor-associated factor 2</i> ”
VIAAT	Del inglés “ <i>Vesicular inhibitory amino acid transporter</i> ”

INTRODUCCIÓN

1. ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

El hígado es un órgano vital que detoxifica la mayoría de compuestos tóxicos endógenos y exógenos. Cuando el hígado falla estos procesos no se producen adecuadamente y los compuestos tóxicos pueden llegar al cerebro y afectar la función cerebral. Un compuesto que se acumula como consecuencia del fallo hepático es el amonio, uno de los principales contribuyentes a estas alteraciones cerebrales (Felipo, 2013).

La encefalopatía hepática (EH) es un síndrome neuropsiquiátrico complejo que es consecuencia del fallo hepático, agudo o crónico (como la cirrosis). La EH se puede manifestar como un amplio espectro de anomalías neurológicas y/o psiquiátricas que van desde alteraciones subclínicas hasta llegar al coma y la muerte de los pacientes (Felipo, 2013; Vilstrup *et al.*, 2014). Incluye alteraciones en los ritmos circadianos y en la personalidad, problemas de atención, déficits cognitivos y motores, y conduce a un peor pronóstico y menor supervivencia de los pacientes (Bustamante *et al.*, 1999; Weissenborn *et al.*, 2005a; Felipo, 2013).

La encefalopatía hepática puede ser clínicamente evidente (EH clínica) o no (EH mínima, EHM). La EH clínica se clasifica en función del patrón temporal de manifestación en ocasional, recurrente y persistente. En función de las manifestaciones neuropsicológicas, la gravedad de la EH clínica se clasifica en 4 grados. Siguiendo los criterios de West-Haven, la estratificación sería en el grado I, los pacientes tienen falta de atención e incapacidad para mantenerla, estados de euforia y ansiedad y dificultad para realizar sumas y restas; en el grado II estados de letargo, desorientación temporal y espacial, apatía y cambios en la personalidad; el grado III se caracteriza por confusión, somnolencia y semiestupor presentando una gran desorientación; el grado IV corresponde a un estado de coma en el cual no se pueden realizar pruebas de función mental (Conn y Lieberthal, 1979; Weissenborn *et al.*, 2005b).

Existe una forma temprana más leve llamada **encefalopatía hepática mínima** (EHM). Esta tesis se va a centrar en esta forma inicial de EH, porque es en esta fase donde más efectivo puede ser el tratamiento para revertirla y prevenir su progresión. Pacientes sin signos visibles de EH clínica pueden mostrar alteraciones cognitivas (en percepción visual-espacial, atención y concentración) y motoras (en coordinación bimanual y visuomotor) que no se detectan en un test neurológico rutinario, pero son evidentes cuando se hacen test psicométricos apropiados (Giménez-Garzó *et al.*, 2017; Gou *et al.*, 2020). La EHM reduce la calidad de vida de los pacientes (Slowik *et al.*, 2001; Bajaj *et al.*, 2020), aumenta el riesgo de sufrir accidentes laborales, domésticos y de tráfico, predispone a sufrir EH clínica y reduce la supervivencia (Felipo, 2013). Entre un 35 y un 50% de los pacientes adultos con cirrosis hepática presentan EHM (Mínguez *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2008; Felipo *et al.*, 2012a). La EHM afecta a más de 2 millones de personas en Estados Unidos y un número similar en Europa. Es por tanto un problema médico, social y económico importante.

Se ha llegado a un consenso para utilizar como referencia para detectar la EHM la batería PHES (Psychometric Hepatic Encephalopathy Score) compuesta por 5 test psicométricos

(Weissenborn *et al.*, 2001). El diagnóstico temprano y el tratamiento de la EHM permiten mejorar la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes (Mangas-Losada *et al.*, 2019).

Los mecanismos que llevan a las alteraciones cognitivas y motoras asociadas a la EHM aún no se conocen completamente, pero se están empezando a comprender por estudios en modelos animales (Agusti *et al.*, 2011; Hernández-Rabaza *et al.*, 2015; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a, 2019a).

1.1. Patogénesis de la EHM: sinergia entre hiperamonemia e inflamación periférica en la inducción de neuroinflamación y deterioro neurológico

En enfermedades hepáticas, el amonio no se elimina correctamente aumentando sus niveles en sangre y en cerebro. Existen pruebas experimentales y clínicas que muestran que la hiperamonemia es uno de los factores esenciales causantes de los déficits neurológicos presentes en la encefalopatía hepática: los tratamientos clínicos para revertir o disminuir alteraciones neurológicas en pacientes con EH van dirigidos a reducir los niveles de amonio en sangre. En pacientes cirróticos, los factores que desencadenan EH (ingesta proteica, hemorragia gastrointestinal) están asociados con un aumento de amonio y se ha observado que existe una correlación entre los síntomas neurológicos y la concentración arterial de amonio (Clemmesen *et al.*, 1999). Además, pacientes con deficiencias congénitas en enzimas del ciclo de la urea tienen hiperamonemia y presentan encefalopatía similar a la EH cuya gravedad depende de la duración de la hiperamonemia neonatal y los niveles de amonio alcanzados (Msall *et al.*, 1984). Por último, en modelos animales, la hiperamonemia crónica sin fallo hepático reproduce muchas de las alteraciones neurológicas, metabólicas y neuroquímicas presentes en pacientes con EHM, como alteraciones de los ritmos circadianos, incoordinación motora y disminución en la capacidad de aprendizaje (Felipo y Butterworth, 2002).

La inflamación, consecuencia del fallo hepático, actúa sinérgicamente con la hiperamonemia potenciando el deterioro cognitivo y motor, provocando las alteraciones neurológicas características de la EHM (Montoliu *et al.*, 2015).

Shawcross *et al.* (2004) indujeron hiperamonemia en pacientes cirróticos y comprobaron que induce deterioro cognitivo si los pacientes presentan un estado inflamatorio, pero no en su ausencia. La concentración de amonio en sangre y la severidad de la enfermedad hepática no determinan la presencia y severidad de la EHM, pero los marcadores pro-inflamatorios están más elevados en pacientes con EHM (Shawcross *et al.*, 2007). Las interleucinas IL-6 e IL-18 están elevadas en pacientes con EHM y se relacionan con el grado de EHM (Montoliu *et al.*, 2009). La presencia de niveles altos de hiperamonemia e inflamación son suficientes para producir deterioro cognitivo leve o EHM en pacientes con enfermedades dermatológicas o hepáticas (Felipo *et al.*, 2012b). Todos estos estudios indican que tanto la hiperamonemia como la inflamación periférica contribuyen a la inducción de la EHM.

Se ha comprobado que la hiperamonemia crónica per se induce inflamación periférica (Balzano *et al.*, 2020a) y activación de la microglía y neuroinflamación, que median el deterioro cognitivo y motor (Rodrigo *et al.*, 2010; Cabrera-Pastor *et al.*, 2019a). Los datos obtenidos en pacientes y en modelos animales indican que el proceso que conduce a la EHM es el que se resume en la Figura 1: el daño hepático induce tanto hiperamonemia como inflamación periférica, que producen neuroinflamación, provocando una alteración de la neurotransmisión que conduce al deterioro cognitivo y motor en EHM y en EH clínica (Figura 1) (Montoliu *et al.* 2015; Cabrera-Pastor *et al.*, 2019a).

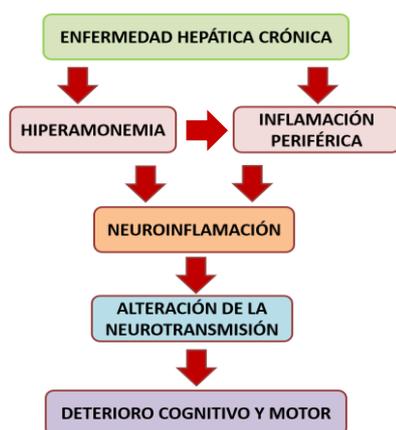


Figura 1. Patogénesis de la EHM. La hiperamonemia y la inflamación inducen neuroinflamación que altera la neurotransmisión conduciendo al deterioro cognitivo y motor en enfermedades hepáticas. *Imagen modificada de Montoliu et al. (2015).*

Uno de los objetivos de la tesis es identificar mecanismos moleculares y vías de transducción de señales por los que la hiperamonemia crónica induce neuroinflamación en cerebelo y como esta altera la neurotransmisión. Para abordar este objetivo es necesario utilizar un modelo de hiperamonemia crónica en ratas.

1.2. Modelos animales de EHM crónica

Para progresar y mejorar en el estudio de los mecanismos que producen EHM e investigar y probar nuevos tratamientos terapéuticos para revertirla es necesario utilizar modelos animales. Los modelos animales de EHM presentan hiperamonemia, inflamación, neuroinflamación, y alteración de la neurotransmisión y desarrollan déficits cognitivos y motores presentes en pacientes con EHM. Los modelos de EHM en rata más utilizados son los de anastomosis porta-cava (PCS, *Porta-Caval Shunt*), Ligadura Biliar (BDL, *Bile duct-ligation*) y el de hiperamonemia crónica sin fallo hepático, en el que se va a centrar esta tesis.

1.2.1. Modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático

Uno de los factores más importantes que desencadena las alteraciones motoras y cognitivas en EHM es la hiperamonemia. Para diferenciar que alteraciones son debidas a la hiperamonemia y cuales son por otras alteraciones asociadas al fallo hepático nuestro grupo desarrolló a finales de los años 80 un modelo de hiperamonemia crónica “pura” sin fallo hepático. Este modelo es sencillo y permite mantener la hiperamonemia durante mucho tiempo sin alterar la función hepática (Felipo *et al.*, 1988; Azorín *et al.*, 1989). A las ratas se les administra una dieta que contiene acetato amónico (25% p/p) produciendo una hiperamonemia crónica moderada parecida a la de los pacientes con cirrosis hepática,

presentando el doble de amonio en sangre que las ratas control. El modelo de hiperamonemia crónica sin fallo hepático es el que se ha utilizado en la presente tesis doctoral, ya que reproduce muchas de las alteraciones presentes en la EHM.

Este modelo se ha utilizado para investigar el efecto que tiene la hiperamonemia crónica sobre la función motora (Rodrigo *et al.*, 2010; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a) y cognitiva (Aguilar *et al.*, 2000; Rodrigo *et al.*, 2010; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016b). Las alteraciones motoras y cognitivas en este modelo son similares a las que presentan los modelos quirúrgicos de EHM (ratas PCS y BDL) y los pacientes con EHM. El modelo de hiperamonemia también se ha utilizado para investigar los mecanismos responsables del deterioro motor y cognitivo, incluyendo las alteraciones en la función de vías de transducción de señales en cerebro in vivo (Hermenegildo *et al.*, 1998) y para evaluar diferentes tratamientos terapéuticos, como el sildenafil y el GMPc, para revertir las alteraciones neurológicas (Erceg *et al.*, 2005a y 2005b).

Rodrigo *et al.* (2010) demostraron que la hiperamonemia por si sola induce neuroinflamación, sin que sea necesaria la existencia de fallo hepático. Las ratas hiperamonémicas tratadas con sulforafano o ibuprofeno, que reducen la neuroinflamación, recuperan su función cognitiva y motora indicando que el deterioro neurológico es consecuencia de la neuroinflamación (Rodrigo *et al.*, 2010; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a y 2016b).

El deterioro en la función motora y cognitiva inducido por la hiperamonemia es consecuencia de las alteraciones en la neurotransmisión, las cuales son debidas a la neuroinflamación. En esta tesis vamos a estudiar como la hiperamonemia crónica induce neuroinflamación en cerebelo y como esta altera la neurotransmisión. En el siguiente apartado resumimos los antecedentes en la literatura acerca de los efectos de la hiperamonemia sobre la función cerebral y la neurotransmisión.

1.3. Metabolismo del amonio y ciclo glutamato-glutamina

El amonio se produce en todas las células por la degradación de nucleótidos, aminoácidos y otros compuestos. El amonio tiene un papel fundamental en la síntesis de compuestos necesarios para el organismo, como la glutamina o el glutamato. Sin embargo, a concentraciones elevadas en sangre y cerebro es tóxico produciendo alteraciones funcionales en el sistema nervioso central (SNC) (Gerok y Haussinger, 1984; Felipe y Butterworth, 2002). En condiciones fisiológicas, los niveles de amonio en sangre (unos 50 μM en humanos y unos 150 μM en rata) y en cerebro son regulados por diferentes reacciones de formación y eliminación que mantienen estables sus niveles.

En mamíferos, la formación de amonio está catalizada por las enzimas glutamato deshidrogenasa, enzimas del ciclo de los nucleótidos de purina y sobre todo por la glutaminasa, que hidroliza glutamina para formar glutamato y amonio. Para evitar la acumulación de niveles tóxicos de amonio, este se tiene que detoxificar. El amonio se elimina principalmente en el hígado a través del ciclo de la urea. Mediante este ciclo, el amonio se incorpora a la urea, la cual se excreta por la orina. En otros órganos como el

cerebro y músculo, que no tienen todos los enzimas del ciclo de la urea, el amonio se detoxifica principalmente por la glutamina sintetasa que forma glutamina a partir de amonio y glutamato. La glutamina formada se libera al torrente sanguíneo, transportando el amonio desde el cerebro hasta el hígado en forma no tóxica.

La glutamina sintetasa en cerebro juega también un papel esencial en el ciclo glutamato-glutamina. El principal mecanismo por el que se recicla el neurotransmisor glutamato entre astrocitos y neuronas es el ciclo glutamato-glutamina (Figura 2), fundamental para mantener un adecuado funcionamiento de la neurotransmisión glutamatérgica. El amonio juega un rol esencial en este ciclo y un aumento del amonio en hiperamonemia afecta su función en ciertas condiciones.

El aumento de amonio en hiperamonemia afecta la función del ciclo glutamina-glutamato-ácido γ -aminobutírico (GABA) y altera la neurotransmisión glutamatérgica, glicinérgica y GABAérgica, conduciendo a las alteraciones cognitivas y motoras propias de la enfermedad (Cabrera-Pastor *et al.*, 2019a).

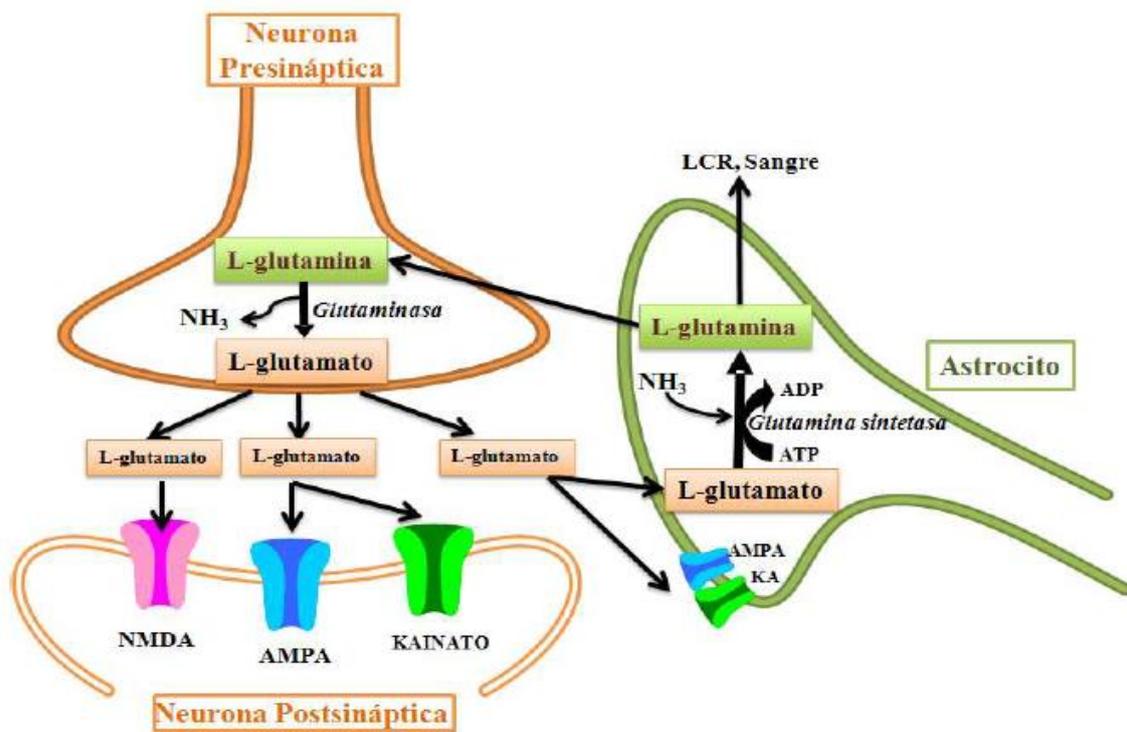


Figura 2. Ciclo glutamato-glutamina en sinapsis glutamatérgicas del cerebro. La neurona presináptica libera glutamato, que activa receptores de glutamato como AMPA y NMDA en la neurona post-sináptica. Para evitar la activación excesiva de estos receptores, el glutamato se recapta rápidamente por transportadores localizados en las neuronas y sobre todo en astrocitos. En los astrocitos, la glutamina-sintetasa combina el glutamato captado con amonio formando glutamina que se libera por transportadores específicos al medio extracelular desde el cual otros transportadores de glutamina la incorporan en las neuronas. Una vez en la neurona, la glutamina se rompe a glutamato y amonio por la glutaminasa. Este glutamato puede ser liberado de nuevo como neurotransmisor, cerrando el ciclo glutamato-glutamina (Cabrera-Pastor, 2014).

2. ALTERACIONES DE LA NEUROTRANSMISIÓN EN HIPERAMONEMIA Y EH

El sistema nervioso tiene como función captar estímulos para elaborar una respuesta. Estos estímulos viajan a través de las redes neuronales mediante un proceso conocido como neurotransmisión. Las funciones cognitivas y motoras se modulan por redes neuronales cuya función se modula por neurotransmisores que cooperan para mantener una adecuada función cerebral. Existen neurotransmisores inhibitorios como el GABA y la glicina, y neurotransmisores excitatorios como el glutamato (Purves *et al.*, 2004).

La hiperamonemia y la EH alteran la neurotransmisión glutamatérgica, GABAérgica y glicinérgica y la comunicación entre neuronas en las redes y circuitos neuronales lo que conduce al deterioro cognitivo y motor (Cauli *et al.*, 2009; Llansola *et al.*, 2009; Felipo, 2013; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a, b y c).

La hiperamonemia crónica moderada altera diferentes pasos de la **neurotransmisión** incluidos los niveles extracelulares de glutamato, GABA o glicina y la expresión en membrana de sus transportadores (Cabrera-Pastor *et al.*, 2019b).

También altera el contenido y la expresión en membrana de distintos tipos de receptores de GABA, glicina y glutamato y la función de vías de transducción de señales intracelulares inducidas por la activación de estos receptores (Cauli *et al.*, 2009; Llansola *et al.*, 2013 y 2015; Cabrera-Pastor *et al.*, 2019b).

2.1. Efectos de la hiperamonemia sobre los transportadores de glutamato, glutamina y GABA

Uno de los principales mecanismos que regulan la neurotransmisión es la modulación de las concentraciones extracelulares de los neurotransmisores. El tráfico de glutamato, glutamina y GABA entre astrocitos y neuronas y la concentración extracelular de estos neurotransmisores está estrictamente controlado por transportadores específicos ubicados en la membrana plasmática. Los transportadores de glutamato pertenecen a la familia SLC1 y se denominan EAAT1 – EAAT5. Los transportadores GLAST y GLT-1 de roedores corresponden a EAAT1 y EAAT2 de humanos. GLAST y GLT-1 se expresan principalmente en astrocitos y son responsables de la mayor parte de la recaptación de glutamato en el cerebro. Las neuronas también expresan GLT-1 (alrededor del 10% del total de GLT-1) y EAAT3-5 (Hayashi, 2018).

La glutamina es transportada desde los astrocitos a las neuronas por los transportadores de la familia SNAT (transportadores de aminoácidos neutros acoplados con transporte de sodio). SNAT3 libera glutamina de los astrocitos al líquido extracelular y SNAT1 incorpora a las neuronas la glutamina del fluido extracelular.

Los transportadores de GABA pertenecen a la familia de portadores de solutos 6 (SLC6). Hay 6 transportadores de GABA: A1 / GAT1, A13 / GAT2, A11 / GAT3, A12 / BGT1, A8 / CT1 y A6 / TauT. Los mejor caracterizados son GAT1 y GAT3. En roedores, GAT3

se expresa en astrocitos y GAT1 en neuronas y astrocitos (Scimemi, 2014; Cabrera-Pastor *et al.*, 2019b). Una característica relevante de GAT3 es que su función se invierte tras una fuerte recaptación de glutamato y sodio, es decir, en lugar de captar GABA del fluido extracelular, lo libera aumentando así la concentración de GABA extracelular (Wu *et al.*, 2014). Este mecanismo de regulación feedback se produce cuando hay un aumento excesivo de glutamato extracelular y contribuye a prevenir una excitación excesiva en condiciones patológicas como la epilepsia o isquemia cerebral (Heja *et al.*, 2009).

Un mecanismo esencial en la modulación de la función de todos estos transportadores es su transporte a la membrana plasmática y su reinternalización. Solo los transportadores presentes en la membrana plasmática pueden transportar glutamato, glutamina o GABA. Un mecanismo clave en la modulación del tráfico de transportadores de glutamato, glutamina y GABA es su fosforilación en diferentes residuos por diferentes proteínas quinasas como PKC. Sin embargo, no se conocen bien los mecanismos que modulan la expresión en membrana de estos transportadores (Law *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2018).

Las ratas hiperamonémicas muestran niveles aumentados de glutamato extracelular, glutamina, GABA y citrulina en el cerebelo in vivo (Cabrera-Pastor *et al.*, 2019b). Las ratas hiperamonémicas presentan un aumento de la expresión en membrana del transportador astrocítico de glutamina SNAT3 y una disminución de la del transportador neuronal SNAT1; reducción de la expresión en membrana del transportador neuronal de GABA GAT1 y aumento de la del transportador astrocítico GAT3; expresión reducida en la membrana de los transportadores de glutamato astrocítico GLAST y GLT-1 y del neuronal EAAC1.

Algunos de los efectos no son debidos directamente al aumento de los niveles de amonio, sino que son consecuencia de otros procesos desencadenados por la hiperamonemia crónica como la neuroinflamación.

2.2. Neurotransmisión glutamatérgica. Alteraciones en hiperamonemia

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en mamíferos y modula funciones cerebrales y neurológicas a través de receptores ionotrópicos (AMPA, NMDA y kainato) y metabotrópicos (Malinow y Malenka, 2002). Los principales receptores ionotrópicos son los NMDA y AMPA. Son canales iónicos permeables a cationes como el calcio, sodio y potasio, cuya activación produce la entrada de Ca^{+2} y/o Na^{+} en las neuronas post-sinápticas. La entrada de calcio activa diferentes enzimas y vías intracelulares implicadas en el control de procesos como la formación de memoria, la plasticidad neuronal, el aprendizaje... (Llansola *et al.*, 2007).

Los impulsos nerviosos producidos por las neuronas liberan grandes cantidades de glutamato al espacio sináptico, parte del cual es reabsorbido por neuronas, mientras que la mayoría es absorbido por astrocitos y microglía. El glutamato liberado, conduce a la activación de los receptores de glutamato en neuronas post-sinápticas y también en la microglía. Si esta activación es excesiva induce activación de la microglía y puede conducir a daño a las neuronas. El glutamato media la comunicación neurona-microglía

en el cerebro. El glutamato transmite información de las neuronas a la microglía y viceversa. Tras una activación, la microglía también puede liberar glutamato, lo que indica la naturaleza bidireccional de la comunicación microglía-neurona (Zhang *et al.*, 2020).

La hiperamonemia y la EHM alteran la neurotransmisión glutamatérgica en hipocampo lo que contribuye al deterioro del aprendizaje y memoria espaciales y también altera la neurotransmisión glutamatérgica en cerebelo (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016b). Como en esta tesis no se estudia la neurotransmisión glutamatérgica no describimos aquí los detalles para no alargar esta introducción.

2.3. Neurotransmisión GABAérgica. Alteraciones en hiperamonemia

El GABA es el neurotransmisor inhibitorio principal del SNC (Kim *et al.*, 2017). Se sintetiza mediante la descarboxilación del glutamato por la acción de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) (Has y Chebib, 2018). La mayoría de las sinapsis inhibitorias del cerebro emplean GABA como neurotransmisor, y aproximadamente un tercio del total de las neuronas del SNC son GABAérgicas. La mayoría son interneuronas y modulan la excitabilidad de los circuitos locales en regiones cerebrales determinadas (Vithlani *et al.*, 2011).

Hay tres tipos de receptores de GABA: los GABA_A y GABA_C son ionotrópicos, con canales de cloruro cuya apertura genera inhibición del potencial post-sináptico. Los receptores GABA_B son metabotrópicos, es decir, acoplados a vías de señalización intracelular, que culminan en la apertura de canales de potasio en la membrana para la hiperpolarización de la célula (Vithlani *et al.*, 2011). La mayoría de las sinapsis inhibitorias del cerebro en mamíferos están mediadas por GABA_A mientras que los GABA_B generan respuestas más lentas y prolongadas y los GABA_C quedan restringidos a neuronas de la retina (Bormann, 2000; Luscher *et al.*, 2011).

Los receptores GABA_A son una familia de receptores heteropentaméricos que forman un poro que actúa como un canal iónico controlado por ligando, de forma que la unión de GABA cataliza cambios estructurales rápidos que permiten el transporte de cloruro por el poro a favor de gradiente. El cloruro en condiciones normales está más concentrado en el medio extracelular que en el interior de las neuronas. La entrada de Cl⁻ aumenta el potencial eléctrico negativo dentro de la célula, hiperpolarizándola. Esto disminuye el potencial de membrana por debajo del umbral e impide la despolarización necesaria para generar un potencial de acción, lo que se traduce en una inhibición de la célula (Purves *et al.*, 2014). Estructuralmente, los heteropentámeros están compuestos por diferentes subunidades transmembrana que a su vez presentan variantes: α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , θ , π y ρ (1-3) dando lugar a una amplia heterogeneidad de receptores (Figura 3). Generalmente consisten en dos subunidades α , dos subunidades β y una subunidad γ o δ . Estos subtipos de receptores GABA_A varían en las diferentes regiones cerebrales y en aspectos funcionales, regulatorios y farmacológicos según la composición de las subunidades (Olsen, 2018).

El receptor GABA_A puede ser inhibido por antagonistas como la picrotoxina y la bicuculina. La bicuculina es un antagonista competitivo de los receptores GABA_A que inhibe la unión de GABA a sus receptores (Johnston, 2013).

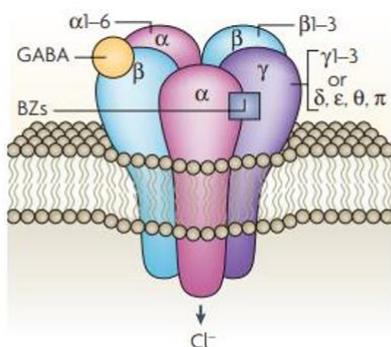


Figura 3. Estructura del receptor GABA_A. Formado por cinco subunidades con un canal permeable a iones cloruro. El GABA permite la activación y apertura del canal anclándose al punto de unión entre la subunidad α y β. La mayoría de los receptores GABA_A están formados por 2 subunidades α, 2β y 1γ (Jacob et al., 2008).

El aumento del tono GABAérgico por un aumento del GABA extracelular y de la activación de los receptores GABA_A, contribuye a la patogénesis de la hiperamonemia y la EHM (Cauli *et al.*, 2009).

En el cerebelo de ratas con hiperamonemia crónica la activación tónica de los receptores GABA_A está aumentada, lo que produce una reducción en la función de la vía glutamato-Óxido nítrico (NO)-GMPc y de la capacidad de aprender una tarea en un laberinto en Y (Explicado en más detalle en la página 44). El bloqueo del receptor GABA_A con bicuculina recupera la función de la vía en el cerebelo y normaliza la capacidad de aprendizaje de la tarea en el laberinto en Y (Cauli *et al.*, 2009). El aumento de la activación GABAérgica en el cerebelo altera la coordinación motora (Hanchar *et al.*, 2005). Diferentes investigaciones han comprobado que existe una correlación entre un incremento de la concentración extracelular de GABA y una reducción en la coordinación motora en cerebelo (Fassio *et al.*, 1996; Chiu *et al.*, 2005; Hanchar *et al.*, 2005). Nuestro grupo ha demostrado que un aumento del GABA extracelular, de la expresión de varias subunidades del receptor GABA_A, y de ciertos neuroesteroides que modulan de manera positiva los receptores GABA_A en ratas hiperamonémicas produce un aumento del tono GABAérgico en cerebelo (Cauli *et al.*, 2009). La disminución de la coordinación motora y de la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y en modelos animales de hiperamonemia y EHM en cerebelo es debido al aumento del tono GABAérgico (Dadsetan *et al.*, 2016a y 2016b).

2.4. Neurotransmisión glicinérgica. Alteraciones en hiperamonemia

La glicina es el aminoácido más simple y tiene diversas funciones en el SNC (Betz y Laube, 2006). Actúa como neurotransmisor y ejerce su efecto a través de dos dianas. Por una parte, la glicina es un coagonista de los receptores NMDA y su unión es esencial para la activación de estos. La unión de glicina al receptor NMDA no se afecta por estriquina. Por otra parte, la glicina actúa como un neurotransmisor inhibitorio a través de la activación de los receptores de glicina que son permeables a iones cloruro y sensibles a la estriquina (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016c).

INTRODUCCIÓN

La glicina puede activar tanto los receptores inhibidores de glicina como los receptores excitadores NMDA, lo que la convierte en un buen candidato para modular el equilibrio entre la neurotransmisión excitadora e inhibitora y las funciones cerebrales asociadas, incluido el aprendizaje (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016c).

Los receptores de glicina (GlyRs) se expresan ampliamente en distintas áreas del cerebro, incluido el cerebelo, hipocampo y corteza (Xu y Gong, 2010). Los GlyRs son proteínas pentaméricas formadas por subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) funcionales y / o subunidades β reguladoras (Figura 4) (Betz y Laube, 2006).

La estricnina es el antagonista más clásico del receptor y se une a él con gran afinidad. La estricnina se usa ampliamente para distinguir los efectos de la inhibición glicinérgica de los de la inhibición GABAérgica, y constituye una herramienta única para investigar los GlyRs (Betz y Laube, 2006). Se ha observado que la activación del receptor de glicina se reduce por el GMPc extracelular (Bukanova *et al.*, 2014).

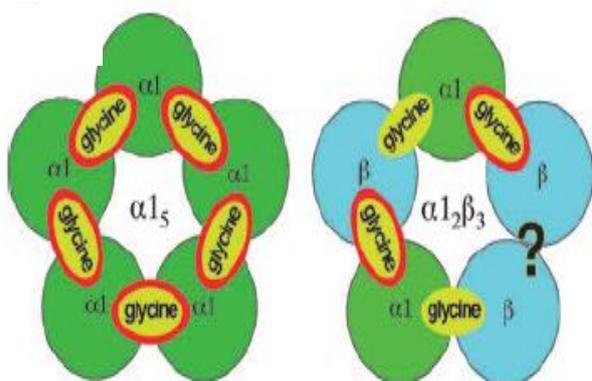


Figura 4. Estructura de los receptores de glicina. Los sitios de unión para la glicina se indican en amarillo, y los sitios de unión de la estricnina se muestran con un borde rojo. La estricnina interactúa preferentemente con la interfaz α - α (Betz y Laube, 2006).

Cuando la neurona glicinérgica se despolariza, la glicina se libera a la hendidura sináptica mediante exocitosis dependiente de calcio. La glicina activa a los GlyRs postsinápticos abriendo un canal de cloruro produciendo un rápido aumento de la entrada de cloruro que hiperpolariza la membrana y genera un potencial postsináptico inhibitor (Figura 5A).

En las neuronas, la acción inhibitora de GlyRs regula funciones fisiológicas como la coordinación motora, transmisión del dolor, control respiratorio y desarrollo neuronal (Lynch, 2004).

La finalización de la neurotransmisión se produce por la recaptación de la glicina por transportadores específicos dependientes de sodio y cloruro, GlyT1 y GlyT2 (Figura 5). La señal inhibitora finaliza gracias al transporte activo de glicina por GlyT1 (células gliales) y GlyT2 (neurona presináptica). La glicina se incorpora en vesículas por el transportador vesicular VIAAT, favoreciendo la reutilización del neurotransmisor en el posterior ciclo de liberación. La inhibición de GlyT1 aumenta la concentración de glicina extracelular, prolonga la estimulación de los GlyRs y acentúa la inhibición postsináptica. Para reducir la neurotransmisión glicinérgica es necesario una inhibición completa de GlyT2 ya que impide la recaptación vesicular en la neurona presináptica. Alteraciones en la inhibición glicinérgica desencadenan enfermedades neurológicas como hiperplexia o trastorno neuromotor (Lynch, 2004).

Los receptores NMDA se localizan en las sinapsis glutamatérgicas, GlyT1 se encuentra en los terminales pre y postsináptico, así como en las células de la glía cercanas (Figura 5B), ayudando a disminuir la concentración extracelular de glicina en el espacio sináptico y la excitabilidad del receptor NMDA. La inhibición de GlyT1 aumenta la glicina extracelular y la activación del receptor NMDA (Harvey *et al.*, 2013).

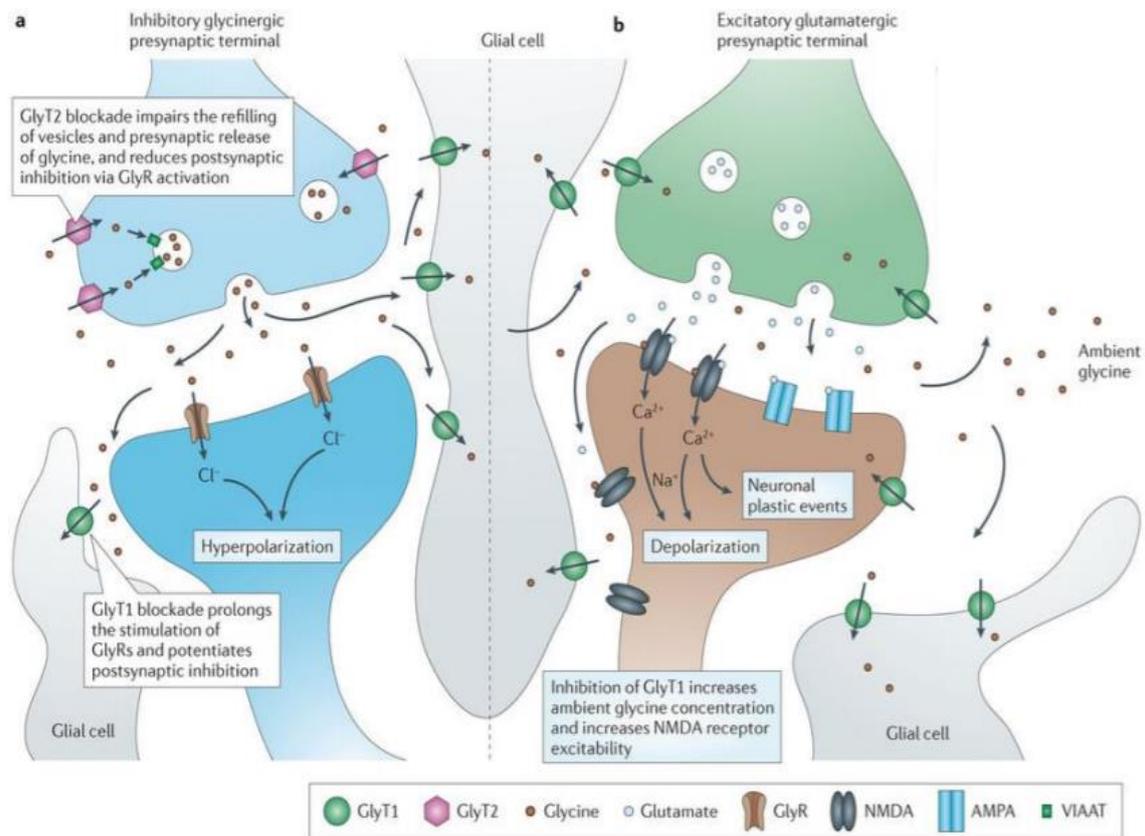


Figura 5. Regulación de la neurotransmisión en sinapsis glicinérgicas y glutamatérgicas por los transportadores de glicina (Havary *et al.*, 2013). Ver los detalles en el texto.

Nuestro grupo, ha demostrado que la hiperamonemia crónica altera la neurotransmisión glicinérgica en el cerebelo in vivo y que estas alteraciones contribuyen a los mecanismos que deterioran el aprendizaje en el laberinto en Y en estas ratas (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016c).

En las ratas control, la administración intracerebral de niveles bajos de glicina reduce la función de la vía glutamato-NO-GMPc, probablemente activando los receptores de glicina, mientras que a concentraciones más altas (20 μ M) la glicina aumenta la función de la vía, probablemente aumentando la activación de los receptores NMDA. Esto indica que la glicina modula la vía glutamato-NO-GMPc de forma bifásica. La hiperamonemia reduce en aproximadamente un 50% la concentración de glicina extracelular y la expresión en membrana de los receptores de glicina alterando la neurotransmisión glicinérgica y la modulación por glicina de la vía glutamato-NO-GMPc. Estas alteraciones pueden contribuir a alteraciones cognitivas en la hiperamonemia crónica (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a y 2016c).

INTRODUCCIÓN

La activación de los GlyRs se modula por fosforilación por la proteína quinasa C (PKC) y CaMKII (Legendre, 2001). La hiperamonemia altera la fosforilación de diferentes sustratos neuronales para estas proteínas quinasas (ElMlili *et al.*, 2008). El aumento de la activación tónica de los receptores de glicina en hiperamonemia a pesar de la reducción de la concentración de glicina extracelular y de la expresión de membrana de los receptores de glicina podría deberse al aumento de la fosforilación por CaMKII o PKC cuyas actividades están aumentadas en el cerebelo de las ratas hiperamonémicas.

En hiperamonemia, los niveles de GMPc extracelular (que reduce la activación del receptor de glicina) se reducen en el cerebelo *in vivo* y diferentes tratamientos que aumentan sus niveles restauran la vía Glutamato-NO-GMPc y la capacidad de aprendizaje (Erceg *et al.*, 2005a y 2005b; ElMlili *et al.*, 2008; Cauli *et al.*, 2009; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a). La administración intracerebral crónica de GMPc extracelular a ratas con hiperamonemia crónica reduce la neuroinflamación en cerebelo y restaura la coordinación motora (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a). Dado que el GMPc modula los receptores de glicina, reduciendo su activación, es posible que los efectos beneficiosos del aumento de GMPc extracelular en cerebelo de ratas hiperamonémicas sean debidos a esta reducción de la neurotransmisión glicinérgica. Sin embargo, no se ha estudiado si los efectos del GMPc extracelular en el cerebelo de ratas hiperamonémicas podrían estar mediados por la inhibición de los GlyRs.

No se han estudiado en detalle los efectos de la neurotransmisión glicinérgica sobre la neuroinflamación. En cultivos de adipocitos, la glicina estimula la activación de NF- κ B y este efecto se evita por completo al bloquear el GlyR con estriquina. En contraste, la glicina inhibe la activación de NF- κ B inducida por TNF α en estos adipocitos (Contreras-Núñez *et al.*, 2018). Por tanto, los efectos de la glicina sobre la neuroinflamación y sobre los mecanismos que la modulan no están claros.

Es probable que la neurotransmisión glicinérgica alterada en las ratas hiperamonémicas, contribuya a la inducción de neuroinflamación y a los mecanismos por los que se altera la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica en el cerebelo. Esta idea está apoyada por el hecho de que el GMPc extracelular, que revierte muchas de estas alteraciones a concentraciones fisiológicas (nM), modula los GlyRs reduciendo su activación (Bukanova *et al.*, 2014).

Una parte importante de esta tesis se ha centrado en estudiar como la neuroinflamación y la neurotransmisión glicinérgica se modulan mutuamente en cerebelo de ratas hiperamonémicas.

Los estudios en modelos animales de hiperamonemia y EHM han demostrado que la aparición de alteraciones neurológicas está mediada por la inducción de neuroinflamación y la subsiguiente alteración de la neurotransmisión. Tanto en pacientes como en modelos animales, el cerebelo parece ser la primera área del cerebro afectada en las primeras etapas de las enfermedades hepáticas crónicas. Además, en modelos animales y en pacientes con enfermedad hepática crónica, la neuroinflamación es más intensa en el cerebelo que en otras áreas incluso en la etapa de esteatohepatitis, antes de que se desarrolle la cirrosis

hepática (Rodrigo *et al.*, 2010; Balzano *et al.*, 2018a y b). Por otra parte, la coordinación motora, que se modula en cerebello por la neurotransmisión GABAérgica es una de las primeras funciones afectadas en hiperamonemia.

En esta tesis nos vamos a centrar en el estudio de neuroinflamación y neurotransmisión en cerebello. Por esta razón vamos a describir brevemente la estructura del mismo.

3. EL CEREBELO: ESTRUCTURA

El cerebello es el principal responsable de la regulación de la coordinación motora (Snider *et al.*, 1976; Schmahmann, 1991). También modula diversos tipos de aprendizaje como el motor, emocional y asociativo, así como componentes cognitivos del aprendizaje espacial y motor, memoria de trabajo, atención visuo-espacial y función verbal (Timman *et al.*, 2010). Alteraciones en cerebello están asociados a un gran número de enfermedades como la ataxia, temblor distónico, esquizofrenia (Beckinghausen y Sillitoe, 2018).

La corteza del cerebello está formada por cuatro tipos principales de neuronas: neuronas de Purkinje, neuronas granulares y dos tipos de interneuronas (Voogd y Glickstein, 1998). Las neuronas se encuentran en las distintas capas que conforman la corteza cerebelosa, que es uniforme en todo el cerebello: sustancia blanca (que contiene mayoritariamente células gliales), capa granular (neuronas granulares), capa de células de Purkinje y capa molecular (donde se hallan células estrelladas y células en cesta) (Figura 6) (Mendoza y Foundas, 2008; Beckinghausen y Sillitoe, 2018).

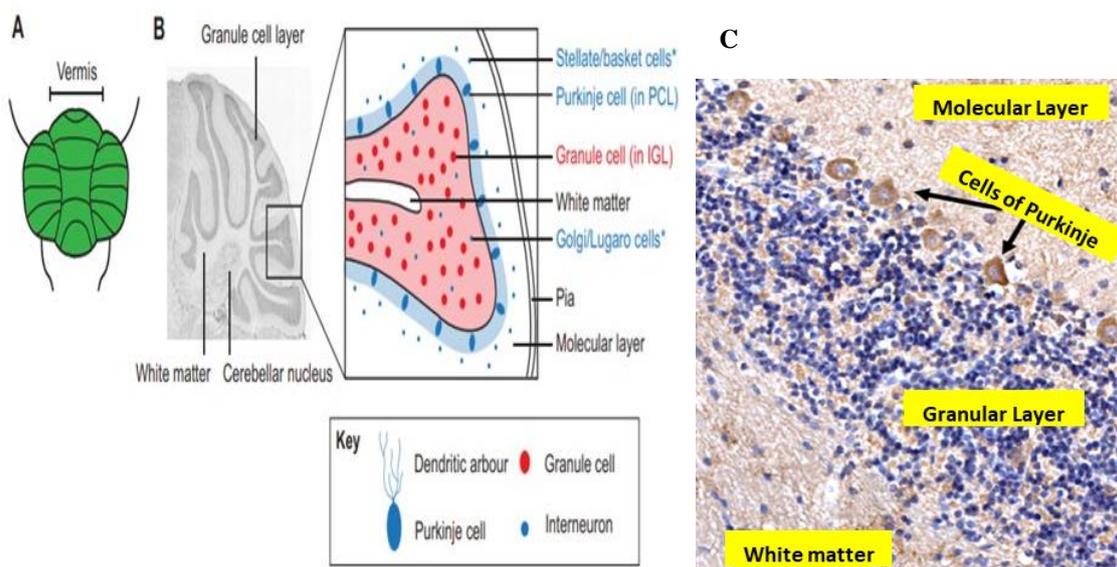


Figura 6. Estructura del cerebello. A) Visto superficialmente B) En sección sagital, los núcleos cerebelosos se encuentran dentro de la sustancia blanca. Las capas reflejan la distribución de diferentes tipos de células: la capa de células de Purkinje (azul), la capa de células granulares internas (rojo) y una capa molecular (no coloreada) en la que interactúan las dendritas de células de Purkinje y los axones de células granulares (Butts, Green y Wingate, 2014) y C) Capas que conforman la estructura de la corteza cerebelar.

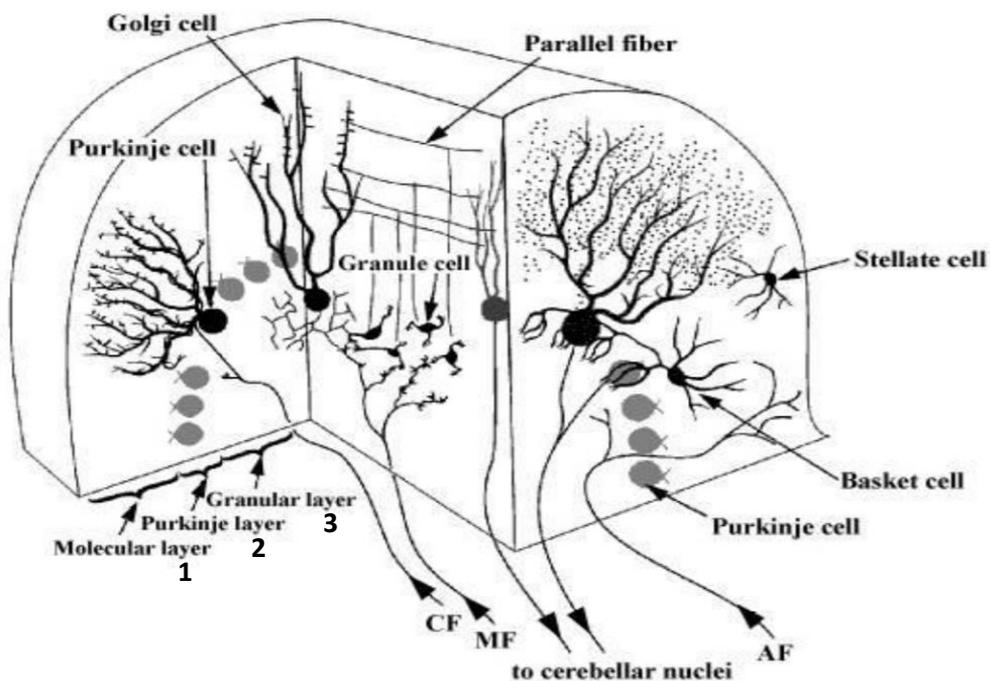


Figura 7. Estructura organizativa del cerebelo. Las tres capas del cerebelo son (1) una capa molecular externa, (2) una capa intermedia de Purkinje y (3) una capa granular interna. La célula de Purkinje podría considerarse la estructura fundamental dentro del cerebelo. Recibe información directa de las fibras trepadoras (CF) e indirecta de las fibras musgosas (MF) (a través de las fibras paralelas de neuronas granulares). Ambas representan entrada excitadora, la primera del núcleo de la oliva inferior y las fibras musgosas de la corteza cerebral, médula espinal y núcleos vestibulares. Todos los demás inputs (fibras aminérgicas, AF) y células (estrelladas, en cesta y Golgi) sirven para modular o inhibir la célula de Purkinje. Finalmente, los axones de la célula de Purkinje, que hacen sinapsis en los núcleos cerebelosos o en los núcleos vestibulares, representan el único eferente de salida de la corteza cerebelosa (Mendoza y Foundas, 2008).

La capa molecular tiene la menor densidad celular de las tres capas y consta de dos tipos de neuronas, células estrelladas y células en cesta. Aunque tiene relativamente pocas células, la capa molecular contiene numerosos procesos celulares, siendo los más notables los extensos árboles dendríticos (ramas) de las células de Purkinje y las fibras paralelas de las células granulares. Aunque las ramas de las células de Purkinje son bastante extensas, se ramifican más o menos en un solo plano. Las fibras paralelas, a su vez, corren en ángulo recto con los árboles dendríticos de las células de Purkinje sobre las cuales tienen una influencia excitadora (Figura 7). Debido a su disposición espacial, una sola fibra paralela puede hacer conexiones con miles de células de Purkinje. Las células estrelladas tienen dendritas relativamente cortas y hacen contacto con las dendritas de un pequeño número de células de Purkinje. Las células en cesta tienen procesos dendríticos más extensos y hacen contacto (en los cuerpos celulares) con una gran cantidad de células de Purkinje. Tanto las células estrelladas como las en cesta reciben información excitadora de las fibras paralelas y, a su vez, ejercen influencias inhibitorias sobre las células de Purkinje (Mendoza y Foundas, 2008).

La capa de células de Purkinje está formada por una sola fila de células de Purkinje grandes, que son neuronas inhibitoras GABAérgicas (Crepel, Mariani y Delhaye-Bouchaud, 1976). Los axones de las células de Purkinje proporcionan la única vía eferente a los núcleos cerebelosos profundos y, constituyen la única salida para la modulación de la coordinación motora. Esta capa es relativamente delgada, y consiste en los cuerpos celulares densamente empaquetados de las células de Purkinje. Estos cuerpos celulares son los más grandes en el cerebelo y, con sus árboles dendríticos únicos, son probablemente las células más distintivas en todo el sistema nervioso central. Los axones de las células de Purkinje descienden a través de la capa granular y hacen sinapsis en los núcleos cerebelosos profundos, sobre los cuales tienen una influencia inhibitoria (Figura 7) (Hirano, 2018). La capa de Purkinje contiene fibras en tránsito hacia la capa molecular que incluyen fibras trepadoras y aminérgicas, procesos de las neuronas granulares y de las células de Golgi, y las dendritas de las células en cesta (Mendoza y Foundas, 2008).

La capa granular está densamente poblada por pequeñas neuronas excitadoras glutamatérgicas, las más abundantes de la corteza cerebelosa. Esta capa consiste en los cuerpos celulares de las neuronas granulares muy compactas y las células Golgi tipo II. Los axones de las células granulares no presentan mielina, se extienden hacia la capa molecular y se ramifican en direcciones opuestas formando las fibras paralelas que hacen sinapsis con las dendritas de las células de Purkinje, estrelladas y en cesta. De todas las células que son intrínsecas a la corteza cerebelosa, las neuronas granulares son las únicas excitadoras. El otro tipo de célula principal en la capa granular son las neuronas de Golgi tipo II (generalmente denominadas simplemente "células de Golgi"). Las células de Golgi envían algunos procesos a la capa molecular donde hacen sinapsis con las fibras paralelas; sin embargo, en su mayor parte, hacen sinapsis en las dendritas de las células granulares dentro de la capa granular (Mendoza y Foundas, 2008).

La vía de entrada a la corteza del cerebelo incluye fibras musgosas y trepadoras procedentes de los núcleos de la oliva inferior. Las fibras musgosas entran en la capa granular formando sinapsis con las células granulares mientras que las trepadoras alcanzan la capa molecular, donde una fibra "trepa" hasta las dendritas de la célula de Purkinje (Butts, Green y Wingate, 2014).

3.1. Célula de Purkinje

La **Célula de Purkinje** es un tipo de neurona GABAérgica específica de la corteza cerebelosa. Son reconocidas por sus árboles dendríticos que les proporcionan la capacidad de integrar grandes cantidades de información y adaptarse al ambiente mediante la remodelación de sus dendritas y son las únicas que envían señales de salida desde la corteza cerebelosa. Como parte importante de los circuitos del cerebelo (área en la que se centra esta tesis), las células de Purkinje son necesarias para un movimiento bien coordinado y para distintos aspectos de la función cognitiva y la emoción (Paul y Limaïem, 2019).

En cuanto a su estructura, tienen un árbol dendrítico grande, plano y altamente ramificado y un único axón largo que forma una proyección inhibitoria hacia los núcleos cerebelosos.

INTRODUCCIÓN

El árbol dendrítico es perpendicular a los pliegues de la corteza cerebelosa, con fibras paralelas que pasan a través de los árboles formando sinapsis débiles. Se localiza en la corteza cerebelosa formando la capa de Purkinje que está entre la capa molecular y la capa granular (Figuras 7 y 8) (Paul y Limaiem, 2019).

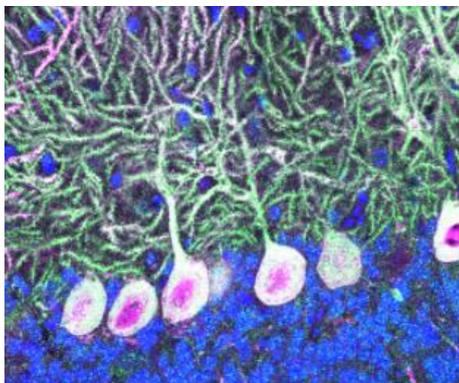


Figura 8. Neuronas de Purkinje en cerebelo
(Kato *et al.*, 2016).

En cuanto su función, un papel clave del circuito cerebeloso es la modulación de la coordinación motora, definida como la capacidad de ajustar y corregir un movimiento en curso. Los grandes árboles dendríticos de las células de Purkinje son críticos para este proceso ya que reciben entradas de las fibras paralelas y las integran en una señal, que representa lo que la célula de Purkinje “piensa” que debería ser el movimiento actual. Además, las fibras trepadoras pueden enviar una “señal de error” que puede anular o modular la señal. La salida completa se dirige a través de los núcleos cerebelosos profundos al núcleo ventrolateral del tálamo, donde alimenta las acciones de la corteza motora y suaviza cualquier error de movimiento. Las señales de las fibras paralelas y ascendentes se dirigen a áreas superpuestas de la corteza, y las rutas de salida de las células de Purkinje a diferentes áreas de la corteza motora (Paul y Limaiem, 2019).

3.2. Las funciones motoras y cognitivas moduladas por el cerebelo se alteran de forma temprana en hiperamonemia y EHM

En pacientes y modelos animales de EHM se detectan alteraciones en cerebelo en etapas tempranas. El flujo sanguíneo en cerebelo aumenta en pacientes con cirrosis hepática con o sin EHM detectada con la batería PHES de test psicométricos. Esto indica que en pacientes con EHM una de las áreas más sensibles es el cerebelo y que las alteraciones funcionales ocurren antes de que se puedan detectar con la batería de test psicométricos PHES (Felipo *et al.*, 2014; Giménez-Garzó *et al.*, 2017). Butz *et al.* (2010) demostraron que la ataxia, los temblores, y la alteración de los movimientos lentos de los dedos (funciones moduladas por el cerebelo) ocurren de forma temprana indicando disfunción del cerebelo en pacientes con EHM. La coordinación bimanual y visuo-motora también se encuentran alteradas en pacientes con EHM. Estos datos indican que el cerebelo es una de las primeras áreas en alterarse en la EHM, participando en las alteraciones cognitivas y motoras tempranas características (Felipo *et al.*, 2014).

Las ratas con EHM o hiperamonemia presentan una capacidad reducida para aprender una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y debido a la menor función de la vía Glutamato-NO-GMPc (Cauli *et al.*, 2009; Rodrigo *et al.*, 2010). También

presentan deterioro de la coordinación motora (Erceg *et al.*, 2005a; Hernandez-Rabaza *et al.*, 2016a) como consecuencia del aumento del GABA extracelular y del tono GABAérgico en el cerebelo. La capacidad de aprendizaje y la coordinación motora se recuperan reduciendo la activación del receptor GABA_A en el cerebelo (Gonzalez-Usano *et al.*, 2014).

La hiperamonemia y la inflamación son los principales factores que contribuyen al deterioro motor y cognitivo en EHM. Como se ha comentado anteriormente, la inflamación exacerba las alteraciones neuropsicológicas producidas por la hiperamonemia y el efecto sinérgico de hiperamonemia e inflamación es el principal responsable de los déficits neurológicos en EHM.

4. PAPEL DE LA INFLAMACIÓN PERIFÉRICA EN LA EHM

La Inflamación es una respuesta fisiológica del organismo a diversos estímulos patológicos como infecciones o daño tisular (Takeuchi y Akira, 2010). Es un mecanismo de defensa vital cuya función principal es eliminar el tejido dañado, pero no siempre es una reacción favorable. En ciertas enfermedades, el sistema inmune provoca respuestas inflamatorias dañinas y lleva al organismo a un estado de inflamación crónica y nociva (Libby, 2007).

En este proceso de inflamación se liberan mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios por las células del sistema inmune innato y adquirido produciendo la reacción inflamatoria. Las citocinas y quimiocinas, que se describirán más adelante en esta introducción, son pequeñas proteínas secretadas por las células con funciones específicas en la comunicación e interacción celular. Los principales mediadores pro-inflamatorios son interleucinas (ILs) como la IL1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF α). Las citocinas anti-inflamatorias disminuyen la respuesta inflamatoria mediante la inhibición de factores pro-inflamatorios (Zhang and An, 2007).

La inflamación periférica contribuye a inducir deterioro cognitivo leve y alteraciones motoras en enfermedades con inflamación crónica sostenida como diabetes, artritis reumatoide, obesidad y enfermedad renal crónica (Shin, Julian y Katz, 2013; da Matta *et al.*, 2014; Díaz-Gerevini *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2014; Montoliu *et al.*, 2015).

Los pacientes con cirrosis hepática presentan niveles aumentados en suero de IL-6 e IL-18 que correlacionan con la presencia de EHM y con peores resultados en los test psicométricos (Montoliu *et al.*, 2009). Los mecanismos por los que estos mediadores inflamatorios contribuyen al deterioro neurológico no están completamente caracterizados. En los pacientes cirróticos, cambios en el sistema inmune, con una expansión y activación de linfocitos *T helper* 17 y 22 (Th17, Th22) y folicular (Tfh) se asocian con la aparición de EHM y de las alteraciones cognitivas y motoras (Mangas-Losada *et al.*, 2017 y 2019).

INTRODUCCIÓN

El cerebro está protegido de patógenos externos por la barrera hematoencefálica (BHE), que lo separa en gran medida del sistema inmune. Cuando ocurre una infección, las citocinas no pueden atravesar la BHE inmediatamente, por lo que no son capaces de inducir un impacto directo en el cerebro. No obstante, el sistema inmune es capaz de enviar señales al cerebro para la producción de una respuesta durante estos estados inflamatorios. La respuesta inmune del SNC se genera especialmente por la activación de la microglía, considerada como los macrófagos del cerebro (Bentivoglio *et al.*, 2011).

Existen distintos mecanismos por los que la inflamación periférica transmite alteraciones al cerebro como la infiltración de células sanguíneas del cerebro (Ransohoff *et al.*, 2003); señalización por fibras nerviosas aferentes (nervio vago) (Hosoi *et al.*, 2002) o estimulación por las citocinas de la sangre como TNF α , IL1 β o IL-6 de sus receptores en las células endoteliales produciendo la liberación de factores inflamatorios en el cerebro, conduciendo a neuroinflamación (Gautron *et al.*, 2002; Rummel *et al.*, 2006).

El TNF α que juega un papel muy importante en la iniciación y amplificación de la cascada inflamatoria (Cheng *et al.*, 2014). Para reducir la inflamación periférica, pacientes con algunas enfermedades inflamatorias crónicas, se tratan con anticuerpos anti-TNF α que inhiben directamente la acción del TNF α . Este tratamiento mejora la función cognitiva en pacientes con Alzheimer (Cheng *et al.*, 2014) o artritis reumatoide (Raftery *et al.*, 2012). El anti-TNF α , debido a su gran tamaño, es incapaz de atravesar la BHE lo que indica que los efectos beneficiosos que produce son consecuencia de la disminución de la inflamación periférica.

El anti-TNF α se usa como tratamiento en enfermedades autoinmunes y en diversos trastornos inflamatorios como la artritis reumatoide y sarcoidosis. En estas enfermedades inflamatorias crónicas, los niveles de TNF α se encuentran elevados por lo que sus vías de señalización están muy estimuladas causando la activación de cascadas proinflamatorias. El anti-TNF α bloquea su actividad, reduce la inflamación y los síntomas de dichas enfermedades inflamatorias (Elfferich *et al.*, 2010; Raftery *et al.*, 2012). Este fármaco se administra por vía intravenosa a intervalos de seis a ocho semanas.

El papel esencial de la inflamación periférica en la inducción de EHM se ha demostrado en nuestro grupo en modelos animales. Tanto en ratas con EHM por anastomosis porta-cava, como en ratas con hiperamonemia crónica sin fallo hepático, el tratamiento periférico con anti-TNF α previene la inducción de inflamación periférica y, como consecuencia, la aparición de alteraciones cognitivas y motoras (Dadsetan *et al.*, 2016a y 2016b; Balzano *et al.*, 2020a y 2020b). Estos estudios demuestran que la inflamación periférica media las alteraciones neurológicas inducidas tanto por el fallo hepático como por la hiperamonemia crónica.

En esta tesis, a las ratas hiperamonémicas se les administra un tratamiento con un anti-TNF α utilizado en clínica denominado infliximab. Fue aprobado por primera vez por Food and Drug Administration de Estados Unidos en 1998 bajo el nombre comercial de Remicade. Este fármaco consiste en un anticuerpo monoclonal quimérico compuesto por regiones constantes humanas (75%) y regiones variables murinas (25%) producido en

células de hibridoma murino (Lichtenstein *et al.*, 2015). El infliximab neutraliza la actividad biológica del TNF α periférico uniéndose con gran afinidad tanto a la forma soluble (en sangre) como la forma transmembrana (presente en la membrana externa de las células T u otras células del sistema inmune) impidiendo así que esta citocina se una a sus receptores y desencadene sus efectos pro-inflamatorios (Choy y Panayi, 2001).

En encefalopatía hepática, la inflamación periférica induce neuroinflamación y deterioro cognitivo y motor. Dadsetan *et al.* (2016a) demostraron que las ratas con anastomosis porta-cava (PCS) presentan inflamación periférica y neuroinflamación en cerebelo con activación de astrocitos y microglía, y aumento de citocinas proinflamatorias como IL1 β y TNF α . Esto altera la neurotransmisión GABAérgica induciendo incoordinación motora. El tratamiento de las ratas PCS con anti-TNF α , redujo la inflamación periférica y la neuroinflamación y normalizó la neurotransmisión y la coordinación motora. Esto indica que la inflamación periférica juega un papel esencial en la patogénesis de la EHM (Dadsetan *et al.*, 2016a y 2016b).

En esta tesis se ha usado el infliximab para comprobar si la inyección periférica de anti-TNF α reduce la neuroinflamación en el cerebelo de las ratas hiperamonémicas sin fallo hepático. Los datos obtenidos en pacientes y en modelos animales indican que el fallo hepático produce hiperamonemia e inflamación periférica que conducen a **neuroinflamación** con activación de células gliales lo que provoca deterioro cognitivo y motor. Por esta razón, resumimos a continuación los procesos implicados en la inducción de neuroinflamación especialmente en cerebelo.

5. NEUROINFLAMACIÓN

5.1. Células gliales: Microglía y astrocitos

Las células gliales (microglía, astrocitos y oligodendrocitos) son una población altamente heterogénea, que inicia, participa y regula muchas funciones cerebrales. El principal promotor de la neuroinflamación en la mayoría de condiciones patológicas, incluyendo la hiperamonemia crónica y la EH es la activación de microglía y astrocitos (Rodrigo *et al.*, 2010; Agusti *et al.*, 2011; Hernandez-Rabaza *et al.*, 2015, 2016a y 2016b).

Las células gliales proporcionan soporte nutricional y estructural a las neuronas, pero también están involucradas en las respuestas inmunes. Estas células detectan e integran señales de daño neuronal liberando citocinas y quimiocinas y atrayendo a las células inmunes al sitio del daño (Xu *et al.*, 2020). La microglía elimina microbios, células muertas, sinapsis redundantes y otros procesos que puedan poner en peligro al SNC. Hay dos aspectos principales en los que participa la microglía: la defensa inmune y el mantenimiento del SNC. Secreta factores solubles que participan en la respuesta inmune y en la reparación de los tejidos. En condiciones fisiológicas la microglía presenta una forma muy ramificada y explora el ambiente para detectar alteraciones o daño celular. La activación microglial es el primer paso en la respuesta neuroinflamatoria. La microglía se mueve al sitio de lesión sufriendo cambios morfológicos graduales asociados con la "activación microglial", que se produce a través de varios pasos (Jin y Yamashita, 2016).

INTRODUCCIÓN

En la fase inicial, la microglía en reposo aumenta el tamaño de su cuerpo celular, retrae sus procesos haciéndolos más gruesos y disminuyendo su número. También cambia la expresión de diferentes receptores y enzimas y empieza a generar moléculas de respuesta inmune. Algunas microglías vuelven a una modalidad proliferativa mientras que otras van al sitio de la lesión y empiezan a multiplicarse. Éstas últimas se vuelven más móviles concentrándose en el sitio de la lesión. Si la lesión es persistente y las células del SNC mueren, la microglía sufre una transformación a células fagocíticas. Esta activación microglial es un proceso gradual y la microglía puede presentar propiedades diferentes en distintas partes del cerebro y patologías (Hanisch y Kettenmann, 2007).

Con la activación se producen cambios en el fenotipo de la microglía que clásicamente se clasificaban como pro-inflamatorias (M1) o anti-inflamatorias (M2). Este proceso de polarización de la microglía cambia de manera dinámica durante el proceso patológico dependiendo de la fase de la enfermedad y su severidad (Ransohoff, 2016). El fenotipo M1 corresponde a la microglía que produce citocinas pro-inflamatorias como el TNF α , IL1 β , IL-6 y está asociada con citotoxicidad y respuestas pro-inflamatorias. El fenotipo M2 se asocia con la secreción de citocinas anti-inflamatorias como la IL-4, IL-13, IL-10 y TGF- β y con funciones inmunoregulatoras y reparación de tejidos (Figura 9 y 10) (Chhor *et al.*, 2013; Tang y Le, 2016).

Además de sus funciones inmunes, la microglía juega un papel importante en el control de la proliferación y diferenciación neuronal, y en la formación de conexiones sinápticas, ejerciendo efectos directos sobre las neuronas (Kettenmann *et al.*, 2011).

La activación de la microglía también se asocia con una alteración de la BHE ya que libera metaloproteinasas (MMP), citocinas y quimiocinas que pueden permeabilizar la BHE y promover la infiltración de leucocitos en cerebro.

Las moléculas de patrones moleculares asociadas al daño (DAMP) se liberan de las células estresadas o lesionadas o se exponen en su superficie celular, lo que media la aparición de un espectro de respuestas inmunitarias (Lin *et al.*, 2018a). Los DAMP activan la microglía e incluyen la proteína 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1), las proteínas extracelulares de la familia PRX y la galectina-3 (Xu *et al.*, 2020).

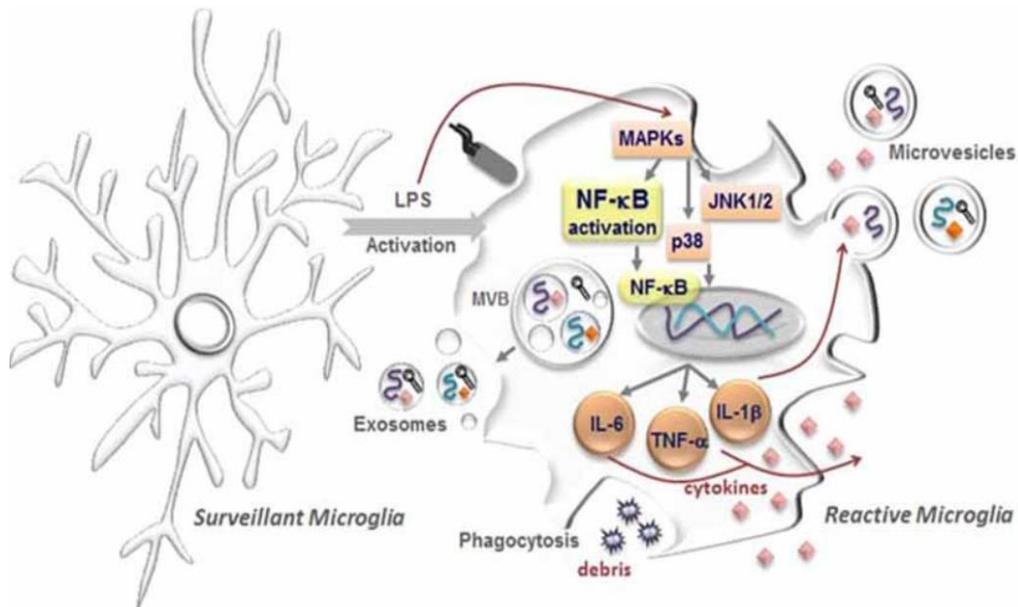


Figura 9. La activación microglial. En el SNC sano, las microglías vigilantes monitorean el parénquima cerebral para mantener la homeostasis. Tras ciertos estímulos como el lipopolisacárido (LPS), la microglía se activa cambiando su morfología y activando vías intracelulares que producen citoquinas pro-inflamatorias. Paralelamente, pueden detectar también restos celulares e intervenir fagocitándolas. Por otra parte, mRNAs, microRNA y citoquinas se incorporan en cuerpos multivesiculares (MVB) y se liberan en exosomas (microvesículas) que participan en la comunicación intercelular en cerebro (Brites y Fernandez, 2015).

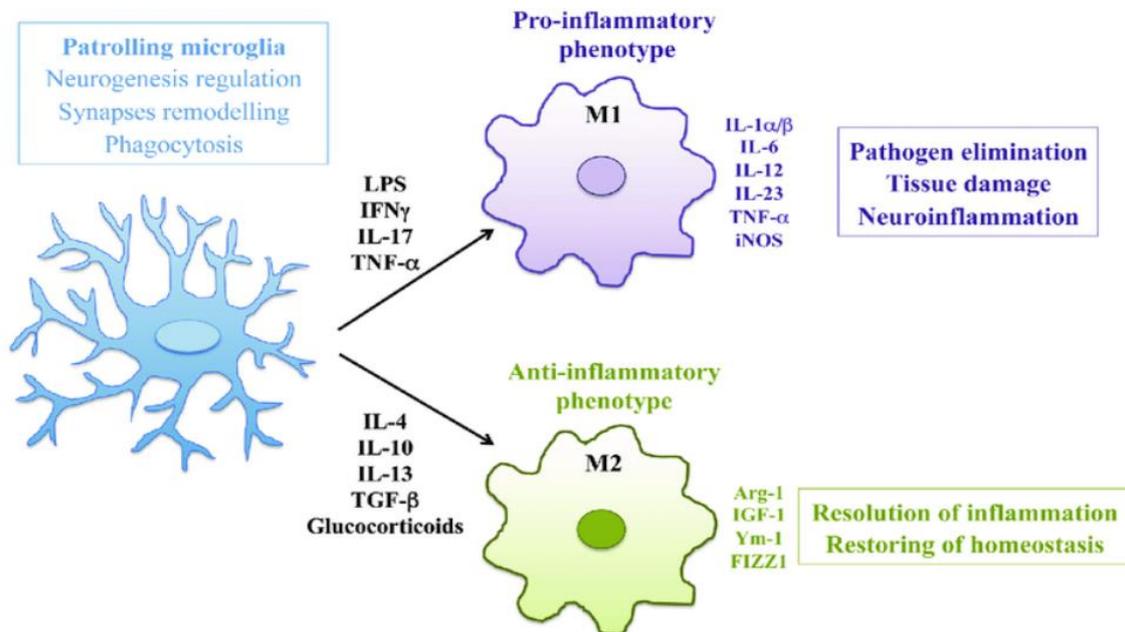


Figura 10. Polarización de la microglía en estado de reposo y de neuroinflamación. Se representa la morfología y el fenotipo asociado de la microglía. En condiciones normales, la microglía regula la homeostasis del SNC con una morfología estrellada. En la neuroinflamación, la microglía presenta una morfología ameboide adquiriendo un fenotipo pro-inflamatorio M1 o anti-inflamatorio M2 alternativo según la composición del medio local (Salvi *et al.*, 2017).

Otra célula glial que participa en el proceso neuroinflamatorio es el **astrocito**. Presenta propiedades fisiológicas muy variables en función de la región cerebral donde se encuentren (Matyash y Kettenmann, 2010). Presentan una apariencia estelar y expresan filamentos intermedios que forman el citoesqueleto, principalmente la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y vimentina. La expresión de GFAP se utiliza como un marcador de activación de astrocitos (Middeldorp J y Hol, 2011). Los astrocitos juegan un papel en la captación y liberación de neurotransmisores (Abg Abd Wahab *et al.*, 2019). Los astrocitos ejercen funciones como el mantenimiento del microambiente y la homeostasis cerebral (Chouard y Gray, 2010), construcción de la microarquitectura del parénquima cerebral (Nave, 2010) y control del desarrollo de las células neurales (Chouard y Gray, 2010) y contribuyen a la defensa del cerebro frente a diversos insultos (Smith, 2010).

El cerebelo tiene un tipo de astrogliá especializada conocida como Glía de Bergmann. Presentan cuerpos celulares relativamente pequeños y de 3 a 6 procesos que se expanden desde la capa de células de Purkinje hasta la superficie pial. Con la formación de la capa granular, adquieren la morfología clásica y por lo general, rodean una sola neurona de Purkinje. Además, forma contactos con las sinapsis formadas por las fibras paralelas en las dendritas de las neuronas de Purkinje (Verkhratsky y Butt, 2007).

5.2. Papel de la neuroinflamación en la inducción del deterioro neurológico en EHM

La neuroinflamación es una respuesta compleja a una lesión cerebral que produce la activación de la glía (microglía y astrocitos) y la liberación de mediadores inflamatorios, como citocinas y quimiocinas. La neuroinflamación puede presentar un papel dual, como neuroprotector o causando daño a los tejidos nerviosos. La neuroinflamación crónica altera la neurotransmisión y puede producir degeneración neuronal. Los efectos y el resultado final de la neuroinflamación dependen del período de tiempo de la respuesta inflamatoria y del estado de activación de la microglía (Abg Abd Wahab *et al.*, 2019).

La neuroinflamación juega un papel importante en la patogénesis de la EHM (Cabrera-Pastor *et al.*, 2019a). La hiperamonemia crónica per se es capaz de inducir neuroinflamación (Rodrigo *et al.*, 2010) pero falta caracterizarla mejor y conocer en detalle los mecanismos implicados y como la neuroinflamación induce las alteraciones neurológicas características de la EHM.

En modelos animales de hiperamonemia y EHM se ha demostrado la presencia de neuroinflamación y su contribución esencial al deterioro motor y cognitivo. Cauli *et al.* (2007) demostraron que en el cerebro de las ratas PCS hay neuroinflamación, aumento de la actividad COX e IL-6. Además, presentan una capacidad reducida de aprender en el laberinto en Y por una menor función de la vía Glutamato-NO-GMPc en el cerebelo (Erceg *et al.*, 2005b). El tratamiento con ibuprofeno disminuyó la neuroinflamación y normalizó la capacidad de aprendizaje al restaurar la función de la vía en el cerebelo in vivo (Cauli *et al.*, 2007). En ratas con EHM, la neuroinflamación produce hipoquinesia que se normaliza con ibuprofeno recuperando la función motora (Cauli *et al.*, 2009). Estos

datos, muestran que la neuroinflamación es un contribuyente fundamental en el deterioro cognitivo y motor en EHM.

Tanto en pacientes como en modelos animales, el cerebelo parece ser la primera área del cerebro que se ve afectada en las primeras etapas de las enfermedades hepáticas crónicas (Rodrigo *et al.*, 2010; Butz *et al.*, 2010; Giménez-Garzó *et al.*, 2017). La neuroinflamación es más intensa en el cerebelo que en otras áreas del cerebro en ratas con hiperamonemia y EHM (Rodrigo *et al.*, 2010).

De acuerdo con la aparición temprana de neuroinflamación en el cerebelo, una de las primeras alteraciones en hiperamonemia y EHM es el deterioro de la coordinación motora, que está modulada principalmente por la neurotransmisión GABAérgica en el cerebelo.

Cabrera-Pastor *et al.* (2018a) observaron que la neuroinflamación en el cerebelo altera la neurotransmisión produciendo un aumento de GABA extracelular y con ello un déficit en la coordinación motora (Figura 11). En hiperamonemia, se activa la microglía y los astrocitos aumentando el TNF α y la expresión en membrana de su receptor TNFR1. La activación de TNFR1 aumenta la translocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo lo que aumenta la transcripción de glutaminasa, que hidroliza glutamina para formar glutamato. Esto aumenta el glutamato extracelular y la actividad de los transportadores de glutamato lo que aumenta el Na⁺ intracelular. Las alteraciones en el gradiente de Na⁺ provocan que la función del transportador GAT3, se revierta haciendo que libere GABA y aumente el contenido de este neurotransmisor en el medio extracelular del cerebelo. Como consecuencia se induce incoordinación motora (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

La administración intracerebral crónica de GMPc extracelular a ratas con hiperamonemia crónica en el cerebelo normaliza el contenido extracelular de GABA al reducir la neuroinflamación, incluyendo la activación de la microglía y astrocitos y la expresión en membrana del receptor del TNF α . Esto reduce la expresión de glutaminasa y por tanto el glutamato extracelular. Finalmente, como consecuencia se normaliza la función del transportador de GABA GAT-3 y se reduce el GABA extracelular en cerebelo lo que restablece la coordinación motora (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

Estos resultados indican que la vía TNF α -TNFR1-NF- κ B juega un papel esencial en la inducción de incoordinación motora en ratas con hiperamonemia crónica.

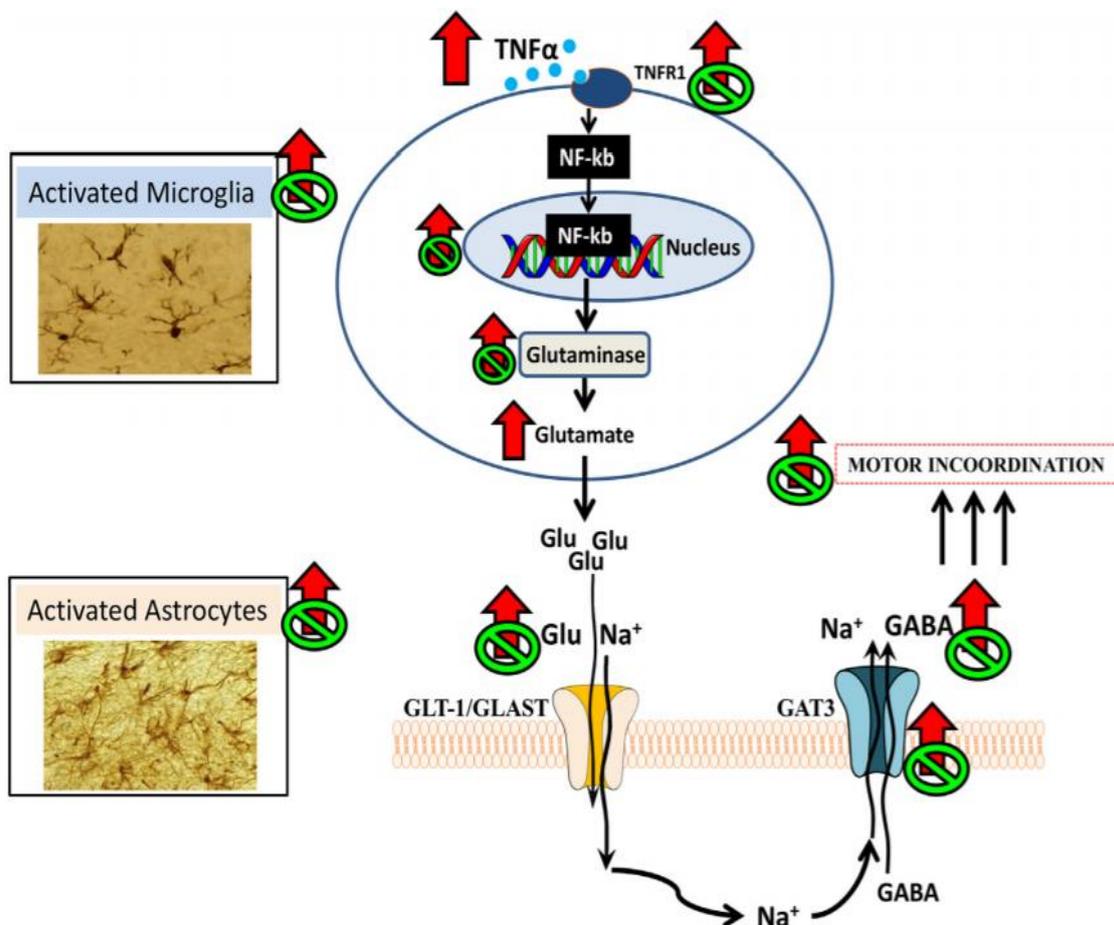


Figura 11. Mecanismo por los que la neuroinflamación aumenta los niveles de GABA extracelular en cerebelo e induce incoordinación motora en ratas hiperamonémicas. La administración in vivo de GMPc extracelular reduce la neuroinflamación, el tono GABAérgico y la incoordinación motora en cerebelo de ratas hiperamonémicas. Las alteraciones en esta vía en hiperamonemia crónica están indicadas con flechas rojas y la reversión de las alteraciones por GMPc extracelular con círculos verdes (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a). Ver explicación en el texto.

5.3. Vía de señalización TNF α -TNFR1-NF- κ B

En el cerebro, la microglía y los astrocitos suelen ser las principales fuentes de TNF α . Sin embargo, la síntesis de TNF α se induce en neuronas en algunas situaciones patológicas, como el accidente cerebrovascular (Liu *et al.*, 1994), hemorragia intracerebral (Zhang *et al.*, 2019), lesión de la médula espinal (Ohtori *et al.*, 2004) y lesión del nervio ciático (Schäfers *et al.*, 2003). La expresión de TNF α y su mRNA también se induce en neuronas del hipocampo de ratas con EHM (Dadsetan *et al.*, 2016b). Además, en las neuronas del hipocampo in vivo las lesiones inducen TNF α e IL-1 β (Tchélingérian *et al.*, 1996) y meningitis neumocócica (Izadpanah *et al.*, 2014). Estudios de hibridación in situ han demostrado que, en la meningitis neumocócica murina, el ARNm de TNF α se induce inicialmente en los astrocitos, pero aumenta fuertemente en las neuronas del hipocampo a las 18-24 h (Izadpanah *et al.*, 2014). *Phoneutria nigriventerel* es un veneno de araña que causa permeabilidad de la barrera hematoencefálica e induce neuroinflamación y expresión de TNF α en las neuronas de Purkinje en ratas (da Cruz-Höfling *et al.*, 2009). Estos estudios sugieren que la inducción de la expresión de TNF α en las neuronas,

incluidas las neuronas de Purkinje, puede ocurrir en diferentes situaciones patológicas y está precedida por la inducción de TNF α en las células gliales. Sin embargo, los mecanismos implicados no se conocen bien (Balzano *et al.*, 2020b). En esta tesis estudiaremos en qué tipos celulares se induce el TNF α en cerebelo de ratas hiperamonémicas a distintos tiempos de hiperamonemia.

El TNF α es una citocina que desempeña funciones pleiotrópicas en inmunidad, inflamación, control y proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Wallach *et al.*, 1999; Balkwill, 2009). Se forma como un precursor de 27 kDa (233 aminoácidos) que se une a la membrana celular de las células productoras. Este precursor se escinde por proteólisis para liberar la forma de 17 kDa por la acción de la enzima proteinasa convertidora de TNF α llamada TACE o ADAM17. Tras la escisión por ADAM17, el TNF α libre forma un homotrímero que es el que tiene actividad biológica (Black *et al.*, 1997).

Las acciones del TNF α se producen a través de dos tipos de receptor en la superficie celular: TNFR1 y TNFR2 (Cheng y Goeddel, 2002). Estos receptores presentan un dominio rico en cisteína (CRDs) que define la especificidad del ligando, un dominio de muerte (“Death Domain, DD”) cuya activación promueve el reclutamiento de proteínas que conduce a la formación de un complejo llamado DISC (Death-inducing signaling complex) que puede inducir la apoptosis celular mediada por caspasas (Micheau y Tschopp, 2003). Las vías de señalización inducidas por TNF α son complejas pudiendo tener consecuencias distintas en diferentes tipos celulares y circunstancias (Figura 12) (Fiegel, 2008). La activación excesiva o inadecuada de las vías activadas por TNF α se ha implicado en la patogénesis de muchas enfermedades, incluyendo cáncer, sepsis, diabetes y enfermedades autoinmunes (Wang, Du y Wang, 2008).

La unión de TNF α al receptor TNFR1, conduce al reclutamiento de la proteína adaptadora de TNF α llamada TRADD, lo que crea una plataforma para la unión de proteínas adicionales como TRAF2, cIAP1 y cIAP2 (inhibidor de la proteína de apoptosis 1 y 2), RIP y FADD (dominio de muerte asociado a FAS). Todo ello conduce a la formación del complejo 1 (Pegoretti *et al.*, 2018). TRAF2 (Factor 2 asociado al receptor de TNF α) desencadena la activación de la vía de la proteína quinasa MAPK que produce la activación de la quinasa c-Jun (JNK) (Figura 12). Además, RIP está implicada en la activación del factor de transcripción NF- κ B aumentando así su actividad transcripcional y la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (Cheng *et al.*, 2002). La formación del complejo 1 se puede inhibir utilizando el compuesto R7050. R7050 no afecta la unión de TNF α a TNFR1, pero inhibe selectivamente la asociación de TNFR1 con moléculas adaptadoras intracelulares (por ejemplo, TRADD y RIP) e inhibe las respuestas celulares posteriores después de la unión de TNF α (King, Alleyne and Dhandapani, 2013).

En esta tesis hemos evaluado si el bloqueo de TNFR1 con R7050 reduce la neuroinflamación en cerebelo de ratas hiperamonémicas y los mecanismos implicados.

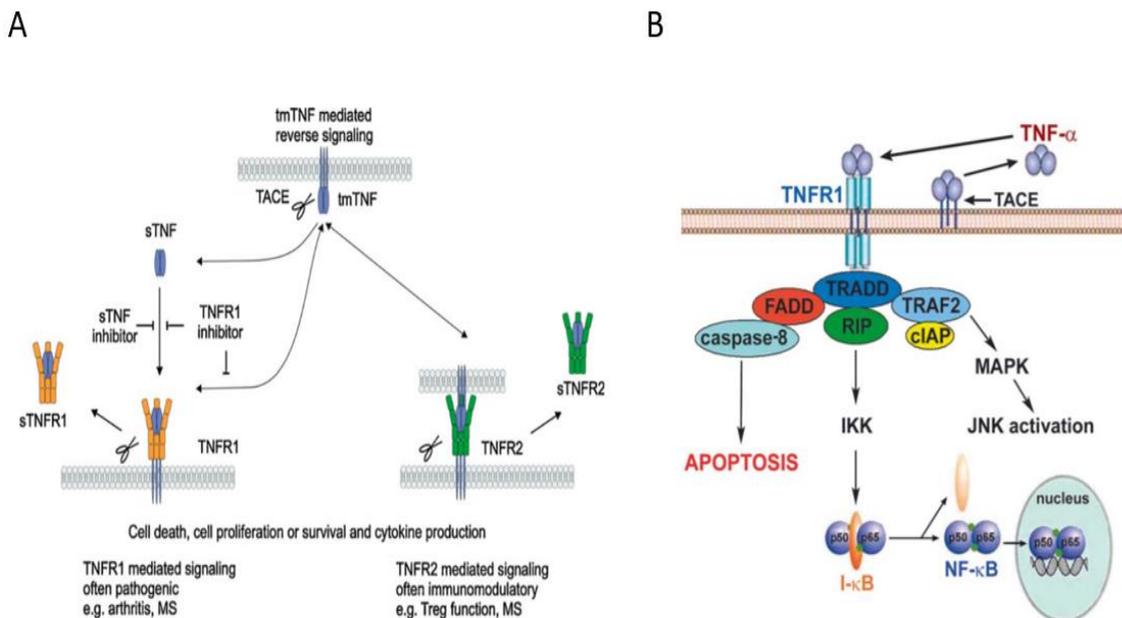


Figura 12. Vías de señalización de TNF α . A) La señalización inducida por TNF α se genera a través de la interacción con dos receptores transmembrana, TNFR1 y TNFR2. TNFR1 se activa por formas solubles y transmembrana, con mayor afinidad por TNF soluble, mientras que la activación de TNFR2 se debe únicamente a TNF transmembrana. Además, los dos receptores difieren en las vías intracelulares que activan, lo que lleva a diversas respuestas celulares. TNFR1 se ha descrito como un estimulador de la apoptosis mediada por caspasa, mientras que TNFR2 promueve la supervivencia celular (Van Hauwermeiren, Vandenbroucke y Libert, 2011). B) Vías de señalización de TNFR1 (ver texto) (Figiel, 2008).

NF- κ B es un factor de transcripción que controla la expresión de muchos genes y regula múltiples aspectos de las respuestas inmunes innatas y adaptativas, induciendo la expresión de genes pro-inflamatorios, incluido el TNF α (Ahn y Aggarwal, 2005; Mo, Ye y Li, 2019). Una activación aberrante de NF- κ B se ha asociado con diversas enfermedades incluyendo cáncer, enfermedades autoinmunes, y enfermedades neurodegenerativas. En enfermedades inflamatorias y autoinmunes crónicas las citocinas pro-inflamatorias inducen la activación de NF- κ B y la activación de NF- κ B induce la producción de éstas (Lawrence, 2009).

La activación de NF- κ B se modula por una serie de factores reguladores tanto positivos como negativos. En las células en reposo, los dímeros de NF- κ B (predominantemente complejos p50 / p65) se mantienen inactivos en el citoplasma mediante la asociación con proteínas I κ B. Los estímulos inductores desencadenan la activación del complejo I κ B, lo que conduce a su fosforilación, ubiquitinación y degradación de las proteínas I κ B. Los dímeros de NF- κ B liberados de la unión a I κ B se translocan al núcleo y se unen a secuencias de ADN específicas promoviendo la transcripción de genes diana incluido el TNF α , la IL-6, CCL2, la glutaminasa, HMGB1... (Lehmann *et al.*, 2009; Hayden y Ghosh, 2012; Contreras-Nuñez *et al.*, 2018; Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a; Wang *et al.*, 2020).

El TNF α tiene un papel central como desencadenante de la neuroinflamación en diversas enfermedades como esclerosis múltiple y otras enfermedades neurodegenerativas (Lin y Karin, 2007; Yosefifard *et al.*, 2019; Babiuch *et al.*, 2020) y también en hiperamonemia y EHM (Hernández-Rabaza *et al.*, 2015, 2016a; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a). Sin embargo, no está claro cómo la hiperamonemia induce un aumento de TNF α en el cerebelo ni en qué tipos de células aumenta el contenido de TNF α (Balzano *et al.*, 2020b). En esta tesis estudiaremos estas cuestiones y los mecanismos por los que el TNF α promueve la neuroinflamación. Hipotetizamos que uno de estos mecanismos es potenciando la vía CCL2-CCR2, por esta razón describimos a continuación esta vía.

5.4. Vía CCL2-CCR2. Papel en la neuroinflamación

Además de por las citocinas pro-inflamatorias como TNF α o IL-1 β , la neuroinflamación puede ser regulada por quimiocinas o citocinas quimiotácticas. Las quimiocinas son una familia de pequeñas proteínas (60-100 aminoácidos) de baja masa molecular (8-14 kDa), que juegan un papel esencial en la migración celular y en la comunicación intercelular. Pueden ser producidas por una variedad de tipos de células en el SNC, incluidas las células gliales y neuronales. Aunque las quimiocinas se definieron inicialmente como citocinas inducibles que facilitaban el reclutamiento de diferentes subtipos de leucocitos al sitio de inflamación, hoy en día se sabe que también están implicadas en el control de la circulación de células inmunes entre la sangre, los tejidos incluido el cerebro y los órganos linfoides. Regulan además numerosos procesos celulares como la adhesión, la apoptosis, la proliferación, la fagocitosis o la secreción de citocinas, y están implicadas en procesos como desarrollo celular, angiogénesis, crecimiento de tumores o metástasis (Deshmane *et al.*, 2009).

El sistema de quimiocinas media la inflamación aguda al impulsar la migración de leucocitos a tejidos dañados o infectados. La expresión elevada de quimiocinas y sus receptores contribuye a la inflamación crónica y la malignidad (Fantuzzi *et al.*, 2019).

En esta tesis hemos estudiado principalmente la citocina CCL2, su receptor CCR2 y alguna de las vías que modulan o los modulan. CCL2 también conocida como proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1) juega un papel clave en la neuroinflamación asociada a diferentes enfermedades del SNC y regula también la barrera hematoencefálica (BHE). CCL2 recluta monocitos, células T de memoria y células dendríticas a los sitios de inflamación producida por lesión tisular o infección (Madrigal *et al.*, 2014; Zhang y Luo, 2019).

La función biológica de CCL2 está mediada por la activación de su receptor CCR2. CCR2 es capaz de unir las cinco quimiocinas pro-inflamatorias: CCL2, CCL7, CCL8, CCL12 y CCL13. Sin embargo, CCL2 es la más potente para activar las vías de transducción de señales activadas por CCR2. CCR2 juega un papel pro-inflamatorio en las APC (células presentadoras de antígeno) y las células T, mientras que en las células T reguladoras juega un papel anti-inflamatorio (Stone *et al.*, 2017).

INTRODUCCIÓN

La activación de CCR2 induce la expresión de IL-1 β , CCL2 y TNF α . Las proteínas cuya actividad se modula por CCR2 incluyen fosfatidilinositol-3-OH quinasa (PI3K), MAPK y PKC lo que indica que una amplia gama de vías intracelulares pueden estar implicadas en las respuestas celulares provocadas por CCL2 (Figura 13). La expresión de CCL2 requiere la translocación al núcleo de factores de transcripción como AP-1 o NF- κ B, que puede ser inducida por citocinas u otros agentes (Bose y Cho, 2013).

CCL2 es la principal quimiocina responsable del reclutamiento de monocitos. En el sistema inmunitario periférico, la señalización de CCL2/CCR2 juega un papel crucial en la guía y dirección de las células inmunes en respuesta a desafíos inflamatorios (Zhang y Luo, 2019)

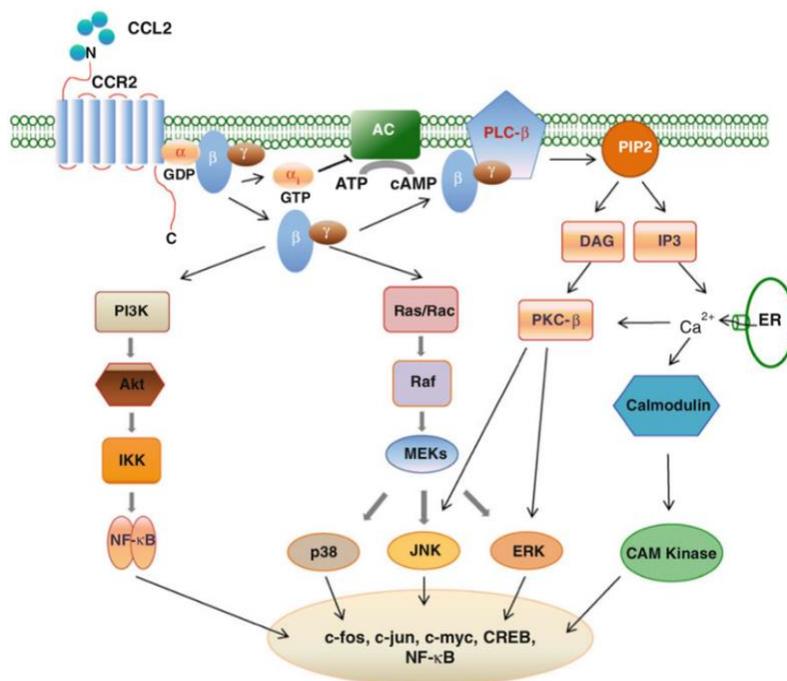


Figura 13. Diagrama esquemático de las vías de señalización intracelular activadas por CCL2/ CCR2 (Bose y Cho, 2013).

5.4.1. CCL2-CCR2 en el cerebro

CCL2 juega un papel relevante en muchas enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas (Bose y Cho, 2013). CCL2 y CCR2 se expresan principalmente en microglía y astrocitos en el SNC (Gao *et al.*, 2009; Deshmane *et al.*, 2009). El CCL2 derivado de astrocitos activa células microgliales, y la inhibición de CCR2 atenúa la activación microglial mediada por CCL2 (He *et al.*, 2016).

El sistema CCL2-CCR2 está implicado en las interacciones funcionales entre los astrocitos y la microglía. En un modelo de cirugía de fractura tibial se observó un aumento de CCL2 en astrocitos activados y un aumento de la expresión de CCR2 en la microglía activada asociados a un déficit en el aprendizaje y la memoria. La inyección de RS504393, un antagonista de CCR2, inhibió este efecto reduciendo la activación microglial, la polarización M1 de la microglía, las citocinas pro-inflamatorias y la lesión y muerte neuronal y mejoró la función cognitiva. Estos datos indican que la señalización CCL2-CCR2 está implicada en la activación microglial inducida por astrocitos y podría constituir una diana terapéutica para mejorar la función cognitiva (Xu *et al.*, 2017).

La señalización de CCL2 / CCR2 está implicada en trastornos neuroinflamatorios, como la enfermedad de Alzheimer (EA) (Galimberti *et al.*, 2006), la esclerosis múltiple (Mahad y Ransohoff, 2003) y el daño cerebral por isquemia (Minami y Satoh, 2003).

CCL2 y CCR2 también se expresan en las neuronas del SNC y en líneas celulares neuronales en cultivo (Banisadr *et al.*, 2005a, 2005b; Mulet *et al.*, 2020). En las ratas, CCL2 se expresa constitutivamente en las neuronas de cerebelo, corteza cerebral, hipocampo, hipotálamo, sustancia negra y médula espinal (Figura 14). La señalización CCL2-CCR2 puede regular también funciones neuronales.

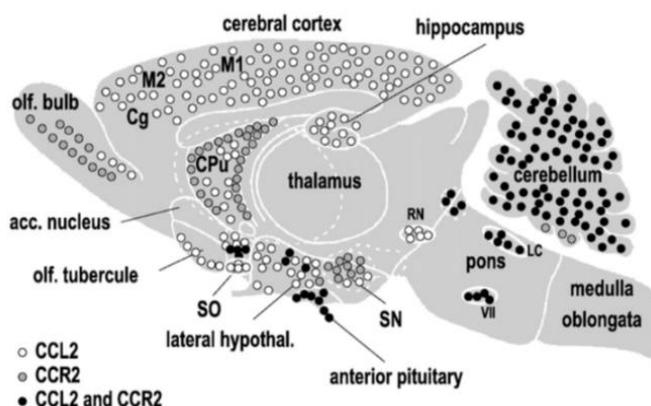


Figura 14. Localización neuroanatómica de CCL2 (círculos blancos) y su receptor (círculos grises) en el cerebro de rata adulta normal. En varias regiones, la distribución de la quimiocina y su receptor se superponen (círculos negros) (Banisadr *et al.*, 2005b).

Se han observado niveles elevados de CCL2 en cerebros de pacientes con EA y en modelos de la enfermedad en ratones transgénicos. Galimberti *et al.* (2006) comprobaron que la transición del deterioro cognitivo leve a la EA se asocia con un aumento de los niveles de CCL2 en el líquido cefalorraquídeo (LCR). El aumento de los niveles de β -amiloide induce CCL2, lo que da como resultado la permeabilización de la BHE facilitando el reclutamiento de células inmunes al SNC. Un aumento de CCL2 en sangre periférica puede atraer monocitos de la sangre para migrar al cerebro, y un mayor nivel plasmático de CCL2 se asocia con una mayor gravedad y un mayor deterioro cognitivo (Galimberti *et al.*, 2006).

Van Gassen *et al.* (2005) mostraron que las neuronas de Purkinje del cerebelo de rata, expresan CCL2 y que el receptor CCR2 se expresa en todo el cerebelo de rata, incluidas las neuronas de Purkinje, las granulares y las interneuronas. Cuando se activa CCR2 por CCL2 modula los niveles de Ca^{+2} intracelular y reduce la excitabilidad neuronal (Van Gassen *et al.*, 2005). En ratones el CCL2 aumenta en el cerebro tras una lesión hepática aguda y contribuye a la activación de la microglía y al deterioro neurológico. La reducción de la actividad del receptor CCR2 o CCR4 reduce la activación de la microglía, la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF α y el deterioro neurológico en ratones con encefalopatía hepática aguda (McMillin *et al.*, 2014; McMillin *et al.*, 2015; McMillin *et al.*, 2019).

Zhang *et al.* (2017) demostraron que la expresión de CCL2 en neuronas aumenta en ratones con EH, lo que resulta en la activación de microglía en la corteza cerebral y disfunción neurológica. Observaron en cultivos primarios de neuronas que el medio de

neuronas estimuladas con $\text{TNF}\alpha$, con un alto nivel de CCL2, promueve la activación de la microglía, que se suprime por el bloqueo de los receptores de CCL2. Además, demostraron que el CCL2 derivado de neuronas contribuye a la proliferación de microglía, la activación clásica (M1) *in vitro* y la liberación de factores pro-inflamatorios como $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$. El mecanismo subyacente implicaría la activación de la vía de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ya que el CCL2 promueve la fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en microglía, y así aumenta la translocación al núcleo de $\text{NF-}\kappa\text{B p65}$ (Zhang *et al.*, 2017).

En esta tesis hemos investigado el papel de la vía CCL2-CCR2 en los mecanismos por los que la hiperamonemia induce neuroinflamación en cerebelo y en los mecanismos por los que la neuroinflamación altera la neurotransmisión inhibitoria. Hipotetizamos que una de las vías por las que CCL2-CCR2 participan en estos procesos es mediante la inducción de BDNF. Por esta razón describimos a continuación BDNF y sus vías de señalización.

5.5. BDNF. Vía de señalización BDNF-TrkB-KCC2

Las neurotrofinas (NT) son una familia de factores de crecimiento sintetizadas en el SNC por neuronas y células gliales, pero también por células periféricas no neuronales como los linfocitos T y B y monocitos. Está compuesta por: factor de crecimiento nervioso (NGF, nerve growth factor), factor neurotrófico derivado del cerebro (**BDNF**), neurotrofina 1 (NT-1), neurotrofina 3 (NT-3) y neurotrofina 4 (NT-4). Estas neurotrofinas regulan la supervivencia, crecimiento y diferenciación neuronal, además de ser potentes moduladores de las sinapsis por su influencia en la eficiencia sináptica a corto y largo plazo. BDNF puede modular la transmisión sináptica y la plasticidad en las sinapsis tanto excitadoras como inhibitorias. En algunas enfermedades neurodegenerativas y neuropsiquiátricas algunos defectos en la plasticidad sináptica parecen ser debidos al insuficiente suministro neuronal de BDNF y otros factores neurotróficos (Wei *et al.*, 2018; Palasz *et al.*, 2020).

En situaciones de neuroinflamación se produce activación de la microglía y la activación de receptores purinérgicos P2X4 y P2X7 promoviendo la síntesis y liberación de BDNF en la microglía (Ferrini y De Koninck, 2013).

Las NT activan dos clases de receptores de membrana: el Trk de la familia de receptores tirosina quinasa y el receptor p75, un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). Las NT se unen a tres subtipos de receptores Trk: TrkA, TrkB y TrkC con diferente selectividad. El factor de crecimiento nervioso (NGF) se une especialmente a TrkA, el BDNF y la neurotrofina-4/5 (NT-4/5) se unen a TrkB y la neurotrofina-3 (NT-3) se une preferentemente a TrkC. **TrkB** consta de tres dominios que incluyen un dominio extracelular de unión de ligando extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático de tirosina quinasa (Figura 15) (Tajbakhsh *et al.*, 2017). BDNF y su receptor TrkB se expresan en niveles altos en el cerebelo (Zhou *et al.*, 2015; Jin, 2020).

La vía de señalización BDNF-TrkB regula el crecimiento dendrítico, la maduración, estabilización y desarrollo de sinapsis, la plasticidad sináptica dependiente de los

procesos de aprendizaje y memoria, la apoptosis y la supervivencia de las neuronas (Wu *et al.*, 2019; Palasz *et al.*, 2020).

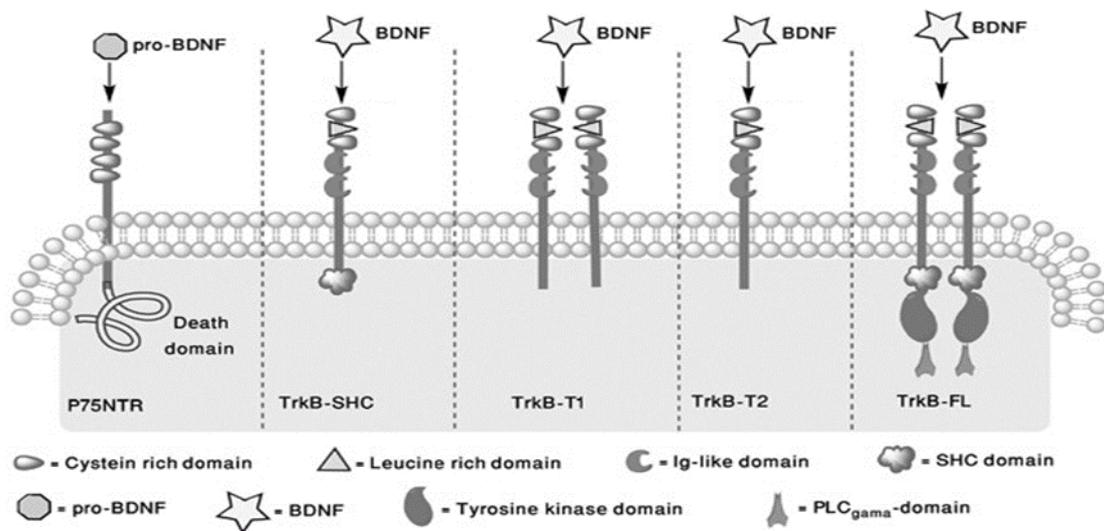


Figura 15. Diferentes receptores de BDNF. El BDNF maduro interactúa con todos los receptores, mientras que pro-BDNF interactúa con P75NTR. La principal diferencia entre los receptores BDNF son sus dominios intracelulares. TrkB-FL tiene tres dominios intracelulares que incluyen SHC, tirosina quinasa y PLC γ , mientras que TrkB-SHC solo tiene dominio SHC (Src Homology 2). TrkB-T1 y TrkB-T2 son deficientes en todos los dominios intracelulares. La fracción extracelular de P75NTR está compuesta por cuatro dominios ricos en cisteína y la fracción intracelular está formada por el dominio de muerte (Modificada de Tajbakhsh *et al.*, 2017).

5.5.1. BDNF y neuroinflamación

Diversas enfermedades, sobre todo neurodegenerativas, están asociadas con una disminución de los niveles de BDNF en cerebro y en sangre (Lima Giacobbo *et al.*, 2019). En el caso de la encefalopatía hepática, se ha descrito una disminución de la expresión de BDNF en el cerebelo en el modelo de ligadura biliar lo que contribuiría a alteraciones cognitivas (Dhanda *et al.*, 2018).

En ratas con hepatectomía parcial, el tratamiento con nicotina mejora el deterioro cognitivo (aprendizaje espacial y la memoria) al aumentar la expresión de BDNF e inhibir la neuroinflamación en el hipocampo. El mecanismo implicado sería la activación de la vía de señalización BDNF/TrkB produciendo neuroprotección y la inhibición de vías de señalización relacionadas con la neuroinflamación como NF- κ B, IL-1 β , TNF α y HMGB1 (Wei *et al.*, 2018).

Uno de los principales factores de activación inflamatoria es el NF- κ B, que induce la expresión de varios genes pro y antiapoptóticos, incluido el BDNF. La unión del BDNF al receptor TrkB también puede inducir la expresión y translocación al núcleo de NF- κ B, aunque las vías implicadas en esta modulación todavía no están claras (Lima Giacobbo *et al.*, 2019).

5.5.2. Modulación de la neurotransmisión por BDNF

El BDNF modula la potenciación a largo plazo en las sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas en el SNC. La administración aguda de BDNF mejora la transmisión glutamatérgica y reduce la GABAérgica en el SNC. El BDNF puede modular la transmisión GABAérgica positiva o negativamente a través de diversas vías de señalización desencadenadas por activación de TrkB o p75^{NTR}. La señalización de BDNF-TrkB también regula positivamente el ARNm de GAD67 y GAT-1 neuronal afectando la concentración presináptica de GABA por aumento de la activación de GAT-1 (Vaz *et al.*, 2011). El BDNF mejora el transporte de GABA mediado por GAT-1 en astrocitos y / o neuronas. Además, el BDNF regula positivamente la expresión de GABA_AR α 4 por estimulación de Egr-3 relacionada con la activación de la vía PKC, pero disminuye los niveles de la subunidad α 1 de GABA_AR en las neuronas del hipocampo, lo que sugiere que el BDNF tiene un papel potencial en la regulación diferencial de la expresión de receptores GABA_A sinápticos y extrasinápticos (Roberts *et al.*, 2006).

El BDNF también modula indirectamente la transmisión GABAérgica a través de la regulación postsináptica del transporte de Cl⁻ como se describe en el siguiente apartado (Wardle y Poo, 2003).

6. VÍA CCL2-BDNF EN MICROGLÍA ACTIVADA Y SU EFECTO SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN INHIBITORIA

La microglía juega un papel clave en la regulación de redes neuronales mediante la modulación de la neurotransmisión GABAérgica y glicinérgica. En esta modulación juega un papel relevante la vía CCL2-BDNF como se describe en este apartado. El GABA y la glicina median la inhibición sináptica, activando sus respectivos canales iónicos, permeables a iones cloruro (Cl⁻) que fluyen hacia dentro de la célula en condiciones fisiológicas. Cambios en la concentración de Cl⁻ intracelular modulan la inhibición sináptica mediada por GABA y glicina. Los niveles intracelulares de Cl⁻ en las neuronas determinan si las respuestas de los neurotransmisores son inhibitorias o excitadoras. Si la concentración de Cl⁻ intracelular aumenta por encima de la extracelular, la activación de receptores GABA_A o de glicina conduce a una salida de Cl⁻ de las neuronas en vez de a una entrada conduciendo a un cambio en las respuestas mediadas por receptores GABA_A o glicina de hiperpolarización a despolarización. Los niveles intracelulares de Cl⁻ dependen a su vez de la actividad de KCC2. Los cotransportadores de K⁺Cl⁻ o KCCs son proteínas de membrana que transportan Cl⁻ sin producir cambios en el potencial de membrana. Pertenecen a la familia SLC12 (Solute Carrier Family 12) de cotransportadores electroneutros acoplados a cloro (CCC). El transportador encargado del mantenimiento de la concentración óptima de Cl⁻ es KCC2, que expulsa el Cl⁻ intracelular a favor de gradiente de K⁺, permitiendo así la inhibición sináptica (Wake *et al.*, 2007).

INTRODUCCIÓN

En las neuronas maduras, el Cl⁻ intracelular se mantiene en bajas concentraciones por la activación de canales y transportadores de Cl⁻; en la mayoría de las neuronas el Cl⁻ intracelular se modula esencialmente por KCC2 (Lee-Hotta *et al.*, 2019).

Alteraciones en la función de KCC2 producen una disminución de la neurotransmisión inhibitoria en diversas enfermedades neurológicas, como epilepsia, esquizofrenia y condiciones de estrés, conduciendo a un aumento de excitación (Ferrini y De Koninck, 2013).

En situaciones de neuroinflamación se produce la liberación de CCL2, CCL21 y de ATP y la activación de la microglía. El ATP extracelular, activa los receptores purinérgicos P2X7 y P2X4 promoviendo la síntesis y liberación de BDNF en la microglía activada. Los receptores purinérgicos P2X son canales iónicos de membrana que se abren en respuesta a la unión de ATP y participan en la comunicación intercelular entre neurona-astrocito-microglía (Magni *et al.*, 2014; Illes *et al.*, 2020). Los receptores P2X4R se expresan de novo por la microglía activada en la médula espinal (Ulmann *et al.*, 2008; Stokes *et al.*, 2017). La expresión de estos receptores, provoca un cambio hacia una microglía anti-inflamatoria (Zabala *et al.*, 2018). P2X4R se expresa principalmente en cerebelo con niveles más altos en las neuronas de Purkinje y neuronas granulares del cerebelo (Tanaka *et al.*, 1996; Rubio y Soto, 2001).

P2X4R en condiciones fisiológicas presenta un nivel de expresión en membrana y de activación muy bajo. Sin embargo, en condiciones patológicas la liberación de quimiocinas como CCL2 y CCL21, inducen un aumento de activación de P2X4R. CCL21 parece inducir la síntesis de novo de P2X4R, mientras que CCL2 no, pero promueve el tráfico de P2X4R desde el interior celular a la membrana lo que aumenta su activación. La activación de P2X4R, induce un aumento de Ca⁺² intracelular, que aumenta la fosforilación y activación de la MAP quinasa p38 (p38 MAPK), y como consecuencia la síntesis y liberación de BDNF (Trang *et al.*, 2009).

Todas estas proteínas forman parte de una de las vías de activación microglial: la vía CCL2, P2X4R, MAPKp38, BDNF que fue descrita por Ferrini y De Koninck (2013). Es una vía de comunicación entre la microglía y neuronas que modula la excitabilidad neuronal. BDNF y su receptor TrkB se expresan en niveles altos en cerebelo en las neuronas de Purkinje (Zhou *et al.*, 2015). El BDNF liberado por la microglía actúa sobre TrkB en neuronas y modula la activación de KCC2, que a su vez modula la neurotransmisión GABAérgica y glicinérgica. El BDNF modula la actividad neuronal y la plasticidad sináptica al actuar como modulador de KCC2, y, por tanto, de la homeostasis del Cl⁻ intracelular. La actividad y expresión en membrana de KCC2 parece depender del nivel de activación de TrkB. La unión de BDNF al receptor TrkB, promueve la desfosforilación de KCC2 en el residuo tirosina-1087, reduciendo así su expresión en membrana por un aumento de la internalización/endocitosis o una disminución de la exocitosis (Wake *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2009; Ferrini y De Koninck, 2013).

Los resultados de estos estudios indican que, en situaciones de neuroinflamación, el aumento de CCL2 induciría un aumento de BDNF en la microglía activada que podría

contribuir a la modulación de la neurotransmisión inhibitoria a través de la modulación de KCC2. Uno de los objetivos de esta tesis consiste en averiguar si este mecanismo contribuye a la inducción de neuroinflamación y a las alteraciones en neurotransmisión en cerebelo de ratas hiperamonémicas e identificar qué tipos celulares están implicados. También nos proponemos identificar el mecanismo por el que aumenta CCL2 en cerebelo de ratas hiperamonémicas. Uno de los mecanismos por los que puede aumentar CCL2 es como consecuencia de la activación de receptores de esfingosina-1-fosfato. Resumimos a continuación el papel de los esfingolípidos en la neuroinflamación.

7. ESFINGOLÍPIDOS: PAPEL DE LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO EN LA NEUROINFLAMACIÓN

Los esfingolípidos son lípidos complejos que derivan del aminoalcohol insaturado de 18 carbonos esfingosina, están presentes principalmente en la superficie de la membrana y definen las propiedades físicas y químicas de las membranas. El metabolismo de los esfingolípidos incluye varios metabolitos intermedios, como esfingomielina, ceramida, esfingosina y **esfingosina-1-fosfato (S1P)**, siendo este último importante en el contexto de esta tesis por su papel en la neuroinflamación. Los metabolitos de los esfingolípidos están emergiendo como moléculas de señalización importantes que regulan el crecimiento celular, la supervivencia, el tráfico de células inmunes y la integridad vascular y epitelial siendo particularmente importantes en la inflamación. Los esfingolípidos, las enzimas que participan en su biosíntesis y catabolismo y los receptores de algunos esfingolípidos, están estrechamente relacionados con el proceso inflamatorio, y se ha sugerido que son dianas farmacológicas útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Lee, Jin y Bae, 2020).

La producción de esfingolípidos bioactivos está regulada por una serie de reacciones en la que la producción de ceramida se considera el eje central. Puede producirse por tres vías principales (Figura 17): 1) la vía de síntesis de novo implica las acciones concertadas de las actividades serina palmitoil-CoA transferasa (SPT) y ceramida sintasa (CerS); 2) la vía de la esfingomielinasa (SMasa) genera ceramida directamente a través de la degradación de la esfingomielina (SM) por las SMasas. La reacción inversa es catalizada por SM sintasas para generar SM; 3) la vía de recuperación utiliza esfingosina derivada del metabolismo de los esfingolípidos complejos para formar ceramida. Una vez generada, la ceramida puede fosforilarse a Ceramida-1P por la ceramida quinasa (CerK), o puede ser degradada por las ceramidasa para formar esfingosina. La fosforilación de la esfingosina por las esfingosinas quinasas (SphK) produce S1P. La reacción inversa es catalizada por las S1P fosfatasas (SPP). La S1P liasa degrada irreversiblemente S1P a 2-trans hexadecenal y etanolamina fosfato (Figura 17) (Gómez-Muñoz *et al.*, 2016).

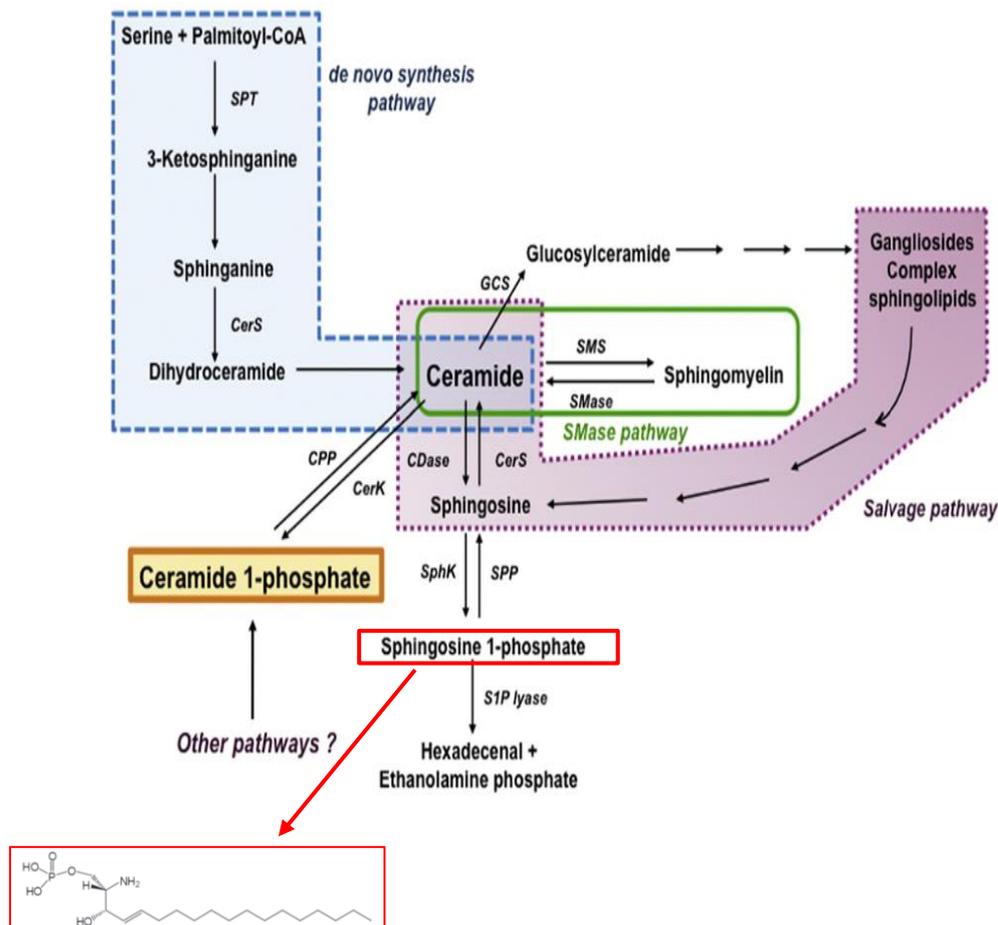


Figura 17. Vías metabólicas de biosíntesis de ceramida, esfingosina 1-fosfato y ceramida 1-fosfato (Adachi y Chiba, 2007; modificada de Gómez-Muñoz *et al.*, 2016).

El cerebro tiene el mayor contenido de esfingolípidos. Las células del SNC poseen distintos tipos de esfingolípidos dependiendo del tipo de célula, ubicación y condiciones fisiopatológicas. Cambios en los niveles de lípidos del cerebro pueden iniciar procesos patológicos en enfermedades neuroinflamatorias. Los esfingolípidos en el cerebro regulan eventos intracelulares clave en la señalización por citocinas, produciendo eicosanoides pro-inflamatorios como prostaglandinas y leucotrienos. También modulan mecanismos celulares como la apoptosis, la activación astrogliar y la migración de células T. Los esfingolípidos son importantes en la regulación de la neuroinflamación, y cambios en su metabolismo en cerebro pueden causar la muerte de células neuronales, la activación de células gliales o la expresión excesiva de moléculas inflamatorias. Alteraciones en el metabolismo de los esfingolípidos cerebrales están asociadas con enfermedades neuroinflamatorias, incluidas las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson. Aunque cada vez hay más evidencias sobre el papel de los esfingolípidos y en particular de la S1P en la neuroinflamación, los mecanismos implicados siguen sin estar claros (Lee, Jin y Bae, 2020).

7.1. S1P, un esfingolípido de señalización

La S1P desempeña un papel destacado en la señalización celular como segundo mensajero intracelular o como ligando extracelular de sus 5 receptores, S1P1-S1P5. Las células del SNC, incluidas la microglía, las neuronas y los astrocitos, sintetizan S1P por fosforilación de esfingosina por la esfingosina quinasa (SphK1). Estas células también expresan altos niveles de receptores de S1P (S1PR). La investigación sobre el impacto del metabolismo y la señalización de S1P en la neuroinflamación se inició en células gliales (Lee, Jin y Bae, 2020).

La S1P tiene una base de esfingosina unida a un grupo fosfato en el carbono 1 (Figura 17). Realiza diversas funciones en el organismo siendo uno de los principales mensajeros en forma endocrina, paracrina y autocrina en los sistemas cardiovascular e inmunológico, regulando el crecimiento celular y la supervivencia, la migración celular, la angiogénesis, tumorigénesis, inflamación y diferenciación celular. En el sistema inmune variaciones de la concentración relativa de S1P y de sus receptores regulan el tráfico de linfocitos en circulación. La interacción de la S1P con su receptor S1PR1 induce la salida de linfocitos T y B desde los órganos linfoides hacia los vasos linfáticos (Maceyka *et al.*, 2012).

7.2. Modulación de vías de transducción de señales por S1P

La activación de la esfingosina quinasa (SphK) por diferentes agentes extracelulares o citocinas inflamatorias, como IL-1, TNF α y VEGF, aumenta los niveles de S1P, que regula procesos inflamatorios por distintas vías. Para ello la S1P puede actuar a través de dianas intracelulares o liberarse al medio extracelular a través de transportadores como el transportador dependiente de ATP (ABC). La S1P extracelular puede unirse a cinco receptores (S1P 1–5) (Gangoiti *et al.*, 2010).

S1P activa receptores acoplados a proteínas G, que transmiten diversas señales intracelulares dependiendo de las subunidades G α presentes en la proteína G heterotrimérica (Figura 18). Cada uno de los receptores activa distintas vías de señalización y respuestas celulares que, en algunos casos, son antagónicas. Los receptores S1P1–3 se expresan en diversos tejidos en ratones y humanos, mientras que S1P4 y S1P5 se limitan principalmente a células de origen hematopoyético (Obinata y Hla, 2019).

Cuatro de los cinco receptores de S1P se encuentran en el SNC: S1PR1, 2, 3 y 5, y se expresan en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía. El nivel de expresión de estos receptores puede variar en función de la edad y el ambiente que rodea la célula (Brinkmann, 2007).

Los receptores S1P (S1PR) tienen un gran potencial como dianas farmacológicas. FTY720 (Gilenya / Fingolimod), es un fármaco utilizado como tratamiento en esclerosis múltiple, es un análogo estructural de la esfingosina y se une a todos los subtipos de receptores S1P conocidos, excepto S1PR2 (Brinkmann, 2007). In-vivo, FTY720 es fosforilado por esfingosina quinasa (SphK) a su forma activa pFTY720 y es esta forma la que se une y modula S1PRs (Terada *et al.*, 2004).

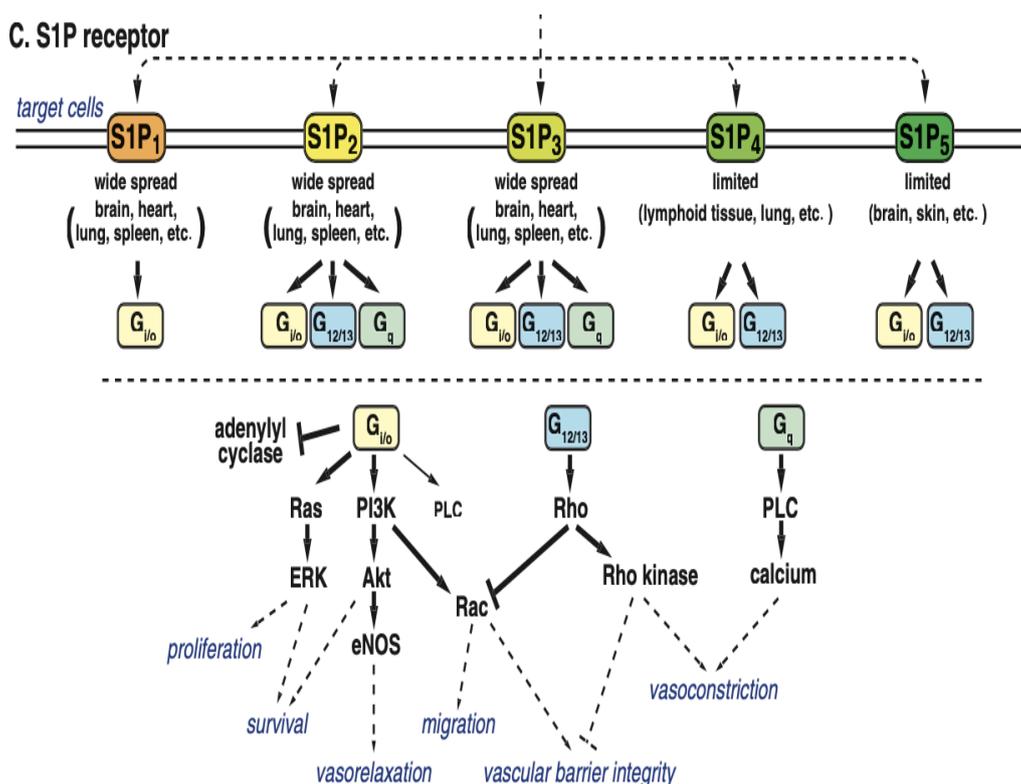


Figura 18. Vías de transducción de señales moduladas por S1P a través de sus receptores. La señalización a través de Gi/o produce: 1) la activación de Ras y ERK para promover la proliferación; 2) activación Pi3 quinasa y Akt para aumentar la supervivencia, prevenir la apoptosis e inducir vasodilatación; 3) activación de Pi3K y Rac para promover la migración y la integridad de la barrera endotelial; 4) activación de la proteína quinasa C (PKC) y fosfolipasa C (PLC) para aumentar el calcio libre intracelular que modula diversas respuestas celulares. 5) inhibición de la actividad de la adenilil ciclase (AC) para reducir el AMP cíclico. La señalización a través de Gq activa principalmente las vías de PLC, y la señalización a través de G12 / 13 puede promover la activación de la quinasa Rho e inhibir de RAC para inhibir la migración celular, reducir la integridad de la barrera vascular e inducir vasoconstricción (Obinata y Hla, 2019).

7.3. Papel de S1P en neuronas y en células gliales

En cultivos de neuronas, la señalización de S1P provoca cambios morfológicos relacionados con la formación, crecimiento y la extensión y retracción de neuritas (Ishii *et al.*, 2004). La activación de diferentes receptores de S1P puede tener funciones opuestas. Por ejemplo, la estimulación de neuronas con el factor de crecimiento nervioso (NGF) activa la SphK1, que fosforila la esfingosina a S1P que se libera al medio extracelular. La transactivación resultante de S1PR1 promueve la extensión de neuritas. Experimentos de sobreexpresión y la aplicación de sondas antisentido para regular negativamente los receptores S1PR1 han demostrado que éstos promueven la extensión de las neuritas, mientras que la activación de S1PR2 y 5 inhibe este proceso (Toman *et al.*, 2004). Las neuronas que carecen de S1PR2 presentan hiperexcitabilidad (MacLennan *et al.*, 2001). La actividad sináptica es otra función regulada en parte por S1P (Kono *et al.*, 2008).

La expresión de los receptores de S1P es muy dinámica en los diferentes estados de activación de la microglía. Por ejemplo, en la microglía activada, S1PR1 y 3 están disminuidos, pero S1PR2 está aumentado (Choi y Chun, 2013). La microglía puede expresar los receptores S1PR1, 2, 3 y 5. La modulación de S1PR1 puede controlar la activación microglial. Las funciones precisas de estos receptores en la activación microglial aún no se han esclarecido (Choi y Chun, 2013).

Los astrocitos expresan S1PR1 y 3 y bajos niveles de S1PR2 (Groves *et al.*, 2013). Estos dos receptores pueden modular la astrogliosis en diferentes modelos de enfermedades, incluidas la esclerosis múltiple y la enfermedad de Sandhoffs (Choi y Chun, 2013). Además, los S1PRs se expresan en las neuronas de Purkinje del cerebelo (Kempf *et al.*, 2014).

7.4. Papel de S1P en procesos patológicos

La S1P está implicada en la regulación de muchos procesos fisiológicos y participa en la fisiopatología de diversas enfermedades (Anelli *et al.*, 2010). La S1P parece jugar un papel en la patogénesis de la aterosclerosis. Se encuentra en altas concentraciones en la circulación, donde se une en gran proporción a la lipoproteína de alta densidad (HDL) y la albúmina. S1P tiene diversos efectos sobre distintos tipos de células claves en el desarrollo de la aterosclerosis, incluyendo la migración de monocitos, la proliferación de células musculares lisas, el tono vascular y la estimulación de la vía NF- κ B que conduce a la producción de citocinas pro-inflamatorias (Daum, Grabski y Reidy, 2009).

Ha habido un marcado aumento en la tasa de obesidad y enfermedades relacionadas con ella en gran parte debido a la dieta occidental. Una de estas enfermedades es la esteatohepatitis no-alcohólica (NASH). S1P juega un papel importante en la patogénesis de NASH. S1P promueve el reclutamiento al hígado de células madre mesenquimales de médula ósea (BMSC) a través de la activación de receptores S1PR. En el hígado, estas células se diferencian a células estrelladas hepáticas. Cuando las células estrelladas inactivas se activan debido a una lesión hepática, se diferencian a miofibroblastos que expresan la actina del músculo liso α y secretan colágeno I para formar la matriz extracelular fibrótica de una manera dependiente de S1P. Por tanto, la S1P también participa en el proceso de inducción de NASH y de fibrosis, que puede progresar a cirrosis (Rohrbach, Maceyka y Spiegel, 2017).

Por último, se ha observado que la activación del receptor **S1PR2** modula la expresión de CCL2 en neuronas y la neuroinflamación, objetivos de interés en esta tesis (Figura 19).

Estos datos sugieren que la activación de S1PR2 contribuiría a la inducción de neuroinflamación en situaciones de fallo hepático agudo, en un proceso mediado por el aumento de CCL2. También sugieren que el bloqueo del receptor S1PR2 con un antagonista podría tener efectos anti-inflamatorios por disminución de la neuroinflamación.

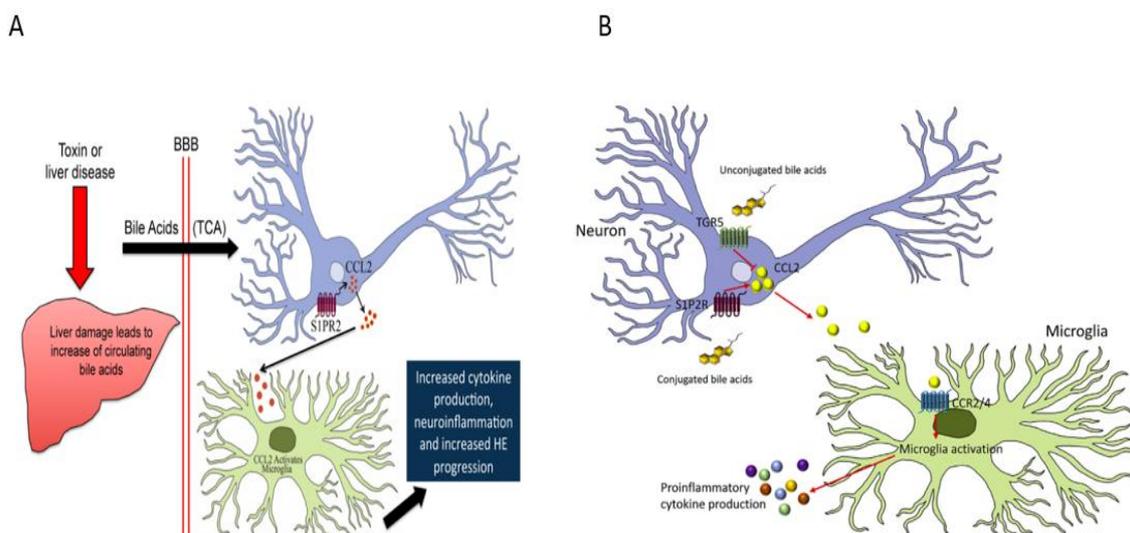


Figura 19. A) Modelo propuesto de inducción de neuroinflamación mediado por S1PR2 en fallo hepático agudo. La insuficiencia hepática aguda inducida por azoximetano interrumpe la circulación enterohepática y provoca la muerte de los hepatocitos, lo que conduce a un aumento de los ácidos biliares circulantes, incluido el ácido taurocólico (ATC). ATC cruza la barrera hematoencefálica y se une a S1PR2 en las neuronas. Esto conduce a una mayor expresión y secreción de CCL2 de las neuronas, que se une a los receptores en la microglía conduciendo a su activación, al aumento de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y a neuroinflamación (McMillin *et al.*, 2017). **B) Efecto de los ácidos biliares sobre la neuroinflamación.** Las acciones pro-inflamatorias y anti-inflamatorias de los ácidos biliares durante el fallo hepático agudo pueden atribuirse, en parte, a las acciones opuestas de la activación de S1PR2 por ácidos biliares conjugados y de TGR5 por ácidos biliares no conjugados sobre la expresión neuronal de CCL2, que aumenta cuando se activa S1PR2 y disminuye si se activa TGR5. El aumento de la expresión y liberación de CCL2 de las neuronas da como resultado la activación del receptor CCR2 o CCR4 en la microglía. Esto conduce a la activación de la microglía y la posterior liberación de citoquinas pro-inflamatorias contribuyendo a la neuroinflamación (Arikawa *et al.*, 2003).

El compuesto JTE-013 es un antagonista del S1PR2, utilizado para el estudio de sus funciones en diferentes tipos celulares. En un modelo de rata con cirrosis inducida por ligadura biliar, se activa la vía de señalización ERK1/2 y AKT en el hígado activando NF- κ B, que induce la expresión de varios genes inflamatorios. Tanto la proliferación celular como la inflamación son contribuyentes clave para promover la fibrosis en las condiciones de colestasis de este modelo. La inhibición de S1PR2 por JTE-013 inhibe la vía ERK1/2 y AKT atenuando la inflamación y la fibrosis hepática (González-Fernández *et al.*, 2017). JTE-013 también inhibe las reacciones alérgicas asmáticas al suprimir la activación de NF- κ B mediada por S1PR2 y la producción de CCL3 en el epitelio bronquial, y se ha propuesto que la administración intratraqueal de JTE-013 puede ser un remedio prometedor para el asma bronquial en un modelo de ratón (Terashita *et al.*, 2016).

En un modelo de ratón con isquemia cerebral por oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO), la activación de S1PR2 activa la vía ERK1/2 y JNK que sería importante para la activación y polarización M1 de la microglía en estos ratones. La administración oral de JTE-013 reduce la neuroinflamación reduciendo la activación de la microglía y

modificando su morfología ameboide a ramificada en el cerebro postisquémico (Sapkota *et al.*, 2019).

En esta tesis hemos evaluado si el bloqueo del S1PR2 con JTE-013 reduce la neuroinflamación en cerebelo de ratas hiperamonémicas y los mecanismos implicados.

8. GMPC EXTRACELULAR. PAPEL EN LAS ALTERACIONES INDUCIDAS EN CEREBELO POR LA HIPERAMONEMIA CRÓNICA Y EN ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA

Nuestro grupo ha propuesto que existe una interacción entre el GMPc extracelular, la neuroinflamación y la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica, que se modulan mutuamente, y conjuntamente modulan la función cognitiva y la coordinación motora. Las alteraciones en estas interacciones contribuyen a la inducción del deterioro cognitivo y motor en hiperamonemia crónica (Figura 20) (Agusti *et al.*, 2017; Cabrera-Pastor *et al.*, 2019a). En esta tesis hemos estudiado los mecanismos por los que el GMPc extracelular modula la neuroinflamación y la neurotransmisión en cerebelo de ratas hiperamonémicas sin fallo hepático.

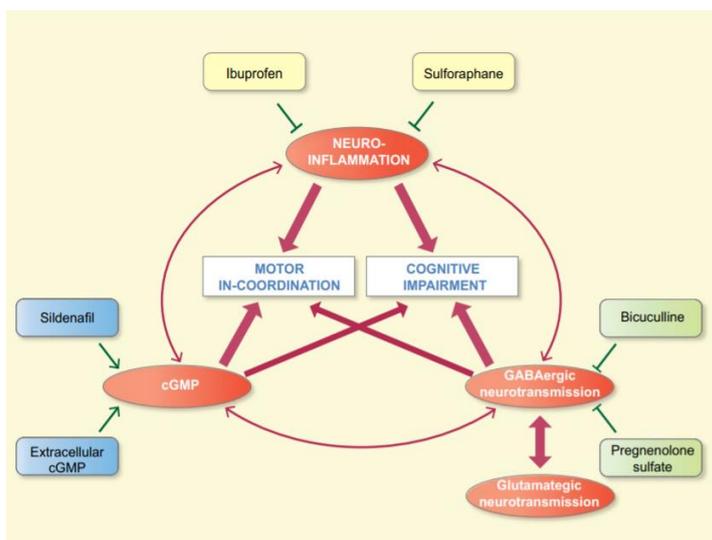


Figura 20. Interacción entre el GMPc extracelular, la neuroinflamación y la neurotransmisión GABAérgica en la inducción de la incoordinación motora y del deterioro cognitivo en la hiperamonemia y EHM (Cabrera-Pastor *et al.*, 2019a).

Se conoce desde hace tiempo el papel del GMPc como segundo mensajero en la transducción de señales intracelulares. El GMPc se sintetiza a partir del guanósil trifosfato (GTP) en una reacción catalizada por la guanilato ciclasa (GC). Hay dos tipos de GC (Ashman *et al.*, 1963): la GC particulada está asociada a la membrana y es un receptor para péptidos como el péptido atrial natriurético (ANP) cuya activación induce la síntesis de GMPc. La GC soluble se encuentra en el citoplasma y se activa por óxido nítrico (NO). Las fosfodiesterasas (PDE), son enzimas que degradan el GMPc (Domek-Lopacinska y Strosznajder, 2005).

Parte del GMPc sintetizado se libera al medio extracelular a través de transportadores de la familia de proteínas de resistencia a drogas (MRP) o ABCC (ATP-Binding Casette

transporters, family C) (Jedlitschky, Burchell y Keppler, 2000; Chen, Lee y Kruh, 2001; Guo *et al.*, 2003; Andric *et al.*, 2006). El papel fisiológico del GMPc extracelular no se conoce bien.

8.1. Funciones fisiológicas del GMPc extracelular

Cada vez hay más evidencias de que el GMPc extracelular, a concentraciones fisiológicas, desempeña una función importante en la modulación de la actividad cerebral especialmente en el cerebelo. La exportación del GMPc no se produce únicamente para controlar la concentración intracelular, sino que el GMPc extracelular juega un papel fisiológico en diferentes órganos.

En el intestino actúa como molécula de señalización extracelular. El GMPc extracelular, que no atraviesa las membranas celulares, regula *in vivo* la motilidad del intestino en los mamíferos, que presentan sitios de unión de GMPc extracelular en el intestino (Kroening *et al.*, 2003). En riñón, el GMPc extracelular inhibe la reabsorción de sodio en el túbulo proximal e induce natriuresis, regulando la presión sanguínea (Jin, Siragy y Carey, 2001; Jin *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2007).

En cultivos de neuronas granulares de cerebelo, el aumento de los niveles de GMPc intracelular induce efectos neurotóxicos, mientras que el aumento del GMPc extracelular induce efectos neuroprotectores (Montoliu *et al.*, 1999).

Para modular vías de transducción y efectos en el interior de las células, el GMPc extracelular tiene que modular la función de alguna proteína de la membrana celular que transmita la información al interior de las células. Se han propuesto algunas dianas para el GMPc extracelular.

Bukanova *et al.* (2014) demostraron que el GMPc extracelular, a concentraciones fisiológicas (nM), modula el receptor de glicina reduciendo su activación. Mostraron que en neuronas piramidales del hipocampo el GMPc extracelular acelera la vuelta del potencial postsináptico a un nivel basal acelerando la desensibilización del receptor de glicina. Se ha visto que el GMPc extracelular inhibe los receptores de kainato, especialmente en neuronas de Purkinje mediante cultivos de neuronas de cerebelo. Los autores sugieren que el aumento de los niveles extracelulares de GMPc podría ejercer un efecto inhibitorio de las aferencias glutamatérgicas que llegan a las neuronas de Purkinje. Este mecanismo podría modular el proceso de depresión a largo plazo (LTD) en cerebelo (Poulopoulou *et al.*, 1998). Otra posible diana del GMPc extracelular en cultivos es el antiporter de sodio/protones en astrocitos, el cual es inhibido por el GMPc produciendo acidificación del medio intracelular. El pH modula varias funciones internas de los astrocitos, como la comunicación neuronal y la neuroinflamación (Touyz *et al.*, 1997).

La concentración de GMPc extracelular analizada por microdiálisis cerebral está disminuida en cerebelo de ratas hiperamonémicas *in vivo* (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016 b). En cerebro de modelos animales de hiperamonemia y EHM el aumento de GMPc extracelular reduce la neuroinflamación y modula la neurotransmisión y la función cognitiva y motora (Cabrera-Pastor *et al.*, 2019a). En el cerebelo, el GMPc extracelular

modula de forma bifásica el aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y, modulando los receptores de glicina y la vía Glutamato-NO-GMPc (Cabrera *et al.*, 2016a), cuya función está disminuida en cerebelo de ratas con hiperamonemia crónica (Hermenegildo *et al.*, 1998).

8.2. Vía de señalización Glutamato-Óxido nítrico- GMPc en el cerebelo

Los receptores NMDA son críticos para la rápida regulación de la plasticidad sináptica y del aprendizaje y la memoria. Una vía que media la modulación del aprendizaje por los receptores NMDA es la vía glutamato-NO-GMPc. La activación de los receptores NMDA aumenta el calcio intracelular, que se une a la calmodulina y activa la óxido nítrico sintetasa neuronal (NOS). Esto aumenta el NO, lo que activa la guanilato ciclasa soluble, aumentando el GMPc. Parte de este GMPc se libera al fluido extracelular a través de transportadores dependientes de ATP.

La función de esta vía disminuye en el cerebelo en hiperamonemia crónica lo que disminuye la capacidad de aprendizaje de una tarea de discriminación condicionada en el laberinto en Y (Hermenegildo *et al.*, 1998; Monfort *et al.*, 2001; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a). Además, la capacidad de aprender esta tarea, se recupera al restaurar la función de la vía con inhibidores de la degradación de GMPc o anti-inflamatorios (Erceg *et al.*, 2005a y b; Cauli *et al.*, 2007), lo cual refuerza la hipótesis del papel del GMPc extracelular en la modulación de este tipo de aprendizaje. Erceg *et al.* (2005a y b) administraron a ratas hiperamonémicas GMPc intracerebralmente mediante mini-bombas osmóticas. El GMPc no atraviesa la membrana celular por lo que sus efectos se producen extracelularmente. Observaron que el GMPc restaura la capacidad de aprendizaje en ratas hiperamonémicas. No obstante, un aumento excesivo del GMPc extracelular deteriora el aprendizaje y debe estar en un rango de concentración óptimo (Erceg *et al.*, 2005a y b; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a).

Por lo tanto, el uso farmacológico de agentes que modulen los niveles de GMPc extracelular en cerebelo podría ser eficaz en el tratamiento de los déficits cognitivos presentes en pacientes con encefalopatía hepática (Erceg *et al.*, 2005a y b). Los mecanismos por los que el aumento de GMPc extracelular normaliza la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y se siguen estudiando.

8.3. Modulación de la neurotransmisión por GMPc extracelular en cerebelo

El GMPc también juega un papel esencial en la modulación de la neurotransmisión en cerebelo y de las funciones cognitivas y motoras asociadas. Cabrera-Pastor *et al.* (2016a) investigaron los mecanismos por los que el GMPc extracelular modula la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y. En condiciones fisiológicas, el GMPc extracelular reduce la activación de los receptores de glicina, dando lugar a un aumento leve del calcio intracelular en las neuronas de Purkinje, que modula la fosforilación de CaMKII de una manera bifásica. En hiperamonemia, los niveles de GMPc extracelular y las concentraciones basales de calcio se encuentran reducidos, y al aumentar el GMPc

INTRODUCCIÓN

extracelular se reduce la fosforilación de la CaMKII y aumenta la actividad de la NOS, dando lugar a una mayor producción de NO, que aumenta la activación de guanilato ciclasa y la formación de GMPc. El GMPc es exportado al exterior de la célula. El aumento de la funcionalidad de la vía y de los niveles de GMPc extracelular se asocia a una mejoría en la capacidad de aprendizaje de las ratas con hiperamonemia. Sin embargo, el aumento del GMPc extracelular en ratas control, donde los niveles basales se encuentran dentro del rango óptimo, produjo un efecto opuesto, reduciendo el aprendizaje (Cabrera-Pastor, 2016a).

Los niveles de GMPc extracelular en el cerebelo cambian con la edad y en condiciones patológicas. Se reduce con el envejecimiento y es mucho menor en las ratas de 7 meses que en las de 3 meses. El GMPc extracelular también se reduce en cerebelo de ratas con hiperamonemia crónica o encefalopatía hepática. Los cambios en la concentración del GMPc extracelular asociados al envejecimiento o situaciones patológicas podrían alterar la neurotransmisión y la función cognitiva (Cabrera-Pastor *et al.*, 2017).

Los tratamientos que aumentan el GMPc en cerebelo restablecen el aprendizaje en el laberinto en Y en ratas con hiperamonemia o encefalopatía hepática. Esto se puede lograr administrando inhibidores de la fosfodiesterasa-5 como zaprinast o sildenafil, anti-inflamatorios como ibuprofeno o inhibidores de MAPK p38 o compuestos que reducen la activación de los receptores GABA_A como la bicuculina, el sulfato de pregnenolona o GR3027 (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a).

El GMPc también modula la neurotransmisión en cerebelo modulando la concentración extracelular de neurotransmisores clave como el glutamato y el GABA. Uno de los mecanismos por los que el GMPc extracelular los regula es modulando la expresión en membrana de sus transportadores.

Las ratas con hiperamonemia crónica muestran niveles aumentados de glutamato, glutamina y GABA extracelular en el cerebelo in vivo (Cabrera-Pastor *et al.*, 2019b), así como:

- a) aumento de la expresión de la membrana del transportador astrocítico de glutamina SNAT3 y reducción de la expresión de la membrana del transportador neuronal SNAT1
- b) una disminución de la expresión en membrana del transportador neuronal GABA GAT1 y un aumento del transportador astrocítico GAT3
- c) disminución de la expresión en membrana de los transportadores de glutamato astrocíticos GLAST y GLT-1 y del transportador neuronal EAAC1.

El aumento de GMPc extracelular normaliza la expresión en membrana de todos estos transportadores. Estos datos sugieren que, en situaciones patológicas como la hiperamonemia, encefalopatía hepática o enfermedad de Alzheimer, los niveles reducidos de GMPc extracelular contribuyen a alteraciones en la expresión en membrana de los transportadores de glutamina, glutamato y GABA, lo que conduce a una alteración de los niveles extracelulares de glutamina, glutamato y GABA y de la neurotransmisión

glutamatérgica y GABAérgica lo que conduce a alteraciones cognitivas y motoras (Cabrera-Pastor *et al.*, 2019b).

El conjunto de resultados obtenidos en cerebelo, sugieren que el receptor de glicina podría estar mediando los efectos del GMPc extracelular sobre la neuroinflamación y la neurotransmisión en nuestros modelos.

8.4. Modulación de la neuroinflamación por GMPc extracelular

El GMPc extracelular modula la neuroinflamación. Lo hace al menos en parte a través de efectos sobre la microglía y los astrocitos y sobre las neuronas de Purkinje.

La administración crónica de GMPc intracerebral mediante mini-bombas osmóticas normaliza algunas de las alteraciones en el hipocampo de ratas con hiperamonemia crónica. La hiperamonemia crónica induce neuroinflamación en el hipocampo, con activación de astrocitos y aumento de IL-1 β , que se relaciona con un aumento de la expresión en membrana de los receptores NMDA y deterioro de la memoria de trabajo. Este proceso no se ve afectado por GMPc extracelular. Sin embargo, la hiperamonemia también activa la microglía y aumenta el TNF α , altera la expresión en la membrana de las subunidades del receptor AMPA (aumento de GluA1 y reducción de GluA2) y deteriora la memoria de referencia. Este proceso sí se revierte por GMPc extracelular in vivo. Estos resultados muestran que el GMPc extracelular modula la memoria de referencia espacial pero no la memoria de trabajo (Cabrera-Pastor *et al.*, 2017 y 2018b).

Taoro-Gonzalez *et al.* (2018 y 2019) demostraron *ex vivo* que el GMPc extracelular normaliza la fosforilación y la expresión en membrana de GluA1 y GluA2 disminuyendo la activación de la microglía y los niveles de IL-1 β en el hipocampo de ratas hiperamonémicas.

En cerebelo, la administración crónica de GMPc intracerebral mediante mini-bombas osmóticas en ratas con hiperamonemia crónica también reduce la neuroinflamación, normalizando los siguientes parámetros: activación de microglía y astrocitos, expresión en membrana de TNFR1 y del transportador de GABA GAT-3, activación de NF- κ B, expresión de glutaminasa y niveles de glutamato y de GABA extracelular. Estos cambios se tradujeron en una mejor coordinación motora (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

Los mecanismos celulares y moleculares por los que el GMPc extracelular disminuye la neuroinflamación en hiperamonemia y EHM no se conocen en detalle. El GMPc extracelular modula la neuroinflamación y neurotransmisión por mecanismos distintos a los del GMPc intracelular, posiblemente actuando sobre diferentes tipos celulares, implicando diferentes vías de transducción de señales y mecanismos de transcripción. Sin embargo, los mecanismos subyacentes siguen siendo en gran medida desconocidos (Cabrera-Pastor *et al.*, 2017). En esta tesis estudiamos los mecanismos por los que el GMPc extracelular reduce la neuroinflamación en cerebelo y el posible papel de los receptores de glicina en este proceso.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La encefalopatía hepática es un síndrome neuropsiquiátrico complejo presente en pacientes con enfermedad hepática. El fallo hepático produce **hiperamonemia e inflamación periférica** que conducen a **neuroinflamación** con activación de células gliales y aumento de los niveles de citocinas pro-inflamatorias como el TNF α . La neuroinflamación a su vez altera la neurotransmisión, conduciendo al deterioro cognitivo y motor.

Las ratas con hiperamonemia crónica reproducen los déficits cognitivos y motores que presentan los pacientes con encefalopatía hepática. Tanto en pacientes como en modelos animales, el cerebelo parece ser la primera área del cerebro afectada en las primeras etapas de las enfermedades hepáticas crónicas.

Se sabe que en hiperamonemia está disminuida la concentración de GMP cíclico extracelular en cerebelo y que el aumento del GMPc extracelular reduce la neuroinflamación y restaura la función cognitiva en ratas con hiperamonemia crónica, pero no se conocen los mecanismos por los que el GMPc induce estos efectos beneficiosos. Un objetivo de esta tesis es avanzar en el conocimiento de estos mecanismos.

Los mecanismos por los que la hiperamonemia crónica induce neuroinflamación y por los que la neuroinflamación altera la neurotransmisión no se conocen en detalle. El objetivo principal de esta tesis consiste en identificar mecanismos moleculares y vías de transducción de señales por los que la hiperamonemia crónica induce neuroinflamación y como esta altera la neurotransmisión en cerebelo de ratas hiperamonémicas sin fallo hepático.

En base a estos datos y a los antecedentes descritos en la *Introducción*, planteamos las siguientes **hipótesis**:

1. En hiperamonemia crónica, el aumento de la activación de los receptores de glicina en cerebelo contribuye a la activación de microglía y astrocitos y a la inducción de neuroinflamación y de alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica.
2. Uno de los mecanismos por los que la alteración de la neurotransmisión glicinérgica en hiperamonemia induce neuroinflamación y alteraciones en la neurotransmisión en cerebelo sería modulando la vía ADAM17-TNFR1-NF- κ B.
3. El GMPc extracelular reduce la activación del receptor de glicina. Su disminución en cerebelo de ratas hiperamonémicas contribuiría a aumentar la neurotransmisión glicinérgica.
4. El tratamiento con GMPc extracelular para normalizar sus niveles o con estriquina (antagonista del receptor de glicina) normalizaría la neurotransmisión glicinérgica en cerebelo de ratas hiperamonémicas, conduciendo a una disminución de la neuroinflamación y a la normalización de la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5. La inflamación periférica inducida por la hiperamonemia sería la desencadenante de la inducción de la neuroinflamación y de las alteraciones en neurotransmisión en cerebelo y de la incoordinación motora.
6. La disminución de la inflamación periférica por tratamiento con anti-TNF α (infiximab) debería prevenir la inducción de neuroinflamación en cerebelo y de la incoordinación motora en ratas con hiperamonemia crónica.
7. El aumento de TNF α en el cerebelo sería un efecto temprano que contribuiría a desencadenar la neuroinflamación. La inducción de TNF α podría ocurrir en distintos tipos celulares y evolucionar con el tiempo de hiperamonemia.
8. En hiperamonemia aumentaría la activación de S1PR2, conduciendo a un aumento de CCL2, que activaría CCR2 lo que contribuiría a la activación de la microglía y a la inducción de neuroinflamación.
9. La activación de CCR2 también aumentaría los niveles de BDNF en la microglía activada. El aumento de BDNF podría contribuir a la alteración de la neurotransmisión inhibitoria a través de la modulación de TrkB y KCC2.
10. La neuroinflamación y las alteraciones en la neurotransmisión en cerebelo de ratas hiperamonémicas podrían revertirse inhibiendo la activación excesiva de la vía S1PR2-CCL2-CCR2-BDNF-TrkB-KCC2. Esto podría conseguirse utilizando antagonistas de S1PR2, CCR2 o TrkB.

En base a estas hipótesis planteamos los siguientes *objetivos*:

El **OBJETIVO PRINCIPAL** de esta tesis es:

Identificar mecanismos moleculares y vías de transducción de señales por los que la hiperamonemia crónica induce neuroinflamación y como esta altera la neurotransmisión en cerebelo de ratas hiperamonémicas sin fallo hepático.

Para avanzar en este objetivo principal, se abordan los siguientes

Los **OBJETIVOS CONCRETOS** de esta tesis son:

1. Analizar si en hiperamonemia crónica el aumento de la activación de los receptores de glicina en cerebelo contribuye a la activación de microglía y astrocitos y a la inducción de neuroinflamación y de alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica. Analizar si el bloqueo del receptor de glicina con el antagonista estricnina revierte la neuroinflamación y las alteraciones en neurotransmisión.
2. Identificar mecanismos por los que la alteración de la neurotransmisión glicinérgica induce neuroinflamación y alteraciones en la neurotransmisión en cerebelo de ratas hiperamonémicas. Analizar el papel de la vía ADAM17-TNFR1-NF- κ B-glutaminasa-glutamato-GABA.

3. Comprobar si el GMP cíclico extracelular podría estar mejorando la neuroinflamación y la neurotransmisión en cerebelo de ratas hiperamonémicas reduciendo la activación del receptor de glicina. Comprobar si la estricnina induce los mismos efectos sobre neuroinflamación y neurotransmisión que el GMPc extracelular y si lo hace por los mismos mecanismos.
4. Averiguar si la inflamación periférica es responsable de la inducción de neuroinflamación y del aumento de TNF α en cerebelo de ratas hiperamonémicas: Analizar si el tratamiento con anti-TNF α (infiximab) para reducir la inflamación periférica previene la inducción de neuroinflamación y de TNF α en cerebelo de ratas hiperamonémicas.
5. Analizar el/(los) tipo(s) celular(es) en los que el TNF α aumenta en el cerebelo de las ratas hiperamonémicas a distintos tiempos de hiperamonemia, así como el curso temporal de la inducción de TNF α en neuronas de Purkinje y células gliales. Analizar si el TNF α también se induce en neuronas de Purkinje de pacientes fallecidos con cirrosis hepática.
6. Identificar mecanismos por los cuales la hiperamonemia sostenida induce TNF α en las neuronas de Purkinje. Analizar si la inducción de TNF α por la hiperamonemia está mediada por la vía TNFR1-NF- κ B y si el bloqueo de la vía de TNFR1 con R7050 revierte la neuroinflamación y el aumento de TNF α .
7. Estudiar si en hiperamonemia crónica aumenta la activación de S1PR2 y si esto contribuye a la activación de la microglía y a la inducción de neuroinflamación y de alteraciones en la neurotransmisión y coordinación motora en cerebelo de ratas hiperamonémicas. Analizar si el bloqueo de S1PR2 ex vivo con el antagonista JTE-013 reduce la neuroinflamación y restaura la neurotransmisión en cerebelo de ratas hiperamonémicas. Evaluar si el bloqueo del S1PR2 in vivo reduce la neuroinflamación y restaura la coordinación motora en ratas hiperamonémicas.
8. Analizar si los efectos del aumento de activación de S1PR2 sobre la neuroinflamación y la neurotransmisión están mediados por aumento de CCL2 y de la activación de su receptor CCR2. Analizar si el bloqueo de CCR2 con el antagonista RS504393 reduce la neuroinflamación y restaura la neurotransmisión en cerebelo de ratas hiperamonémicas.
9. Analizar si los efectos del aumento de activación de CCR2 sobre la neuroinflamación y la neurotransmisión están mediados por un aumento de BDNF y de la activación de su receptor TrkB. Analizar si el bloqueo de TrkB con el antagonista ANA-12 reduce la neuroinflamación y restaura la neurotransmisión en cerebelo de ratas hiperamonémicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MODELO ANIMAL DE HIPERAMONEMIA CRÓNICA SIN FALLO HEPÁTICO

En esta tesis se han utilizado ratas macho (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar (Charles River Laboratories, España) con hiperamonemia crónica inducida según el modelo desarrollado en nuestro laboratorio (Felipo, Miñana y Grisolia, 1988). Las ratas se alimentaron con una dieta rica en amonio (25% de acetato amónico) y las ratas control se alimentaron con comida convencional. Las ratas hiperamonémicas tienen un incremento en los niveles de amonio del 35, 41 y 70% en hígado, cerebro y músculo respectivamente en comparación a las ratas control; mientras que en sangre la concentración se duplica. Además, existe un aumento en la excreción de amonio. Los niveles de urea en sangre y su eliminación son alrededor del doble de los valores correspondientes a las ratas control (Azorín *et al.*, 1989). Las condiciones de estabulación fueron las siguientes: ciclos de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, $23 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, humedad del $55 \pm 5\%$ y comida y agua ad libitum. Todos los experimentos y procedimientos fueron aprobados por el Comité de Experimentación y Bienestar Animal (CEBA) del centro y por la Generalitat Valenciana y se llevaron a cabo de acuerdo con lo recogido en la Directiva 2010/63/UE de la Comisión Europea relativa al cuidado y manejo de animales de experimentación.

1.1. Tratamiento con infliximab

En algunos experimentos *in vivo* se analizó si la inflamación periférica es responsable de la inducción de neuroinflamación y de alteraciones en la neurotransmisión en cerebelo de ratas hiperamonémicas. Para ello algunas de las ratas se trataron con anti-TNF α (infliximab) para prevenir o reducir la aparición de inflamación periférica.

Las ratas se distribuyeron de manera aleatoria en cuatro grupos: control, control+infliximab, HA (hiperamonémica) e HA+infliximab. El Infliximab (Remicade; Merck Sharp & Dohme, Spain) es un anticuerpo anti-TNF α que no cruza la barrera hematoencefálica, se une al TNF α periférico y reduce la inflamación periférica en ratas con EHM o hiperamonemia (Dadsetan *et al.*, 2016a). Se diluyó en suero salino (cloruro de sodio al 0,9%) y se administró por medio de una inyección intravenosa (5 mg/kg) en la vena de la cola como en Karson *et al.* (2013). Dos días antes del comienzo de la dieta que contiene amonio, se hizo la primera inyección de infliximab y éstas se repitieron semanalmente durante 4 semanas. Las ratas controles fueron inyectadas por vía intravenosa con solución salina.

2. MUESTRAS HUMANAS POST MORTEM

Se obtuvieron cortes de cerebelo en parafina fijados con formalina (5 µm de grosor) de 4 pacientes que fallecieron con cirrosis hepática y 3 controles (sujetos sin enfermedades hepáticas o neurodegenerativas) del Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses (Valencia), Biobanco del Hospital Universitario Fundación Alcorcón y Biobanco de A Coruña para estudiar la expresión de TNF α en las neuronas de Purkinje. Para cada caso, se obtuvo la autorización apropiada para recibir y utilizar el tejido para la investigación. Las características de los sujetos, la causa de la muerte y el intervalo post mortem se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características y origen de las muestras humanas. IML Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses (Valencia), FHU Hospital Universitario Fundación Alcorcón y Biobanco de A Coruña.

Paciente	Grado	Sexo	Años	Causa de la muerte	Retraso post mortem	Biobanco
Paciente 20	Control	Masculino	62	Isquemia mesentérica	14	FHU
Paciente 21	Control	Masculino	72	Información no disponible	18	FHU
Paciente 22	Control	Masculino	60	Broncoaspiración	Información no disponible	FHU
Paciente 4	Cirrosis	Masculino	53	Hemorragia gastrointestinal	12-24	IML
Paciente 8	Cirrosis	Masculino	69	Hemorragia gastrointestinal	17	IML
Paciente 15A51	Cirrosis	Información no disponible	Información no disponible	Sepsis intraabdominal	Información no disponible	Biobanco de A Coruña
Paciente 13A37	Cirrosis	Masculino	54	Coma metabólico	Información no disponible	Biobanco de A Coruña

3. EXPERIMENTOS EX VIVO EN CORTES FRESCOS DE CEREBELO

Buena parte de los resultados presentados en esta tesis se han logrado mediante la realización de experimentos *ex vivo* con cortes frescos de cerebelo, técnica usada ampliamente en nuestro laboratorio. Se trata de un modelo que al mantener los cortes de cerebelo vivos se mantienen en funcionamiento los circuitos completos e interacciones entre los diferentes tipos y poblaciones celulares dentro del cerebro vivo por lo que se aproxima más a la realidad *in vivo* que los cultivos celulares aun teniendo las limitaciones que implica no trabajar con el animal vivo. Además, el corte del tejido en rodajas permite

observar el efecto que tienen los diferentes tratamientos sobre diferentes cortes del mismo animal y con ello menor uso de animales que *in vivo* consiguiendo una menor variabilidad interindividual. En esta tesis, ha sido la técnica de elección para estudiar mecanismos celulares y moleculares, así como las vías de señalización intracelulares implicadas en la neuroinflamación y en las alteraciones en neurotransmisión en cerebelo de ratas hiperamonémicas. Para analizar las vías implicadas los cortes frescos de cerebelo de ratas control e hiperamonémicas se incuban con o sin antagonistas de S1PR2, CCR2, TrkB, del receptor de glicina, inhibidores de la PKC o TNFR1 o con GMPc para evaluar si están alterados en nuestro modelo. Tras la incubación se realizan diferentes tipos de análisis con las muestras para analizar la expresión en membrana, el contenido total y la fosforilación de diferentes proteínas por western blot o la activación de microglía y astrocitos, neuroinflamación y contenido y localización celular y subcelular de diferentes proteínas por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

En este tipo de experimentos las ratas control e hiperamonémicas tras 4-5 semanas de dieta, se decapitaron, se extrajo el cerebro y se diseccionó el cerebelo con rapidez en una placa Petri en hielo para evitar la muerte del tejido. El cerebelo se sumergió en tampón Krebs que simula el líquido cefalorraquídeo (NaCl 119 mM, NaHCO₃ 26.2 mM, glucosa 11 mM, KCl 2.5 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KH₂PO₄ 1 mM), en hielo y burbujeadado con carbógeno (O₂ 95% y CO₂ 5%) para conservar el tejido oxigenado y reducir la necrosis. A continuación, el cerebelo se corta de manera transversal en rodajas de 400 µm de grosor en un Vibratomo (LEICA Biosystems, VT1000 S).

Los cortes frescos de cerebelo obtenidos se pusieron en los pocillos del sistema de perfusión (*Campden Instruments, Modelo 745*) (Figura 21) y se colocaron entre 4-6 cortes por cada pocillo, que contienen la solución Krebs burbujeadada continuamente con carbógeno y la temperatura se mantiene constante a 35°C. Los cortes se incuban durante 20 min en la solución Krebs para estabilizar el metabolismo celular y así recuperar el funcionamiento normal. A continuación, se perfunden 30 min a un flujo de 1 mL/min con solución Krebs (cortes control) o con el tratamiento seleccionado según los mecanismos moleculares que se quisieran analizar.



Figura 21. Sistema de perfusión. Los cortes frescos de cerebelo se colocan en unos pocillos que están conectados a una bomba de perfusión que va perfundiendo tampón Krebs con el tratamiento correspondiente y a un sistema de vacío que elimina el exceso de líquido para asegurar su regeneración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos utilizados para los diferentes tratamientos utilizados en esta tesis, estaban disueltos en la solución de perfusión Krebs y fueron los siguientes: el antagonista del receptor de CCR2 (50 μ M **RS504393**, TOCRIS BioSciences), antagonista de S1PR2 (20 μ M **JTE-013**, TOCRIS BioSciences), antagonista de TrkB (50 μ M **ANA 12**, TOCRIS BioSciences), inhibidor del complejo TNFR1-TRADD/RIP1/TRAF2 (20 μ M **R7050**, SIGMA ALDRICH), el inhibidor de la PKC (1 μ M **Bisindolylmaleimide II**, TOCRIS), GMPc (40 nM, Sigma cat# G6129, Darmstadt, Germany) o antagonista del receptor de glicina (75 μ M **Estricnina**, SIGMA ALDRICH).

Después de este tiempo con el tratamiento adecuado, los cortes se quitaron del incubador y se procesaron para su posterior análisis mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia o western blot.

Los cortes ex vivo procesados para realizar análisis por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia se sumergieron en paraformaldehído (PFA) al 4% en suero salino pH=7.4 durante 24 h. Después, se cambió el PFA por tampón fosfato (PB) 0.1 M con azida sódica (0.01%, Sigma) para evitar el crecimiento de hongos. Los cortes para western blot se sometieron a un procesamiento distinto dependiendo de las proteínas que se querían analizar, como se describe en el siguiente apartado.

4. ANÁLISIS DEL CONTENIDO Y FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS Y DE LA EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE TRANSPORTADORES Y RECEPTORES POR WESTERN BLOT

Algunos cortes de los experimentos ex vivo se seleccionaron al azar para analizar el estado de **fosforilación** de ciertos residuos de determinadas proteínas o bien el **contenido** de determinadas proteínas en el cerebelo. Estos cortes, después del tratamiento en el incubador, se pusieron en tubos que contienen 200 μ l de **tampón de fosforilación** (SDS 1%, EGTA 1 mM, Tris-HCl 66mM pH 7.4, glicerol 10%, leupeptina 0.2 mg/ml, NaF 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM) en hielo y se homogeneizaron por sonicación alrededor de 20 segundos. Para conocer la concentración de proteína (alícuota de 3 μ l de cada muestra) se utiliza el método colorimétrico del ácido bicinónico (BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific). Se cuantifica la cantidad de proteína de cada muestra por duplicado. En una placa se prepara una curva patrón de BSA (Albúmina de suero bovino) de concentraciones conocidas y los reactivos A y B, y se incuba la placa a 37°C durante 30 minutos o a temperatura ambiente 1 hora. Por último, se mide la absorbancia de la placa a 570 nm. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis.

En las muestras que se va a analizar la fosforilación de proteínas se procura realizarlo al día siguiente para conservar el grado de fosforilación de las proteínas. El grado de fosforilación de determinados residuos de algunas proteínas se analiza por western blot utilizando anticuerpos que reconocen específicamente los residuos fosforilados. Los anticuerpos utilizados se indican en la tabla 2.

Otros cortes se usaron para el análisis de la **expresión en membrana** de células del cerebelo. En este caso, los cortes se pusieron con *bis-sulfosuccinimidyl-suberate* (BS₃) (Pierce), un *cross-linker* que no atraviesa la membrana celular y se une en los dominios extracelulares de las proteínas a los residuos de lisina creando agregados. Tras su tratamiento en el incubador, se colocan en tubos con 200 µl de Krebs para las muestras (-) sin BS₃, o con 200 µl de BS₃ (2 mM) disuelto en Krebs para las muestras (+), en agitación durante 30 min a 4°C. Añadiendo 200 µl de glicina (100 mM) disuelta en Krebs a todos los tubos durante 10 min se consigue parar la reacción del *cross-linking* ya que neutraliza el BS₃ que haya quedado libre y evita que se una a proteínas intracelulares cuando se sonique las muestras en 200 µl de tampón de fosforilación durante 20 seg.

Los protocolos del western blot de las muestras preparadas para el análisis de contenido total, fosforilación y de expresión en membrana de proteínas, son iguales excepto las cantidades de los reactivos y los tiempos. Sin embargo, las muestras de expresión en membrana siempre se preparan por duplicado (con y sin BS₃, es decir, las muestras - y + indicadas anteriormente), y se cargan en geles más grandes para analizar más muestras a diferencia de los geles para contenido total o fosforilación que son más pequeños.

Las proteínas de las muestras se separaron acorde a sus pesos moleculares a través de la electroforesis en gel de poliacrilamida. En los geles pequeños para analizar el contenido total y la fosforilación de proteínas se cargaron entre 20-30 µg de proteína mientras que en los geles grandes para analizar la expresión en membrana se cargaron entre 100 y 150 µg. Las muestras se diluyeron en tampón de carga 2X (glicerol 21%, SDS 4%, Tris-HCl 65% al 0.5M pH=6.8, 2-Mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.02%) y se hirvieron a 100°C en un termoblock durante 5 minutos. A continuación, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida. Estos geles tienen dos zonas diferenciadas por su concentración de acrilamida: *Stacking* o parte superior o (25% Tris 0.5 M + 0.4% SDS con pH=6.8, 13% mezcla Acrilamida/Brisacrilamida (Panreac), 1% APS (Merck-Millipore) y 0.2% TEMED (Sigma)), tiene la función de concentrar la muestra antes de que se separen las proteínas y la parte inferior o *separating* (25% Tris 1.5M + 0.4% SDS con pH=6.8, 20% mezcla Acrilamida/Brisacrilamida, 0.33% APS y 0.07% TEMED), consigue separar las proteínas en función de la masa molecular. La cantidad de acrilamida usada en el separating, determina el diámetro de poro del gel y se ajustó en cada caso acorde a la masa molecular de las proteínas analizadas.

La intensidad de corriente en la electroforesis fue de 25 mA por cada gel pequeño durante 1.5 h y de 10 mA por cada gel grande durante toda la noche (15-20 h) poniendo tampón running a los geles (25 mM Tris Base, 0.2 M Glicina, 3.5 mM SDS).

Una vez separadas las proteínas, se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) previamente hidratada en metanol. La transferencia se hizo con una corriente de 250 mA durante 2 h para los geles pequeños y 240 mA durante 5 h para los geles grandes en tampón de transferencia (25 mM Tris Base, 0.19 M Glicina, metanol al 20%). A continuación, las membranas pequeñas se bloquearon con BSA al 5% en TBS-Tween (NaCl 150 mM, Tris Base 50 mM, 0.1%, Tween-20 pH 7.5) y las grandes con

MATERIALES Y MÉTODOS

leche al 5% en TBS-Tween durante aproximadamente 45 minutos con el objetivo de bloquear uniones inespecíficas. Después del bloqueo, las membranas de los geles grandes se lavaron tres veces durante 10 min con TBS-Tween.

Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario específico para la proteína a analizar. Los anticuerpos primarios utilizados y sus diluciones se indican en las Tablas 2 y 3. El anticuerpo primario se diluyó en BSA al 5% en TBS-Tween y la incubación se realiza durante toda la noche a 4°C en agitación suave.

Tabla 2. Proteínas cuyo contenido o fosforilación se analiza en cerebelo por western blot.

Anticuerpo primario	Casa comercial/Referencia	Concentración	Anticuerpo secundario
TNF α	R&D systems AF-510-NA	1/1000	Rabbit
CCL2	PROTEINTECH 66272-1-Ig	1/1000	Mouse
IL1 β	R&D systems AF-501-NA	1/500	Rabbit
ADAM17	ABCAM AB2051	1/250	Rabbit
ERK	STA CRUZ SC-93	1/1000	Rabbit
MAPK P38	CELL SIGNALING 9212	1/1000	Rabbit
BDNF	INVITROGEN OSB00017W	1/1000	Rabbit
HMGB1	ABCAM AB18256	1/1000	Rabbit
pADAM17-THR735	ABCAM AB182630	1/2000	Rabbit
pERK-TYR204	STA CRUZ SC-7383	1/1000	Rabbit
MAPK pP38-THR180/TYR182	CELL SIGNALING 9211	1/500	Rabbit
TrkB	ABCAM AB18987	1/500	Rabbit
S1PR2	PROTEINTEK 21180-1-AP	1/1000	Rabbit
GLUTAMINASA I	NOVUS NBP2-29940	1/1000	Rabbit
ACTINA	ABCAM AB6276-100	1/5000	Mouse
GAPDH	MILLIPORE MAB374	1/10.000	Mouse

Tabla 3. Proteínas analizadas por western blot en muestras de expresión en membrana en cerebelo.

Anticuerpo Primario	Casa comercial/Referencia	Concentración	Anticuerpo Secundario
ADAM17	ABCAM AB2051	1/250	Rabbit

TNFR1	ABCAM AB19139	1/250	Rabbit
GLT1	Thermo PAS PA5-19706	1/1000	Rabbit
GAT3	MILLIPORE AB1574	1/500	Rabbit
GLAST	NOVUS BIO NB100-1869	1/4000	Rabbit
S1PR2	PROTEINTEK 21180-1-AP	1/1000	Rabbit
CCR2	NOVUS NBP1-48337	1/1000	Rabbit
P2X4R	INVITROGEN PA5-41080	1/500	Rabbit
KCC2	MILLIPORE 07-432	1/1000	Rabbit
TrkB	ABCAM AB18987	1/500	Rabbit

Una vez retirado el anticuerpo primario, las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween durante 10 min y se incubaron con el anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo primario y que está conjugado con la fosfatasa alcalina durante 45 min a temperatura ambiente. Cuando se quitó el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween durante 10 min y se realizó un lavado con tampón sustrato (100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 100mM Tris-Base a pH=9.5). Por último, las membranas se revelaron usando el método colorimétrico de la enzima fosfatasa alcalina con 0.6% de NBT (4-Nitro blue tetrazolium chloride) y 0.35% de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine) en tampón sustrato. La reacción se paró antes de la saturación de las bandas poniendo las membranas en agua destilada.

Una vez secas las membranas, se escanearon en un escáner Hewlett Packard Scanjet 5300C y se cuantificó la intensidad de las bandas con el programa AlphaImager 2200 (AlphaEaseFC 2200). Los valores de intensidad se relativizaron frente a la intensidad de la banda de actina o GAPDH, empleada como control de carga (dependiendo de la masa molecular de las otras proteínas). Además, los niveles de fosforilación se normalizaron con la cantidad total de las proteínas respectivas. En el caso de la expresión en membrana de los receptores y transportadores se calculó como la resta entre la intensidad de las bandas sin BS3 (proteínas totales) y con BS3 (proteínas intracelulares). Los valores se expresaron como porcentaje respecto a la intensidad de las muestras control.

5. ANÁLISIS DE NEUROINFLAMACIÓN MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA

5.1. Preparación del tejido

En los experimentos in vivo, las ratas se anestesiaron por inyección intraperitoneal de pentobarbital (1 ml/kg) y por vía intracardiaca se perfundieron usando suero salino. Para fijar los tejidos, se perfundieron 0,5L de PFA al 4% en PB 0.1 M (75.4 mM Na₂HPO₄, 24.6 mM NaH₂PO₄) (pH 7.4). El cerebro se extrajo y se colocó en PFA durante 24 horas, y a continuación, se guardó en PB 0.1 M con azida sódica al 0.01% hasta el procesado.

En los experimentos *ex vivo* de cortes de cerebelo se destinaron para su análisis por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia fijándolos y procesándolos de la misma forma que *in vivo*.

Las muestras se incluyeron en bloques de parafina mediante un procesador automático de tejidos Leica HistoCore PEARL (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania), en el cual el tejido es sometido a los siguientes pasos: 1 h con etanol al 70%, 1 h con etanol al 96%, 1h con etanol al 100%, 1 h con etanol 100%, 1 h con etanol 100%, 1 h con xileno y este paso se repite 3 veces, 1 h con parafina a 62°C, 2 h con parafina repitiéndose dos veces este paso. A continuación, se realizaron cortes de cerebelo de 5 µm con un microtomo (HM 340E, Leica).

Previamente a la inmunohistoquímica o inmunofluorescencia, los cortes se desparafinaron incubándolos 1 h a 60°C y se hidrataron mediante un teñidor Leica ST5010 Autostainer XL (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania) siguiendo este protocolo: 2 lavados de 10 min con xileno, 1 lavado de 5 min con etanol al 100%, 2 lavados de 5 minutos con etanol al 96 % y un lavado de 5 min con etanol al 70%. En la inclusión en parafina se generan enlaces covalentes con los antígenos que impide el posterior reconocimiento por el anticuerpo primario. Para disociar esos enlaces y conseguir un reconocimiento más efectivo de los antígenos de interés, se empleó la técnica de recuperación antigénica (FLEX TRS High), que consiste en incubar los cortes en una cubeta con un tampón adecuado según el anticuerpo. Puede ser una solución *High* (citrato sódico 10 mM, Tween 20 al 0.05%, pH=6.0) o *Low* (Tris base 10 mM, EDTA 1 mM, Tween 20 al 0.05%, pH=9.0), según el antígeno de interés a 90-95°C durante 3 min en el microondas.

En la Tabla 4 se indica el método de recuperación antigénica utilizado para cada anticuerpo.

5.2. Inmunohistoquímica

Para la inmunohistoquímica se utilizó el siguiente protocolo: los cortes se lavaron 3 veces en PB 0.1 M durante 5 minutos, se incubaron con H₂O₂ al 3% durante 15 min para bloquear la actividad de las peroxidases endógenas. Se lavaron los cortes con PTA (0.1 M tampón fosfato salino (PBS), 0.1% BSA, 0.1 % Triton-X100) para la permeabilización, y se incubaron en tampón de bloqueo para bloquear uniones inespecíficas (suero de la especie en la que se han obtenido los anticuerpos secundarios). A continuación, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 4) durante la noche (16 h) a 4°C. Al día siguiente, se quitó el anticuerpo primario con lavados con PTA y los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, los cortes se incubaron con el complejo ABC (Avidina-biotina conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)) para intensificar la señal durante 30 minutos utilizando el kit VECTASTAIN® ABC HRP (Peroxidase, Standard) (PK-4000, Vector Laboratories), a temperatura ambiente. Una vez realizados los lavados, el siguiente paso fue el revelado. En el revelado, los cortes se incubaron con el kit DAB Substrate Kit (ab64238, Abcam), ya que los anticuerpos secundarios empleados estaban conjugados a

la peroxidasa de rábano, que reacciona al añadir el sustrato colorimétrico diaminobenzidina (DAB) en presencia de H₂O₂, dando lugar a un precipitado marrón.

Finalmente, las muestras se tiñeron con hematoxilina de Mayer's (DAKO) durante 5 min para marcar los núcleos celulares y se deshidrataron con el teñidor Leica ST5010 Autostainer XL (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania) siguiendo los siguientes pasos: 1 lavado de 30 s con etanol al 96 %, 3 lavados de 1 minuto con etanol al 100 % y 1 lavado de 2 minutos con xileno. Los portaobjetos de cerebelo se montaron inmediatamente con el montador automático CV5030 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania). Una vez secos los portaobjetos, se escanearon utilizando un escáner Aperio Versa (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania). Los portaobjetos escaneados se analizaron con el software ImageScope64, que permite obtener fotos a diferentes aumentos de las áreas de interés.

Los anticuerpos empleados y su dilución se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en inmunohistoquímica.

Anticuerpo primario	Casa comercial/Referencia	Concentración	Anticuerpo secundario	Recuperación antigénica
IBA1	WAKO 019-19741	1/300	Rabbit	High
GFAP	SIGMA G-3893	1/400	Mouse	High
TNF α	ABCAM ab66579	1/500	Rabbit	High
IL-1 β	ABCAM ab9722	1/200	Rabbit	Low
CCL2	PROTEINTECH 66272-1-Ig	1/200	Mouse	Low
S1PR2	PROTEINTEK 21180-1-AP	1/100	Rabbit	Low
CD68	ABCAM AB31630	1/100	Mouse	High
HMGB1	ABCAM AB18256	1/400	Rabbit	High
GLUTAMINASA I	NOVUS NBP2_29940	1/100	Rabbit	Low
BDNF	INVITROGEN OSB00017W	1/200	Rabbit	Low

5.3. Inmunofluorescencia

Se realizaron inmunofluorescencias dobles para analizar la colocalización del receptor de glicina, NF- κ B y TNF α con la microglía, astrocitos y neuronas de Purkinje, la colocalización de TNFR1 con las neuronas de Purkinje y la colocalización de BDNF con la microglía en cerebelo. El análisis de la localización subcelular de las subunidades p50, p65 de NF- κ B se realizó mediante inmunofluorescencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la **inmunofluorescencia**, tras el paso de recuperación antigénica explicado en el apartado 3.5.1 *Preparación del tejido* se empleó el siguiente protocolo: los cortes se lavaron 3 veces con PB 0.1 M durante 5 minutos y 3 veces con tampón fosfato salino con tritón y albúmina (PTA) durante 5 minutos y se bloquearon las uniones inespecíficas incubando con suero de la especie de procedencia del anticuerpo secundario durante 1 hora. A continuación, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario o con la mezcla de anticuerpos primarios correspondientes durante la noche (16 h) a 4°C. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario o con la mezcla de anticuerpos secundarios correspondiente durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios empleados son fluorescentes, por lo que todos los pasos a partir de la incubación con el secundario se realizaron en oscuridad. Finalmente, se tiñeron los núcleos celulares con DAPI (Sigma-Aldrich) y se montaron los portaobjetos con el medio *Fluorescent Mounting Media* (DAKO). Los anticuerpos empleados y su dilución se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en inmunofluorescencia.

Anticuerpo primario	Dilución primario	Casa comercial (referencia)	Anticuerpo secundario	Dilución secundario
GFAP	1/100	ABCAM (AB31630)	Anti-IgG de mono-Alexa 488/647	1/400
IBA1	1/300	ABCAM (AB5076) ABCAM (AB15690)	Anti-IgG de mono-Alexa 647/488	1/400
RECEPTOR DE GLICINA $\alpha 1\alpha 2$	1/500	ABCAM (AB23809)	Anti-IgG de mono-Alexa 488	1/400
TNF α	1/150	ABCAM (AB6671)	Anti-IgG de mono-Alexa 647/488	1/400
TNFR1	1/100	ABCAM (AB223352)	Anti-IgG de mono-Alexa 488	1/400
CALBINDINA	1/400	ABCAM (AB11426) ABCAM (AB755246)	Anti-IgG de mono-Alexa 647/488	1/400

p65 NF- κ B	1/100	ABCAM (AB16502)	Anti-IgG de mono-Alexa 488	1/400
p50 NF- κ B	1/200	ABCAM (AB7971)	Anti-IgG de mono-Alexa 488/647	1/400
BDNF	1/200	INVITROGEN OSB00017W	Anti-IgG de mono-Alexa 488	1/400

Una vez secas las preparaciones, se tomaron imágenes con un microscopio confocal invertido Leica TCS SP2 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania), utilizando el objetivo de inmersión 63X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N. Las ondas de excitación de los fluorocromos empleadas fueron 488 nm para visualizar la señal del anticuerpo secundario Alexa-488 verde, 532 nm para el anticuerpo Alexa-467 rojo y 405 nm para la señal del DAPI azul.

5.4. Hibridación in situ por fluorescencia (FISH) de TNF α

La hibridación in situ por fluorescencia se realizó para identificar que células expresan mRNA del TNF α en cortes de rata de 5 μ m en parafina. Los cortes fueron desparafinados y rehidratados: 15 min con xileno, 15 min con xileno, 7 min con etanol al 100%, 5 min con etanol al 96%, 30 min de inhibición de la peroxidasa con metanol y H₂O₂, 5 min con etanol 70%, 5 min con etanol 50% y 5 min con H₂O destilada. El tejido fue digerido con proteasa K (Ambion - Life Technologies) a una concentración 5 μ g/ml en agua DEPC (dietilpirocarbonato). Se utilizó una sonda conjugada con fluoresceína de 23 nucleótidos (50 μ M; Exiqon). La sonda fue diluida en disolución de hibridación (hasta concentración final 50 ng/ μ l) con 30% de formamida en tubos de PCR y se desnaturalizaron a 80°C durante 2 minutos en el termobloque. Inmediatamente se enfrió en hielo para evitar que se volviera a renaturalizar. Los portaobjetos se incubaron durante 16 horas en una cámara de hibridación humidificada a 60°C (temperatura de fusión óptima). Al día siguiente, se realizaron dos lavados con 1X SSC (Tampón de solución salina-citrato de sodio) a 48°C durante 15 minutos y 1X SSC a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los portaobjetos se contratiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma; 5 μ g/ml).

5.4.1. Cuantificación del mRNA de TNF α por la técnica FISH

Para cuantificar el contenido de ARNm de TNF α en las neuronas de Purkinje, se hicieron un total de 8 fotos por imagen obtenida con el microscopio confocal a 20X. Las células se delinearón manualmente usando ImageJ y se midió la intensidad media (MI). La función ROI manager se utilizó para cuantificar la intensidad de fluorescencia de la sonda. Las células se seleccionaron manualmente y el valor del contenido total de ARNm de TNF α se obtuvo utilizando el parámetro "*Mean Gray Value*". El valor de este parámetro es directamente proporcional a la intensidad de la expresión del ARNm, es decir, corresponde a la cantidad del mensajero. Los resultados se expresaron como media en escala de grises.

6. ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el software de análisis de imagen Image J (1.48v) o Image-Pro Plus.

6.1. Análisis de la activación de microglía

Para el análisis de la activación de la microglía en la sustancia blanca del cerebelo se cuantificó el área y el perímetro de las células marcadas con el anticuerpo contra IBA1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1) y el número de células marcadas positivamente con el anticuerpo contra CD68, una proteína que en el cerebro se expresa específicamente en la microglía. La microglía activada adopta una forma más ameboide ya que disminuye el tamaño y el número de ramificaciones. Por cada animal, se analizaron de 12-15 fotos a 56 aumentos (56X) en la sustancia blanca del cerebelo. En el caso de IBA1, las imágenes fueron analizadas con el software de análisis de imagen Image-Pro Plus. Las células de interés se identificaron por el color y se aplicó un filtro de tamaño para eliminar ruido de fondo o ramas de microglía de otro plano. Se seleccionó el área y el perímetro como unidad de medida. Los datos de área y perímetro se expresan como unidad de μm^2 o μm utilizando la barra de escala de la foto. Para evaluar en más detalle la activación microglial, se analizó la tinción para CD68. Se contó el número de células teñidas con anti-CD68 usando la función de contador de células “*Cell counter*” de ImageJ, y los resultados se expresaron como células/ mm^2 . Para el análisis estadístico, se promediaron los datos obtenidos en las distintas fotos para cada animal.

6.2. Análisis de la activación de astrocitos (GFAP)

Para el análisis de la activación de astrocitos en la sustancia blanca del cerebelo, se cuantificó la expresión de GFAP (Glial fibrillary acidic protein), un marcador específico de astrocitos. Se realizaron 15 fotos a 56X por cada animal. Las imágenes fueron analizadas con software ImageJ: se convirtieron a 8 Bits, se aplicó la función Autolocal threshold y se usó el método de análisis Bernsen. A continuación, se aplicaron umbrales de intensidad y filtros de tamaño (*0-infinity*). Las imágenes se revisaron de forma manual para asegurar que el programa detectaba la marca de GFAP correctamente. Los resultados determinan el área total teñida con GFAP y se expresan como el porcentaje de área teñida con GFAP respecto del control.

6.3. Análisis del contenido de TNF α , IL-1 β , HMGB1, Glutaminasa, CCL2 y BDNF en sustancia blanca o neuronas de Purkinje

Para el análisis de la expresión de TNF α , IL-1 β , HMGB1, glutaminasa, CCL2, y BDNF se utilizó el mismo procedimiento. Para el análisis de la sustancia blanca en el cerebelo se hicieron 10 fotos a 56X y para la capa de neuronas de Purkinje se realizaron 10 fotos a 40X por cada animal. A continuación, las imágenes fueron analizadas con ImageJ.

El número de células positivas que se tiñen con el anticuerpo contra cada proteína en la sustancia blanca del cerebelo se contó manualmente usando la función “*Cell counter*” de

ImageJ y el área de la foto se midió con la herramienta “*freehand selection*”. Los resultados se expresaron como células/mm² en el caso de TNF α e IL-1 β . Para el análisis del contenido de las neuronas de Purkinje, esta región se seleccionó manualmente utilizando la herramienta ImageJ’s ROI Manager (consiste en rodear todas las células de interés que aparecen en las imágenes y en utilizar zonas donde no se observa tinción como valores de fondo), y se calculó el valor de intensidad de cada proteína en neuronas de Purkinje al que se le restó el promedio de las intensidades de fondo. Los resultados se expresaron como “*Mean Grey Value*” para todas las proteínas mencionadas.

6.4. Análisis de la distribución subcelular de NF- κ B p50 y p65

Se analizó la activación del factor de transcripción NF- κ B en neuronas de Purkinje de cerebelo mediante inmunofluorescencia. Las subunidades p50 y p65 del factor de transcripción NF- κ B pueden estar ubicadas en el citosol, núcleo o nucléolo de la célula. Una mayor translocación de estas subunidades del citosol al núcleo corresponde a una mayor activación del factor de transcripción, por lo tanto, mayor ratio núcleo/citosol, mayor activación de NF- κ B. Por cada muestra, se analizaron 8-10 imágenes a 63X por rata, obtenidas en un microscopio confocal utilizando el objetivo de inmersión 63X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N.A. El análisis de imagen se realizó con el software ImageJ. Para ello, se seleccionaron los núcleos (marcados con DAPI) en el canal de fluorescencia azul, usando la función ROI Manager. Esta selección se aplicó después en el canal verde (que corresponde a la señal de la subunidad p50 o p65) para medir la intensidad de la fluorescencia verde (expresada como *Mean Gray Value*) detectada en los núcleos. Después, se seleccionaron las células completas con esta misma función ROI y se midió la intensidad de fluorescencia verde. Por último, se obtuvo el valor de fluorescencia verde en el citosol restando la intensidad de la fluorescencia verde en el núcleo a la intensidad total de cada célula. Con estos valores, se calculó la ratio núcleo/citosol de las subunidades p50 o p65 de NF- κ B.

6.5. Análisis de expresión de NF- κ B y TNF α en microglía y astrocitos

En estudios previos del grupo, se han analizado los mecanismos por los que las alteraciones en cerebelo conducen a incoordinación motora en hiperamonemia crónica, identificando la participación de la vía TNF α -TNFR1-NF- κ B-Glutaminasa, con un aumento de la expresión de NF- κ B en microglía en el cerebelo (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a). Se realizó una inmunofluorescencia doble de la subunidad p50 de NF- κ B con Iba1 para marcar la microglía y con GFAP para marcar los astrocitos. También se realizó una inmunofluorescencia doble de TNF α con Iba1 para marcar la microglía y con GFAP para marcar los astrocitos. Se analizaron 8 fotos por rata tanto para NF- κ B como TNF α , las cuales fueron adquiridas en un microscopio confocal utilizando el objetivo de inmersión 63X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N.A. El número de células marcadas con NF- κ B o TNF α y con Iba1 o GFAP se contó manualmente y se refirió respecto al área de las imágenes. Los resultados se expresaron como el número de microglías o astrocitos que expresan NF- κ B p50 nuclear o TNF α (células/mm²). Para el análisis estadístico, se promediaron los datos obtenidos en las distintas fotos para cada animal.

7. MICRODIÁLISIS EN CEREBELO IN VIVO

La microdiálisis permite recoger líquido extracelular en un área cerebral concreta mientras las ratas están conscientes y moviéndose para analizar posteriormente la concentración de neurotransmisores y otros compuestos o metabolitos. 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 forma, 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.

Las ratas control e hiperamonémicas se anestesiaron con isoflurano (5% en 100% de oxígeno para inducir la anestesia y 2% para mantenerla) y, una vez dormidas, la cabeza del animal se pone en un aparato de estereotaxia para implantar la guía de microdiálisis (MD-2251, Omegaring Intracerebral Guide Cannula and Stylet, 6/pkg. BASi®) en el cerebelo. A continuación, se realizó una incisión sagital de 2.5 cm aproximadamente para que la superficie del cráneo estuviera al descubierto y se raspó con una espátula delicadamente para eliminar el tejido conectivo y así conseguir una adhesión del cemento dental a la superficie del cráneo correctamente. Después, se marcaron las coordenadas: -10.2 mm anteroposterior, -1.6 mm medio lateral y 1.2 mm dorsoventral respecto al bregma (Paxinos y Watson, 2007). Se hicieron dos perforaciones (1 mm de diámetro) para insertar 2 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. A continuación, se suturó la piel y se colocaron en jaulas de manera individual durante 48 horas hasta el momento de realizar la microdiálisis cerebral.

Después de 48 horas, se implantó una sonda de microdiálisis en la rata que se movía libremente. Se perfundió continuamente a través de la sonda líquido cefalorraquídeo artificial a un flujo de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ mediante una bomba de microperfusión (BAS, Analytical Systems, Inc, USA). La composición del líquido cefalorraquídeo artificial (en mM): NaCl, 145; KCl, 3,0; CaCl 22,26; tamponado a pH 7,4 con fosfato de sodio 2 mM.

Después de un período de estabilización de 2-3 horas, las muestras de microdiálisis se recogieron cada 30 minutos conteniendo cada una 90 μL de dializado. A partir de la cuarta fracción, se administró estriocina (4 μM) a través de la sonda de microdiálisis para bloquear el receptor de glicina. Todas las muestras se conservaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta el análisis de glutamato y GABA extracelular por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) después de la derivatización con oftalaldehído y detección de fluorescencia con excitación a 340 nm y emisión a 460 nm como se describió en Canales *et al.*, (2003) y descrito en el siguiente apartado.

8. DETERMINACIÓN DE GLUTAMATO Y GABA EXTRACELULAR POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) EN MUESTRAS DE MICRODIÁLISIS DEL CEREBELO

Los niveles de Glutamato y GABA en el líquido extracelular de cerebelo se determinaron por HPLC con un detector de fluorescencia (Waters 474, filtro de excitación 340 nm y un filtro de emisión 460 nm) después de haber sido derivatizados con OPA (dialdehído ftálico). Los aminoácidos reaccionan con el OPA en presencia de un reductor fuerte, en condiciones alcalinas (pH 9-11), dando un compuesto fluorescente. Se derivatizaron 10 μ L del extracto con la solución de OPA y se inyectaron en el HPLC al cabo de 2 minutos. Para la separación de los aminoácidos se usó una columna de fase reversa C18, con una longitud de 250 mm y un diámetro de 4.6 mm y con partículas de 5 μ m de diámetro (ODS 2, Waters Spherisorb) mantenida a temperatura constante de 20°C. Se empleó un estándar de Glutamato y GABA 50 μ M (Sigma). La cromatografía se realizó con un programa de gradiente de dos soluciones (A y B) cuyo flujo fue de 1mL/min. La solución A era una mezcla 95/5(vol/vol) de tampón acetato sódico 50 mM (pH 5.67) y metanol y alcohol isopropílico (12.5 mL por litro de fase). La solución B era una mezcla 70/30 (vol/vol) metanol/agua. La concentración de Glutamato y GABA (nM) se calculó a partir del área obtenida por HPLC.

9. EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES MOTORAS

9.1. Procedimiento quirúrgico: implantación de mini-bombas osmóticas

En los experimentos in vivo, ratas control e hiperamonémicas (después de tres semanas de dieta enriquecida en amonio) se les realizó una cirugía que consiste en implantar una mini-bomba osmótica intracerebral que libera el tratamiento seleccionado paulatinamente, en este caso con el antagonista del receptor de S1PR2 (JTE-013) o su vehículo, atravesando la barrera hematoencefálica.

Se utilizaron mini-bombas osmóticas con cánula para infusión cerebral (“ALZET®” Brain infusion KIT II 3-5mm. Osmotic mini-pumps modelo 2004. ALZA Corporation, Palo Alto, CA, USA). Éstas se activan automáticamente al ser abiertas y liberan su contenido a una velocidad de 0.25 μ l/hora, vaciándose por completo a los 28 días. Las mini-bombas osmóticas se rellenaron previamente con el contenido correspondiente según cuatro grupos experimentales diferentes:

- 1) CV: Ratas control a las que se implantaron mini-bombas osmóticas con vehículo (suero salino + DMSO 1%).
- 2) CJ: Ratas control a las que se implantaron mini-bombas osmóticas con JTE-013 (concentración final 1.22mM (Kimura *et al.*, 2008), AXON_{MEDCHEM} CAS [383150-41-2]; diluido en suero salino + DMSO 1%).

3) HV: Ratas hiperamonémicas a las que se implantaron mini-bombas osmóticas con vehículo.

4) HJ: Ratas hiperamonémicas a las que se implantaron mini-bombas osmóticas con JTE-013.

Cada rata se anestesió con isofluorano (5% en 100% de oxígeno para inducir la anestesia y 2% para mantenerla) y se le afeitó el pelo de la cabeza. Para poner la cánula de manera exacta y precisa en el ventrículo cerebral, la cabeza del animal se colocó en un aparato estereotáxico. A continuación, se realizó una incisión sagital para exponer la superficie del cráneo y se taladró un pequeño agujero para la inserción de la cánula en las siguientes coordenadas a partir de bregma: +0.9 mm en el eje anteroposterior, +1.3 mm en el eje mediolateral y 4.5 mm en el dorsoventral (Paxinos y Watson, 2007). Antes de colocar la cánula, usando unas pinzas hemostáticas, se preparó un pequeño túnel subcutáneo en el área escapular de la espalda del animal a partir de la incisión realizada hasta el área media para introducir la mini-bomba osmótica conectada vía catéter a la cánula a implantar intraventricularmente. La mini-bomba osmótica se insertó en el bolsillo subcutáneo permitiendo siempre cierta movilidad sin que el catéter estuviera muy tenso para que no se desenganche de la cánula. Una vez en el cerebro, la cánula se sujetó a la superficie del cráneo con un par de tornillos y cemento dental, y se suturó la piel con seda quirúrgica trenzada y puntos simples.

Después de la operación, se dejaron transcurrir unos días para que los animales se recuperasen antes de empezar cualquier test de comportamiento. Pasados 28 días desde la implantación de las mini-bombas osmóticas se sacrificaron las ratas, empleándose el cerebro para análisis de western blot o inmunohistoquímica. La funcionalidad de las bombas se verificó pesándolas antes de colocarlas y después del sacrificio.

9.2. Beam Walking Test: coordinación motora

Este test evalúa la coordinación motora y el equilibrio. Consiste en hacer pasar a la rata por un palo de 1 metro de longitud situado a 1 metro del suelo, hasta alcanzar una caja cerrada y oscura que proporciona un ambiente cómodo para las ratas (Figura 22). Primero se realizó un test de entrenamiento en el que se hizo pasar a las ratas tres veces por el palo, dejándolas unos 2 minutos aproximadamente dentro de la caja para que se sintieran protegidas. Algunas ratas que no pasaban por el palo debido al miedo, se eliminaron del test. A continuación, se realizó el test el cual consiste en que las ratas pasen 3 veces por el palo contando el número de resbalones y el tiempo en segundos. El parámetro utilizado para medir la coordinación motora fue la media del número de resbalones (a mayor número de resbalones, más incoordinación motora).



Figura 22. Imagen del Beam Walking test. Las ratas deben recorrer el palo desde la plataforma situada a la izquierda hasta la caja negra situada a la derecha.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa de software GraphPad Prism Inc. Versión 7.0. En primer lugar, se evaluó la normalidad y las varianzas de los datos mediante la prueba ómnibus de D'Agostino y Pearson y Shapiro-Wilk. Las diferencias en las variaciones de los datos distribuidos normalmente se evaluaron mediante la prueba de Bartlett. 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 como Kruskal-Wallis seguida de un test post-hoc. Cuando se compararon solamente dos grupos se utilizó el t-test de Student. Un valor $p < 0.05$ se consideró como significativo. Los resultados se expresan como media \pm SEM (Error estándar de las medias) del número de animales indicados en cada caso. El número de ratas usadas para cada parámetro y procedimiento estadístico se indica en la correspondiente leyenda de la figura.

CAPÍTULO 1: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

1. EL AUMENTO DE LA NEUROTRANSMISIÓN GLICINÉRGICA INDUCE NEUROINFLAMACIÓN EN CEREBELO DE RATAS HIPERAMONÉMICAS. EL GMPc EXTRACELULAR REDUCE LA NEUROINFLAMACIÓN REDUCIENDO LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE GLICINA

Se sabe que el GMPc extracelular reduce la neuroinflamación en ratas con hiperamonemia crónica y con EHM a través de efectos sobre la microglía, los astrocitos y las neuronas de Purkinje. Los mecanismos subyacentes no se conocen en detalle.

El GMPc extracelular modula la neuroinflamación por mecanismos diferentes a los del GMPc intracelular, actuando sobre distintos tipos celulares, implicando diferentes mecanismos y vías de transducción de señales. En esta tesis estudiamos los mecanismos por los que el GMPc extracelular reduce la neuroinflamación en cerebelo.

La hiperamonemia crónica induce neuroinflamación en el cerebelo, con activación de microglía y astrocitos y activación de la vía TNFR1-NF- κ B-glutaminasa-glutamato-GABA. Estas alteraciones contribuyen al deterioro cognitivo y motor. La administración crónica de GMPc extracelular intracerebral in vivo mediante mini-bombas osmóticas en ratas con hiperamonemia crónica redujo la neuroinflamación, normalizando la activación de microglía y astrocitos y la vía TNFR1-NF- κ B -GABA (Figura 11, pág. 24) (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

Los mecanismos moleculares por los que el GMPc extracelular reduce la neuroinflamación no se pueden analizar en detalle en ratas in vivo. Por lo que se ha puesto a punto un sistema experimental ex vivo utilizando cortes frescos de cerebelo de ratas control e hiperamonémicas. Se trata de un modelo en el que, al mantener los cortes de cerebelo vivos, se mantienen en funcionamiento los circuitos e interacciones entre los diferentes tipos y poblaciones celulares y que permite analizar el efecto que tienen los diferentes tratamientos utilizando diferentes cortes del mismo animal y analizar los mecanismos celulares y moleculares implicados.

1.1. El GMPc extracelular reduce la activación de astrocitos y microglía y normaliza la expresión en membrana de ADAM17 y TNFR1 en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas

En primer lugar, analizamos si los cortes frescos ex vivo reproducen los efectos encontrados in vivo, tanto los de la hiperamonemia como los de la adición de GMPc extracelular.

Evaluamos los efectos de la adición de GMPc extracelular sobre la activación de microglía y astrocitos por inmunohistoquímica (Fig. 23 A y B).

La activación de la microglía se cuantificó midiendo su área y perímetro, que se reducen en microglía activada. En sustancia blanca, el área de la microglía se redujo en ratas hiperamonémicas a $201 \pm 8 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,0005$) en comparación con $265 \pm 10 \mu\text{m}^2$ en ratas control. El tratamiento con GMPc extracelular normalizó ($p < 0,0001$) el área teñida por Iba-1 en ratas hiperamonémicas a $323 \pm 19 \mu\text{m}^2$ (Fig. 23 C).

El perímetro de la microglía se redujo ($p < 0,0001$) en ratas hiperamonémicas a $108 \pm 5 \mu\text{m}$ en comparación con $164 \pm 7 \mu\text{m}$ en las ratas control. El tratamiento con GMPc extracelular revirtió la activación de la microglía en ratas hiperamonémicas, aumentando el perímetro a $165 \pm 9 \mu\text{m}$ (Fig. 23 D).

Las ratas hiperamonémicas también muestran activación de astrocitos en el cerebelo, como refleja la morfología alterada de los astrocitos teñidos con anti-GFAP (Fig. 23 B).

La activación de astrocitos se cuantificó analizando el área teñida por GFAP, que aumentó en ratas hiperamonémicas a $130 \pm 3\%$ ($p < 0,0001$) de las ratas control. El tratamiento con GMPc extracelular redujo ($p < 0,02$) el área teñida por GFAP en ratas hiperamonémicas a $110 \pm 2\%$ de las ratas control (Fig. 23 E), indicando que revierte la activación de astrocitos.

La activación de la microglía y los astrocitos se asocia con un aumento de TNF α e IL1 β en el cerebelo (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a). Evaluamos por western blot el efecto del GMPc extracelular sobre el contenido de TNF α e IL1 β en cortes de cerebelo. La hiperamonemia aumentó el contenido de TNF α a $131 \pm 8\%$ ($p < 0,0002$) y de IL1 β a $129 \pm 7\%$ ($p < 0,004$) de las ratas control. El GMPc extracelular normalizó el contenido tanto de TNF α como de IL1 β a $94 \pm 8\%$ ($p < 0,0003$) y a $93 \pm 6\%$ respectivamente (Fig. 23 F y G, respectivamente).

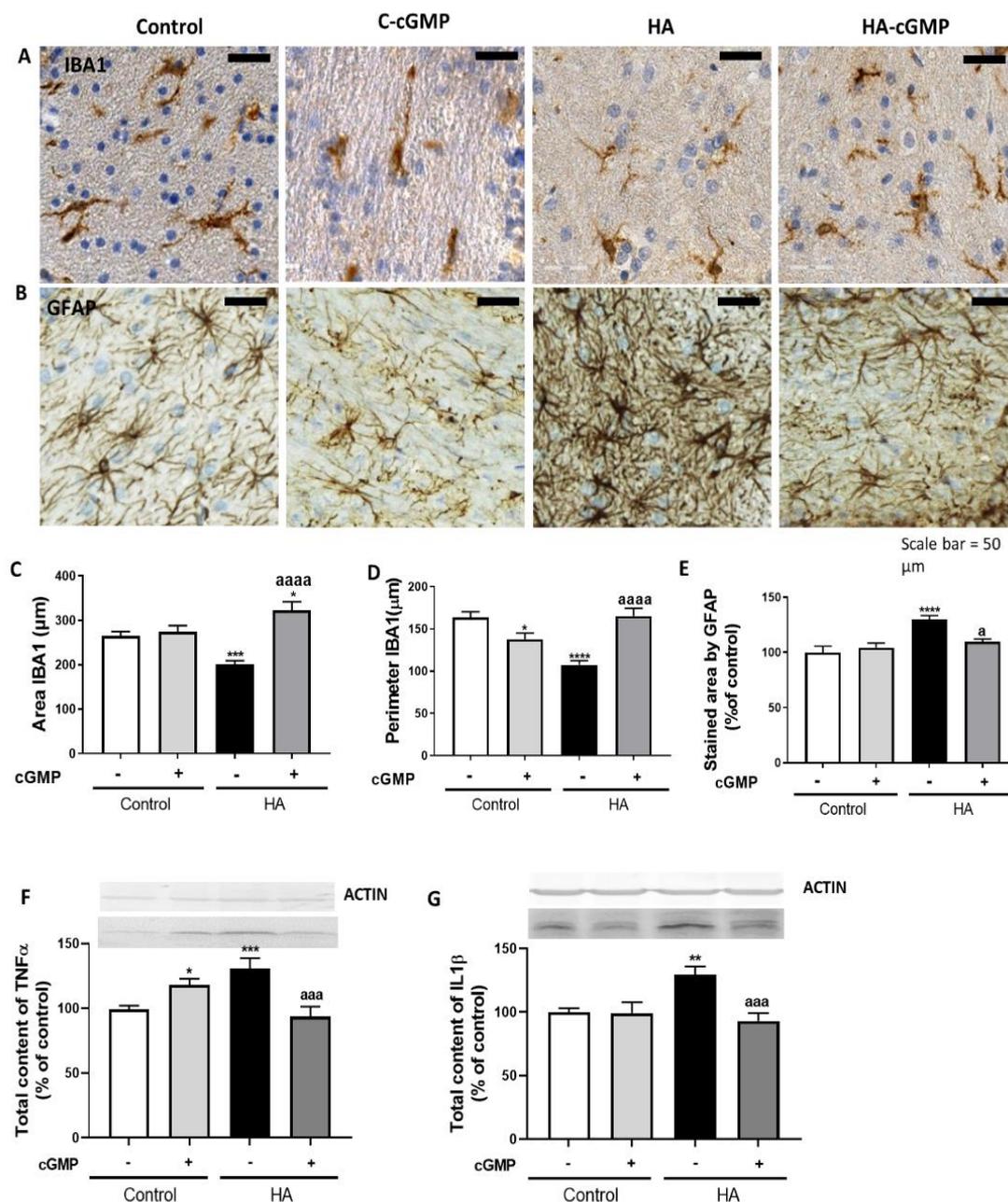


Figura 23. El GMPc extracelular reduce la activación de astrocitos y microglía y el contenido de TNF α e IL1 β en el cerebelo de ratas hiperamonémicas (HA). La inmunohistoquímica se realizó en cortes de cerebelo de ratas control e hiperamonémicas tratadas o no con GMPc como se indica en los métodos con tinción DAB usando anticuerpos contra IBA1 (A) y GFAP (B). Para analizar la activación de la microglía, se midió el área (C) y el perímetro (D) de las células utilizando el software de análisis ImageJ. El área teñida con GFAP se midió como un indicador de activación de astrocitos (E). El contenido de TNF α (F) e IL1 β (G) se analizó mediante western blot. Los valores son la media \pm SEM de 6-8 ratas por grupo en A-E y de 30-83 ratas por grupo en F-G. Los valores significativamente diferentes de los de las ratas control se indican con un asterisco y los diferentes de las ratas hiperamonémicas se indican con una "a". * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001; a p < 0,05, aaa p < 0,001, aaaa p < 0,0001. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de Turkey post hoc.

CAPÍTULO 1: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha descrito que el aumento de la expresión en membrana de TNFR1 media la inducción de neuroinflamación y la incoordinación motora en ratas hiperamonémicas (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

La cantidad de TNFR1 en la membrana aumentó en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas hasta el $152 \pm 14\%$ ($p < 0,002$) de las ratas control (Fig. 24 B). El tratamiento con GMPc extracelular revirtió completamente este efecto, reduciendo el TNFR1 en la membrana a $77 \pm 12\%$ ($p < 0,0001$) de las ratas control (Fig. 24 B).

La expresión en membrana de TNFR1 puede modularse por “*Shedding*” (liberación) mediada por ADAM17 (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997). Por lo tanto, evaluamos los efectos de la hiperamonemia y del GMPc extracelular sobre la expresión en membrana de ADAM17. Como se muestra en la Fig. 24 A, la cantidad de ADAM17 en la membrana se reduce en el cerebelo de ratas de hiperamonemia a $59 \pm 8\%$ ($P < 0,003$) de las ratas control (Fig. 24 A). Esto sugiere que la hiperamonemia podría aumentar la expresión en membrana de TNFR1 al reducir su liberación mediada por ADAM17. El GMPc extracelular también revirtió completamente este efecto, aumentando ADAM17 en la membrana a $100 \pm 11\%$ ($p < 0,008$) de las ratas control (Fig. 24 A).

Esto indica que el GMPc extracelular podría reducir la expresión en membrana de TNFR1 al normalizar la expresión en membrana de ADAM17.

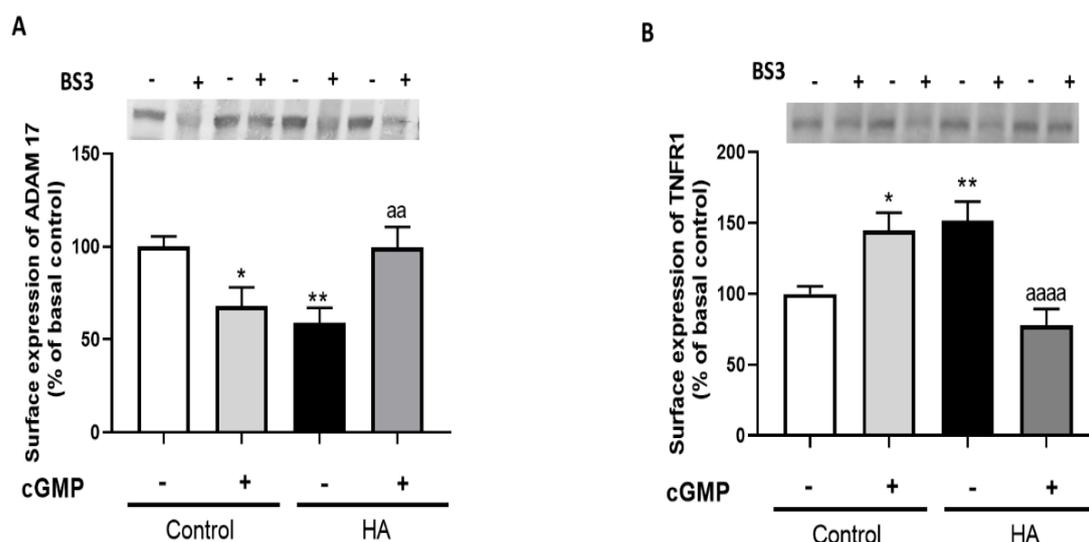


Figura 24. El GMPc extracelular normaliza la expresión en la membrana de ADAM17 y TNFR1 en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas. La expresión en membrana de ADAM17 (A) y TNFR1 (B) se analizó usando el procedimiento de BS3 en cortes de ratas control e hiperamonémicas (HA) tratadas o no con GMPc extracelular. Los valores son la media \pm SEM de 20 a 39 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con un asterisco y los diferentes de las ratas hiperamonémicas se indican con una "a". * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; aa $p < 0,01$, aaaa $p < 0,0001$. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de Turkey post hoc.

1.2. El GMPc extracelular normaliza el contenido nuclear de NF- κ B y los niveles de glutaminasa, TNF α , IL1 β y HMGB1 en neuronas de Purkinje de ratas hiperamonémicas

El aumento de la expresión de la membrana de TNFR1 en ratas con hiperamonemia crónica conduce a un aumento de la translocación nuclear de la subunidad p50 de NF- κ B y, como consecuencia, a un aumento de la expresión de TNF α , IL1 β y glutaminasa (Figura 11, pág. 24) (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a; Balzano *et al.*, 2020b).

A continuación, evaluamos el efecto del GMPc extracelular sobre la activación del factor de transcripción NF- κ B (su localización en núcleo) y sobre el contenido de proteínas proinflamatorias cuya expresión se modula por NF- κ B. También estudiamos si la reducción de la expresión en membrana de TNFR1 por GMPc extracelular reduce la vía NF- κ B en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas.

Como se muestra en la Fig. 25 A y E, el contenido nuclear de la subunidad p50 de NF- κ B en las neuronas de Purkinje aumenta al $3,8\pm 1\%$ ($p<0,001$) del total en hiperamonemia mientras que en las ratas control representa el $1,8\pm 0,3\%$ y se normaliza al $2\pm 0,3\%$ ($p<0,001$) por el GMPc extracelular.

El contenido de proteínas pro-inflamatorias en neuronas de Purkinje se analizó cuantificando por inmunohistoquímica la intensidad de la tinción con los anticuerpos correspondientes. El contenido se expresa en unidades de intensidad (UI). La hiperamonemia aumentó el contenido de glutaminasa a 81 ± 3 UI ($p<0,05$) con respecto a las ratas control 69 ± 3 UI y el GMPc extracelular normalizó el contenido de glutaminasa a 64 ± 3 UI ($p<0,0004$) (Fig. 25 B y F).

La hiperamonemia aumentó el contenido de TNF α a 63 ± 2 UI ($p<0,0001$) con respecto a las ratas control 43 ± 2 UI y el GMPc extracelular lo normalizó a 34 ± 2 UI ($p<0,0001$) (Fig. 25 D y H).

Por último, las ratas hiperamonémicas presentan un aumento del contenido de IL1 β a 110 ± 2 UI ($p<0,0001$) (Fig. 42 A y C) y de HMGB1 68 ± 2 UI ($p<0,02$) (Fig. 26 B y D) en neuronas de Purkinje en comparación con las ratas control (100 ± 3 UI y 50 ± 2 UI respectivamente). El GMPc extracelular normalizó el contenido de IL1 β y HMGB1 a 97 ± 3 UI ($p<0,0001$) y 40 ± 1 UI ($p<0,0001$) respectivamente.

El contenido del ARNm de TNF α en neuronas de Purkinje se analizó cuantificando por hibridación in situ por fluorescencia la intensidad de fluorescencia de la sonda correspondiente. La cantidad del mensajero se expresa en unidades de intensidad (UI).

La hiperamonemia también aumentó el contenido del ARNm de TNF α a 7 ± 1 UI ($p<0,04$) con respecto a las ratas control $4,6\pm 1$ UI y el GMPc extracelular lo normalizó a $3,3\pm 0,3$ UI ($p<0,0002$) (Fig. 25 C y G).

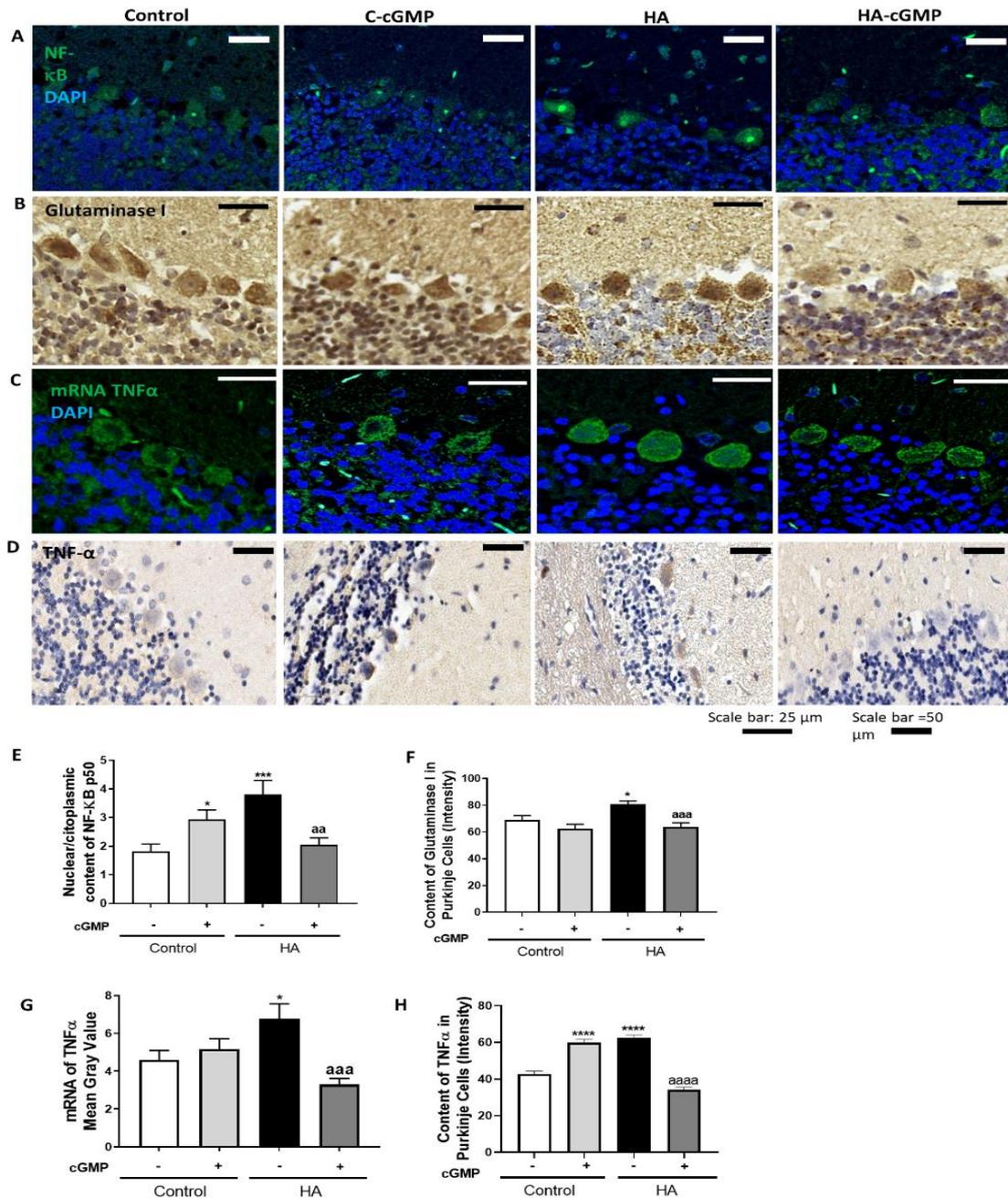


Figura 25. El GMPc extracelular normaliza el contenido nuclear de NF-κB y los niveles de glutaminasa, TNFα y ARNm de TNFα en neuronas de Purkinje de ratas hiperamonémicas. La inmunofluorescencia se realizó utilizando anti-NF-κB p50 (A) y sondas fluorescentes para ARNm de TNFα (C) como se describe en el apartado "Métodos". La inmunohistoquímica se realizó como se indica en los métodos con tinción DAB usando anticuerpos contra glutaminasa (B) y TNFα (D). Se muestran imágenes representativas. La relación contenido núcleo/citoplasma de NF-κB (E), el contenido de glutaminasa (F), mRNA de TNFα (G) y TNFα (H) se cuantificó en neuronas de Purkinje. Los valores son la media ± SEM de 6-8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con un asterisco y los diferentes de las ratas hiperamonémicas se indican con una "a". * p < 0,05, *** p < 0,001, **** p < 0,0001; aa p < 0,01, aaa p < 0,001, aaaa p < 0,0001. Los datos se analizaron utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba post hoc de Dunnett (en E) y un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de Turkey post hoc (en F-H).

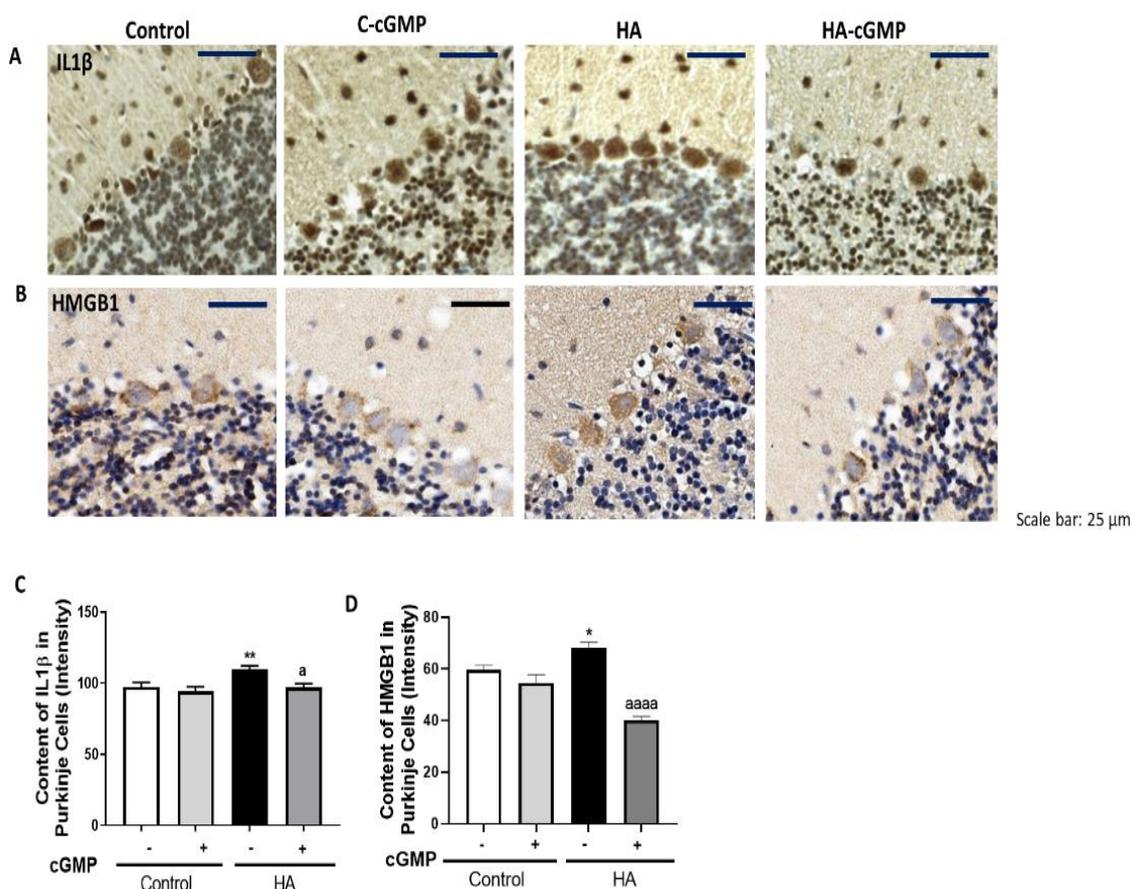


Figura 26. El GMPc extracelular normaliza la IL1β y HMGB1 en las neuronas de Purkinje de ratas hiperamonémicas. La inmunohistoquímica se realizó como se indica en métodos con tinción DAB usando anticuerpos contra IL1β (A) y HMGB1 (B). Se muestran imágenes representativas. El contenido de IL1β (C) y HMGB1 (D) se cuantificó en neuronas de Purkinje como se describe en el apartado "Métodos". Los valores son la media ± SEM de 6-8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con un asterisco y los de las ratas hiperamonémicas se indican con una "a". * p < 0,05, ** p < 0,01; a p < 0,05, aaaa p < 0,0001. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de Turkey post hoc.

Esto indica que el GMPc extracelular reduce la activación de la microglía por un proceso mediado por la reducción de TNFR1 en membrana y la inhibición de la vía intracelular asociada que conduce a la activación de NF-κB y al aumento de la expresión de proteínas pro-inflamatorias moduladas por NF-κB, que se normaliza por el GMPc extracelular.

Se ha descrito que la activación de los receptores de glicina se reduce por el GMPc extracelular (Bukanova *et al.*, 2014), cuyos niveles se reducen en el cerebelo de ratas hiperamonémicas in vivo. Se sabe que el GMPc extracelular modula la neuroinflamación y la neurotransmisión en ratas hiperamonémicas. Sin embargo, no se ha estudiado si los efectos del GMPc extracelular en el cerebelo de ratas hiperamonémicas podrían estar mediados por la inhibición de los receptores de glicina. En esta tesis estudiamos los

mecanismos por los que el GMPc extracelular mejora la neurotransmisión en cerebelo y el posible papel de los receptores de glicina.

Para inducir estos efectos intracelulares, el GMPc extracelular debe actuar sobre una proteína de membrana que transmita sus efectos al interior de la célula. Hipotetizamos que el GMPc extracelular induce sus efectos reduciendo la activación del receptor de glicina. Para comprobar si esta hipótesis es correcta, otro objetivo de la tesis fue estudiar si el bloqueo del receptor de glicina con su antagonista estriquina reduce la neuroinflamación en el cerebelo y ver si lo hace por los mismos mecanismos que el GMPc extracelular.

1.3. El bloqueo del receptor de glicina reduce la activación de astrocitos y microglía en el cerebelo de ratas hiperamonémicas

Se ha demostrado que la hiperamonemia aumenta la neurotransmisión glicinérgica en el cerebelo *in vivo* (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016c). Evaluamos si la reducción de la neurotransmisión glicinérgica mediante el tratamiento con estriquina, un antagonista del receptor de glicina, reduce la activación de microglía y/o astrocitos y la neuroinflamación en cortes frescos de cerebelo de ratas hiperamonémicas.

La activación de microglía aumentó en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas, como lo refleja los cambios en la morfología a una forma menos ramificada (Fig. 27 A). La estriquina normalizó la morfología de la microglía (Fig. 27 A), lo que indica una reducción de la activación microglial.

La activación de la microglía se cuantificó midiendo su área y perímetro, que se reducen en microglía activada. En sustancia blanca, el área de la microglía se redujo en ratas hiperamonémicas a $165 \pm 9 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,0001$) en comparación con $284 \pm 16 \mu\text{m}^2$ en ratas control. El tratamiento con estriquina normalizó ($p < 0,01$) el área teñida por Iba-1 en ratas hiperamonémicas a $253 \pm 13 \mu\text{m}^2$ (Fig. 27 C).

El perímetro de la microglía se redujo ($p < 0,0001$) en ratas hiperamonémicas a $81 \pm 5 \mu\text{m}$ en comparación con $163 \pm 9 \mu\text{m}$ en las ratas control. El tratamiento con estriquina redujo la activación de la microglía en ratas hiperamonémicas, aumentando el perímetro a $150 \pm 10 \mu\text{m}$ ($p < 0,0001$) (Fig. 27 D).

Las ratas hiperamonémicas también muestran activación de astrocitos en el cerebelo, como refleja la morfología alterada de los astrocitos teñidos con anti-GFAP (Fig. 27 B). El tratamiento con estriquina normalizó la morfología de los astrocitos (Fig. 27 B), lo que indica que la inhibición del receptor de glicina reduce la activación de astrocitos en ratas hiperamonémicas.

La activación de astrocitos se cuantificó analizando el área teñida por GFAP, que aumentó en ratas hiperamonémicas a $150 \pm 4\%$ ($p < 0,0001$) de las ratas control. El tratamiento con estriquina redujo ($p < 0,05$) el área teñida por GFAP en ratas hiperamonémicas a $127 \pm 5\%$ de las ratas control (Fig. 27 E) indicando que disminuye la activación de los astrocitos.

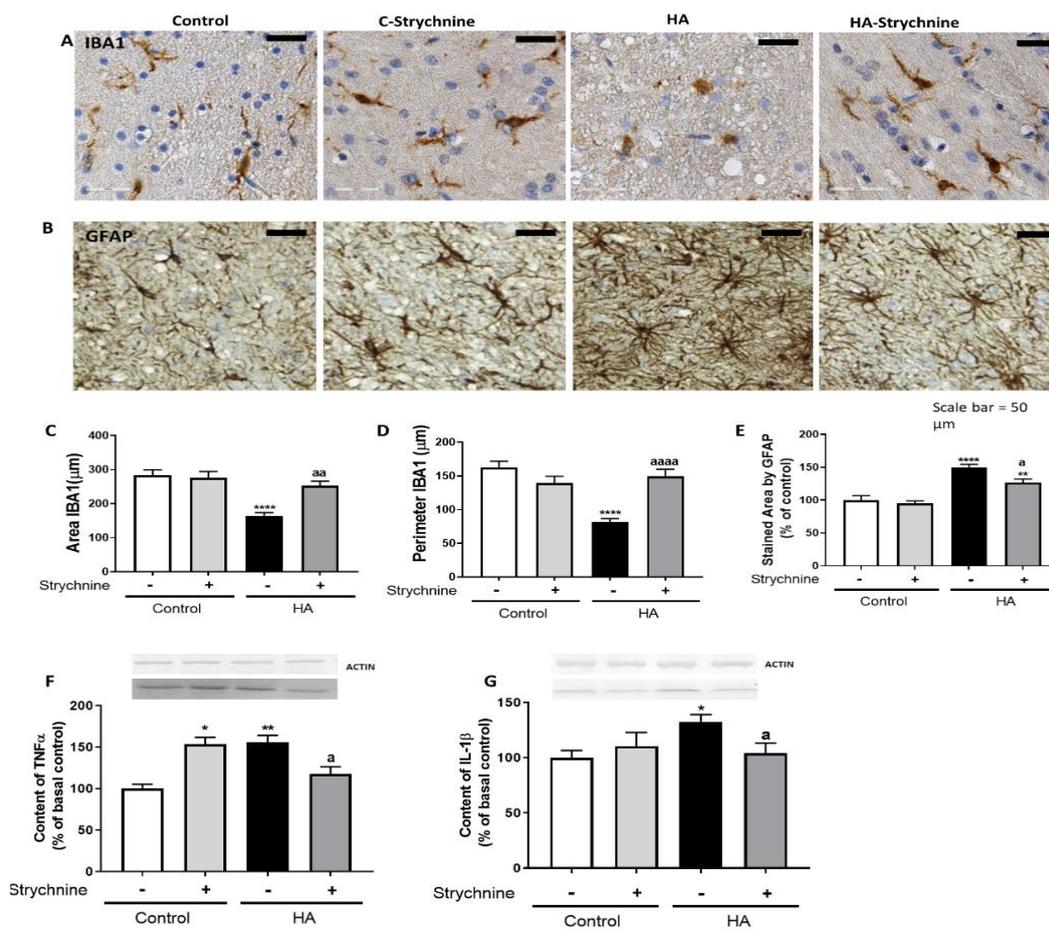


Figura 27. El bloqueo del receptor de glicina con estriquina reduce la activación de microglía y astrocitos y normaliza el contenido en TNF α e IL1 β en cerebelo de ratas hiperamonémicas (HA). La inmunohistoquímica se realizó en cortes de cerebelo de ratas control e hiperamonémicas tratadas o no con estriquina como se indica en métodos con tinción DAB usando anticuerpos contra IBA1 (A) y GFAP (B). Se analizó la activación de la microglía midiendo el área (C) y el perímetro (D) como se describe en "Métodos". El área teñida con GFAP se midió como un indicador de activación de astrocitos (E) como se describe en métodos. El contenido de TNF α (F) e IL1 β (G) se midió mediante Western blot. Los valores son la media \pm SEM de 6-8 ratas por grupo en A-E y de 13 a 30 ratas por grupo en F-G. Los valores significativamente diferentes de los de las ratas control se indican con un asterisco y los de las ratas hiperamonémicas se indican con una "a". * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$; a $p < 0,05$, aa $p < 0,01$, aaaa $p < 0,0001$. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de Turkey post hoc.

1.4. La estriquina normaliza el contenido de TNF α e IL1 β en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas

La activación de la microglía y los astrocitos se asocia con un aumento de TNF α e IL1 β en el cerebelo (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a). Evaluamos el efecto de la estriquina sobre el contenido de TNF α e IL1 β en cortes de cerebelo. La hiperamonemia aumentó el contenido de TNF α a $156 \pm 8\%$ ($p < 0,01$) y de IL1 β a $132 \pm 6\%$ ($p < 0,05$) en comparación a las ratas control. La estriquina normalizó el contenido tanto de TNF α como de IL1 β a $45 \pm 2\%$ ($p < 0,0001$) y a $60 \pm 2\%$ ($p < 0,0001$) (Fig. 27 F y G, respectivamente).

1.5. El receptor de glicina se localiza principalmente en las neuronas de Purkinje

La reducción de la activación de microglía y astrocitos por estricnina podría estar mediada por receptores de glicina ubicados en estas células gliales o en neuronas. Para arrojar luz sobre este punto, analizamos la localización del receptor de glicina en el cerebelo por inmunofluorescencia. Como se muestra en la Fig. 28, la tinción de fluorescencia doble muestra que el receptor de glicina colocaliza con calbindina, marcador de neuronas de Purkinje (Fig. 28 A) pero no con Iba1 (microglía) (Fig. 28 B) o GFAP (astrocitos) (Fig. 28 C).

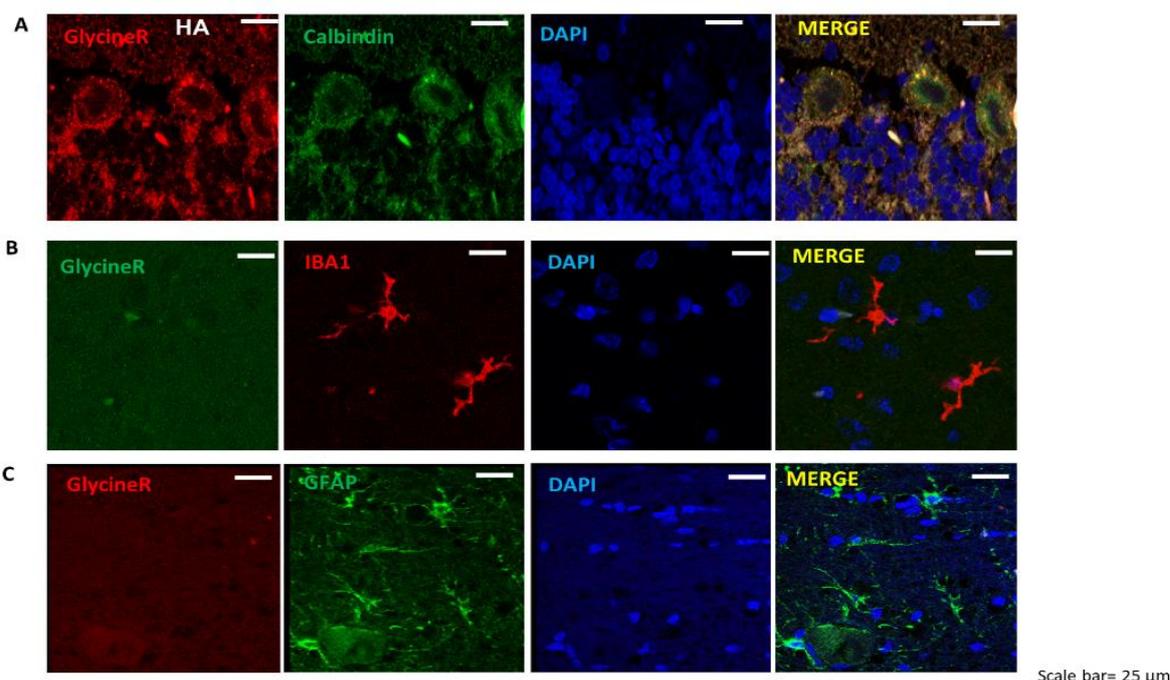


Figura 28. El receptor de glicina se localiza principalmente en las neuronas de Purkinje. Se realizaron tinciones de fluorescencia doble usando anticuerpos contra el receptor de glicina y contra calbindina (A), IBA1 (B) o GFAP (C) como se describe en métodos. Imágenes representativas de la tinción de doble fluorescencia mostraron que el receptor de glicina colocaliza con neuronas de Purkinje (A) pero no con microglía (B) o astrocitos (C).

Estos resultados sugieren que en ratas hiperamonémicas, la inhibición del receptor de glicina en las neuronas de Purkinje mediaría la reducción de la activación de microglía y astrocitos. Analizamos los mecanismos subyacentes.

1.6. El bloqueo del receptor de glicina normaliza la expresión en membrana del receptor TNF α TNFR1 a través de un mecanismo dependiente de PKC y ADAM17

Se ha descrito que el aumento de la expresión en la membrana de TNFR1 media la inducción de neuroinflamación y la incoordinación motora en ratas hiperamonémicas (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

La cantidad de TNFR1 en membrana aumentó en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas hasta el $143 \pm 13\%$ ($p < 0,05$) de las ratas control (Fig. 29 A). El tratamiento con estricnina revirtió completamente este efecto, reduciendo el TNFR1 en la membrana al $63 \pm 15\%$ ($p < 0,05$) (Fig. 29 A). La expresión en membrana de TNFR1 puede modularse por su liberación mediada por ADAM17 (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997). Por lo tanto, evaluamos los efectos de la hiperamonemia y de la estricnina sobre la expresión en membrana de ADAM17. Como se muestra en la Fig. 29 B, la cantidad de ADAM17 en la membrana se reduce en el cerebelo de ratas hiperamonémicas al $64 \pm 9\%$ ($p < 0,05$) de las ratas control (Fig. 29 B). Esto indica que la hiperamonemia podría aumentar la expresión en membrana de TNFR1 al reducir su liberación mediada por ADAM17. La estricnina también revirtió completamente este efecto, aumentando ADAM17 en la membrana de ratas hiperamonémicas al $122 \pm 16\%$ ($p < 0,01$) (Fig. 29 B).

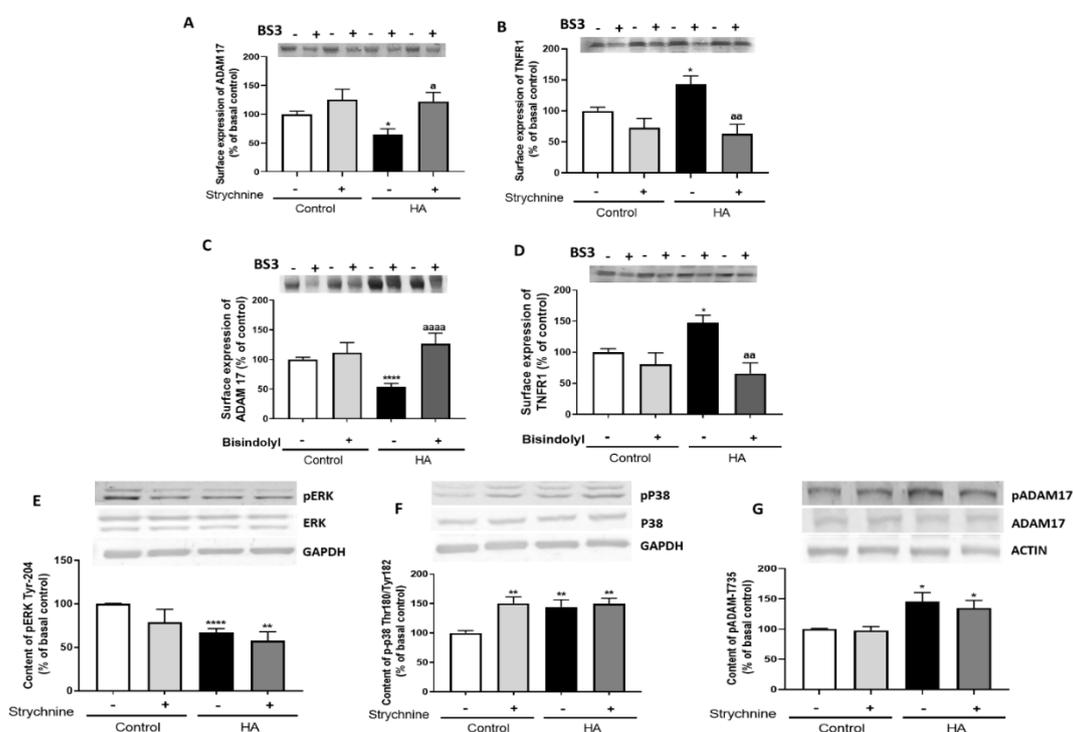


Figura 29. El bloqueo del receptor de glicina normaliza la expresión en membrana del receptor de TNF α TNFR1 a través de un mecanismo dependiente de PKC y ADAM17. La expresión en membrana de TNFR1 (A y C) y ADAM17 (B y D) se analizaron en cortes frescos de cerebelo de ratas hiperamonémicas (HA) y control tratadas con estricnina (antagonista del receptor de glicina) o bisindolil (inhibidor de PKC) utilizando el procedimiento del BS3 como se describe en “métodos”. La fosforilación en Tyr204 de ErK (E), en Thr180 / Tyr182 de p38 (F) y en Thr735 de ADAM17 (G) se analizaron por Western blot. Los niveles de fosforilación se normalizaron a la cantidad total de las proteínas respectivas (Erk, p38 y ADAM17) y al control de carga de proteínas (GAPDH o actina). Los valores son la media \pm SEM de 12 a 41 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de los de las ratas control se indican con un asterisco y los de las ratas hiperamonémicas se indican con una "a". * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$; a $p < 0,05$, aa $p < 0,01$, aaaa $p < 0,0001$. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de Turkey post hoc (en A, C, E, y F) y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba post hoc de Dunnett (en B, D y G).

La expresión en membrana de ADAM17 está modulado por la proteína quinasa PKC (Doedens y Black, 2000). Como se muestra en la Fig. 29 C y D, el bisindolil (bisindolilmaleimida II), un inhibidor de PKC, normaliza la expresión en membrana de TNFR1 y ADAM17 al $66\pm 17\%$ ($p < 0,01$) y $127\pm 18\%$ ($p < 0,0001$), respectivamente, reproduciendo los efectos del tratamiento con estriquina.

La expresión en membrana de ADAM17 puede ser modulada también por fosforilación en el residuo de treonina 735 mediada por la vía PKC-ERK / p38 (Soond *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2010). Por tanto, evaluamos si la estriquina modula la expresión en membrana de ADAM17 a través de esta vía. La hiperamonemia reduce la fosforilación de Erk en Tyr204 al $65\pm 9\%$ ($p < 0,05$) (Fig. 29 E), aumenta la fosforilación de p38 en los residuos Thr180/Tyr182 al $142\pm 9\%$ ($p < 0,001$) (Fig. 29 F), y de ADAM17 en Thr735 al $137\pm 11\%$ ($p < 0,01$) (Fig. 29 G) en comparación a las ratas control, y estos efectos no se revierten con estriquina manteniéndose los porcentajes en $57\pm 10\%$ ($p < 0,01$), $150\pm 9\%$ ($p < 0,01$) y $135\pm 13\%$ ($p < 0,05$) respectivamente.

Estos datos indican que la reducción de expresión en membrana de ADAM17 en ratas hiperamonémicas se debe a una mayor actividad de PKC, pero no está mediada por la vía ERK/p38-ADAM17-Thr735.

1.7. La estriquina normaliza el contenido nuclear de NF- κ B y los niveles de glutaminasa, TNF α , IL1 β y HMGB1 en las neuronas de Purkinje de ratas hiperamonémicas

Como hemos visto en el apartado anterior, el aumento de la expresión en membrana de TNFR1 en ratas con hiperamonemia crónica conduce a un aumento de la translocación nuclear de la subunidad p50 de NF- κ B y, como consecuencia, a un aumento de la expresión de TNF α , IL1 β , glutaminasa y HMGB1.

Analizamos por tanto si la reducción de la expresión en membrana de TNFR1 por estriquina disminuye la activación de la vía NF- κ B en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas. Como se muestra en la Fig. 30 A y E, el contenido nuclear de la subunidad p50 de NF- κ B en las neuronas de Purkinje aumenta al $1,3\pm 0,2\%$ ($p < 0,001$) del citosol en hiperamonemia en comparación a las ratas control ($0,6\pm 0,1\%$) y se normaliza al $0,5\pm 0,1\%$ ($p < 0,001$) por la estriquina.

La estriquina también normalizó el contenido de glutaminasa (Fig. 30 B y F), TNF α (Fig. 30 D y H), IL1 β (Fig. 31 A y C) y HMGB1 (Fig. 31 B y D) así como la cantidad de ARNm para TNF α (Fig. 30 C y G) en neuronas de Purkinje.

La hiperamonemia aumentó el contenido de glutaminasa a 83 ± 2 UI ($p < 0,05$) con respecto a las ratas control 75 ± 3 UI y la estriquina normalizó el contenido de glutaminasa a 67 ± 2 UI ($p < 0,0001$) (Fig. 30 B y F). La hiperamonemia también aumentó el contenido del ARNm de TNF α a 8 ± 1 UI ($p < 0,05$) con respecto a las ratas control (5 ± 1 UI) y la estriquina lo normaliza a 4 ± 1 UI ($p < 0,001$) (Fig. 30 C y G). La hiperamonemia aumentó el contenido de TNF α a 63 ± 2 UI ($p < 0,0001$) con respecto a las ratas control (42 ± 2 UI) y la estriquina

lo normaliza a 34 ± 2 UI ($p < 0,0001$) (Fig. 30 D y H). Por último, las ratas hiperamonémicas presentan un aumento del contenido de IL1 β a 90 ± 2 UI ($p < 0,001$) (Fig. 31 A y C) y HMGB1 68 ± 2 UI ($p < 0,05$) (Fig. 31 B y D) en neuronas de Purkinje en comparación con las ratas control (60 ± 2 UI y 60 ± 2 UI respectivamente). La estricnina normalizó el contenido de IL1 β y HMGB1 a 60 ± 1 UI ($p < 0,0001$) y 53 ± 3 UI ($p < 0,0001$) respectivamente.

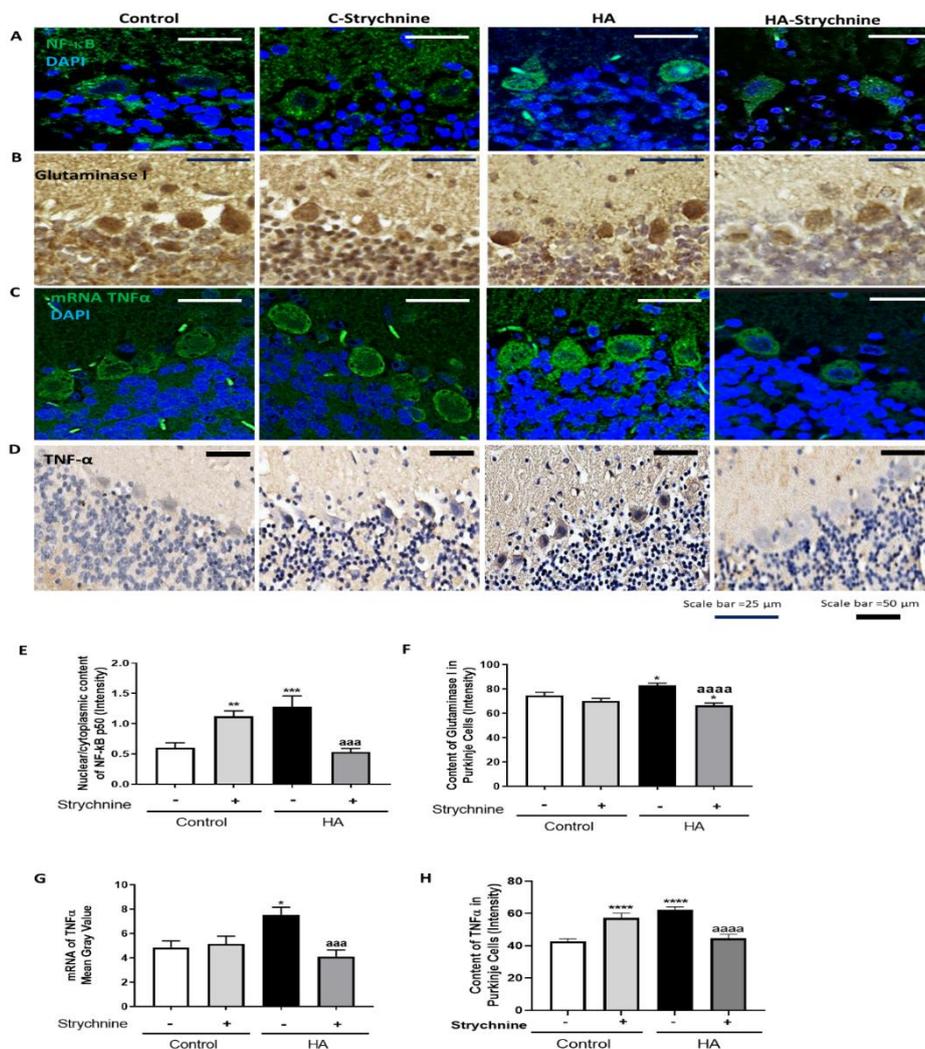


Figura 30. La estricnina normaliza el contenido nuclear de NF-κB y los niveles de glutaminasa, TNF α y mRNA de TNF α en neuronas de Purkinje de ratas hiperamonémicas. La inmunofluorescencia se realizó utilizando anti-NF-κB (A) y sonda del mRNA de TNF α (C). La inmunohistoquímica se realizó como se indica en métodos con tinción DAB usando anticuerpos contra glutaminasa (B) y TNF α (D). Se muestran imágenes representativas. La relación contenido nuclear/citoplásmico de NF-κB (E), el contenido de glutaminasa (F), mRNA de TNF α (G) y TNF α (H) se cuantificó en neuronas de Purkinje como se describe en "Métodos". Los valores son la media \pm SEM de 6-8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con un asterisco y los de las ratas hiperamonémicas se indican con una "a". * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; aaa $p < 0,001$, aaaa $p < 0,0001$. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de Turkey post hoc.

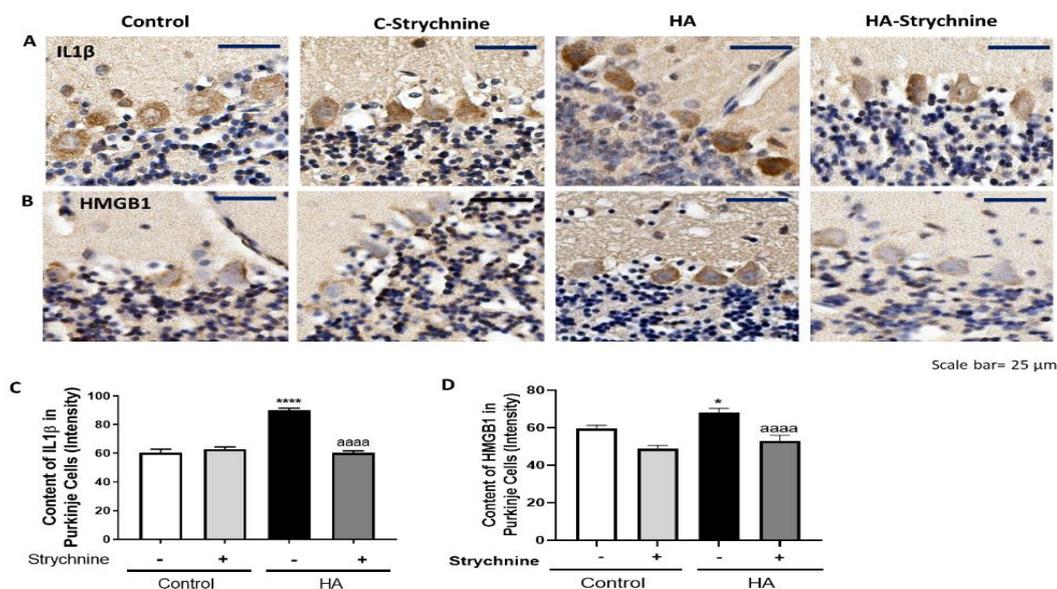


Figura 31. La estricnina normaliza los niveles de IL1β y HMGB1 en las neuronas de Purkinje de ratas hiperamonémicas. La inmunohistoquímica se realizó como se indica en "Métodos" con tinción DAB usando anticuerpos contra IL1β (A) y HMGB1 (B). Se muestran imágenes representativas. El contenido de IL1β (C) y HMGB1 (D) se cuantificó en neuronas de Purkinje como se describe en "Métodos". Los valores son la media ± SEM de 6-8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con un asterisco y los de las ratas hiperamonémicas se indican con una "a". * p < 0,05, **** p < 0,0001; aaaa p < 0,0001. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de Turkey post hoc.

Se ha demostrado que el aumento de la translocación nuclear de NF-κB aumenta la expresión de HMGB1 en las neuronas, lo que induce la activación de la microglía (Zou y Crews, 2014; Crews y Vetreno, 2016). En las neuronas de Purkinje, la intensidad de la tinción de HMGB1 fue mayor en ratas hiperamonémicas que en ratas control y la estricnina lo normalizó (Fig. 31 B y D). Esto indica que la estricnina podría estar reduciendo la activación de la microglía al reducir la expresión de HMGB1 en las neuronas de Purkinje.

1.8. La estricnina reduce la concentración extracelular de glutamato y GABA y la expresión en membrana de GAT3 en el cerebelo de ratas hiperamonémicas

El aumento de glutaminasa en hiperamonemia conduce a un aumento de la producción y de los niveles extracelulares de glutamato lo que resulta en niveles aumentados de glutamato extracelular y de captación de glutamato y Na⁺ por los astrocitos activados al aumentar la función de sus transportadores. Esto altera el gradiente de Na⁺ y, como consecuencia, en estos astrocitos activados, la función del transportador GABA GAT3 se invierte y, en lugar de captar GABA, libera GABA al medio extracelular, lo que produce un aumento de los niveles de GABA extracelular en cerebelo de ratas hiperamonémicas

que, a su vez, induce la incoordinación motora. (Fig. 11, página 24) (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

Evaluamos los efectos del tratamiento in vivo con estricnina sobre el glutamato y GABA extracelular mediante microdiálisis in vivo en ratas en libre movimiento.

Las ratas hiperamonémicas muestran un aumento de glutamato y GABA extracelular en el cerebelo en comparación con los controles y la administración de estricnina a través de la sonda de microdiálisis normaliza el glutamato (Fig. 32 A) y el GABA extracelular (Fig. 32 B) en ratas hiperamonémicas.

Las concentraciones extracelulares de glutamato y GABA se modulan principalmente por la recaptación por sus transportadores. Por tanto, analizamos los efectos de la hiperamonemia y de la estricnina sobre la expresión en membrana de los transportadores de glutamato GLAST y GLT1 y del transportador de GABA GAT3 en cortes de cerebelo ex vivo.

La hiperamonemia redujo la expresión en membrana de GLAST y GLT-1 al $66 \pm 6\%$ ($p < 0,01$, Fig. 32 C) y $38 \pm 6\%$ ($p < 0,0001$, Fig. 32 D) de las ratas control, respectivamente. La estricnina no restaura la expresión en membrana de estos transportadores ($56 \pm 18\%$ $p < 0,05$ y $36 \pm 5\%$ $p < 0,0001$ respectivamente). La hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de GAT3 ($151 \pm 10\%$ $p < 0,05$, Fig. 32 E). El tratamiento con estricnina la normaliza en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas ($77 \pm 11\%$ $p < 0,05$ Fig. 32 E).

Estos datos demuestran que la neurotransmisión glicinérgica modula la neuroinflamación y la activación de microglía y astrocitos. Esto abre nuevas posibilidades para reducir la neuroinflamación actuando, por ejemplo, sobre los receptores de glicina. Esto apoya la idea de que el aumento de la activación del receptor de glicina en hiperamonemia se debería a la disminución de la inhibición tónica por los menores niveles de GMPc extracelular y puede normalizarse incrementándola.

Estos resultados son idénticos a los obtenidos con el tratamiento con el GMPc extracelular y muestran que el aumento de la neurotransmisión glicinérgica contribuye a la neuroinflamación en la hiperamonemia. Esto indica que el GMPc extracelular, como la estricnina, podría estar reduciendo la neuroinflamación y la activación de microglía y astrocitos mediante la inhibición del receptor de glicina y la vía intracelular asociada a TNFR1 y por la normalización de HMGB1 en ratas hiperamonémicas.

CAPÍTULO 1: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

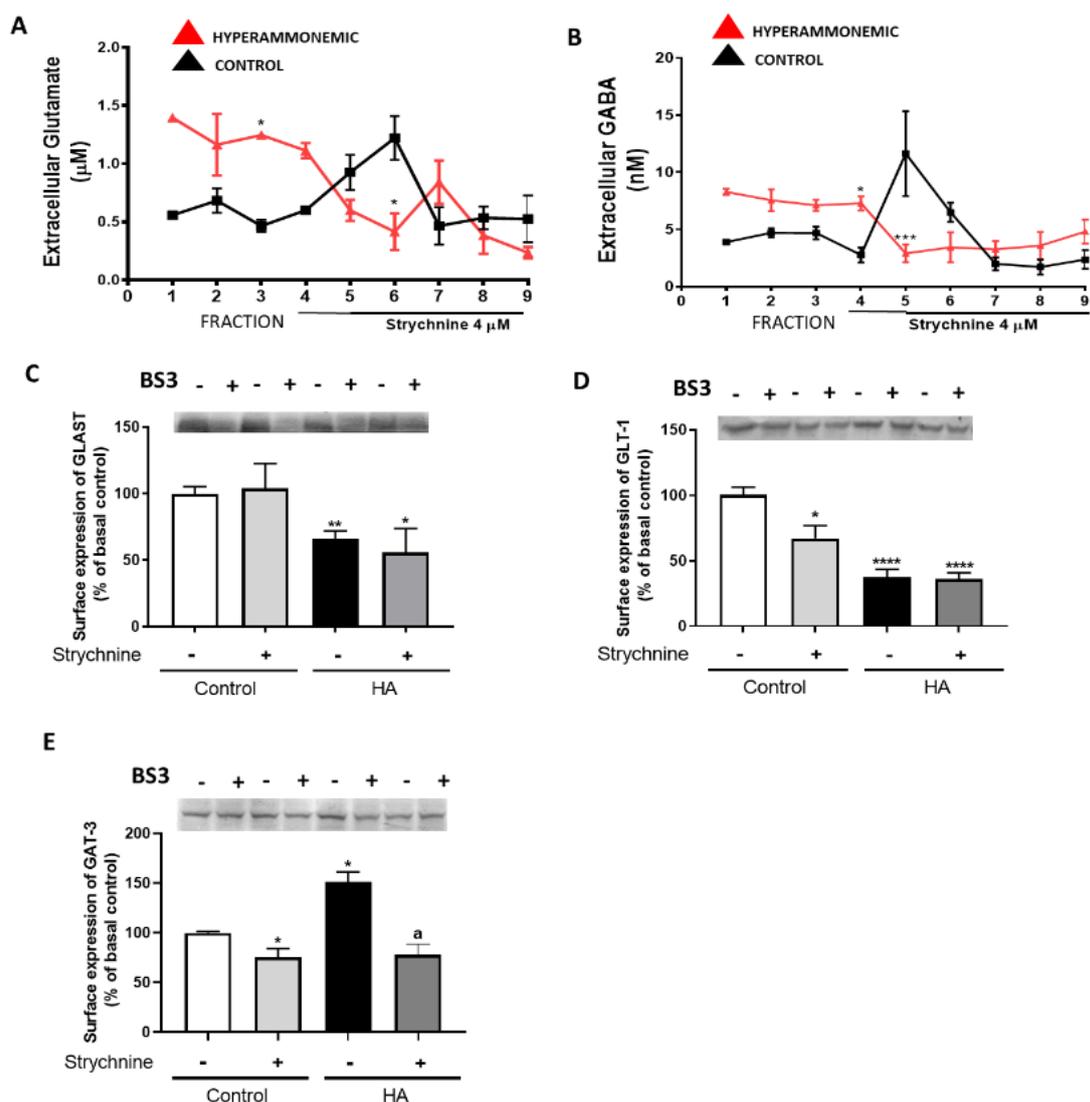


Figura 32. La estriquina reduce la concentración extracelular de glutamato y GABA y la expresión en membrana de GAT3 en el cerebelo de ratas hiperamonémicas. Los niveles extracelulares de glutamato (A) y GABA (B) se midieron en cerebelo mediante microdiálisis in vivo como se indica en "Métodos". Se administró estriquina ($4 \mu\text{M}$), un antagonista del receptor de glicina (fracción 4-9) a través de la sonda de microdiálisis en cerebelo in vivo de ratas control e hiperamonémicas y se midieron el glutamato y el GABA extracelular. Expresión en membrana de transportadores de glutamato, GLAST (C) y GLT-1 (D), y del transportador de GABA GAT3 (E) se analizaron usando el procedimiento del BS3, como se describe en "Métodos", en cortes de ratas control e hiperamonémicas (HA) tratadas o no con estriquina. Los valores son la media \pm SEM de 7 ratas por grupo en A-B y de 8-25 ratas por grupo en C-E. Los valores significativamente diferentes de los de las ratas control se indican con un asterisco y los de las ratas hiperamonémicas se indican con una "a". * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; a $p < 0,05$. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de Turkey post hoc (en A-D) y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba post hoc de Dunnett (en E).

DISCUSIÓN

Discutimos a continuación los mecanismos identificados y las posibles implicaciones patológicas y terapéuticas de estos hallazgos. Los mecanismos por los que la hiperamonemia induce neuroinflamación y activación de la microglía se resumen en la Fig. 33. También se muestran los efectos de la inhibición del receptor de glicina con GMPc extracelular o con estriquina sobre estos mecanismos (Fig. 33 y 34).

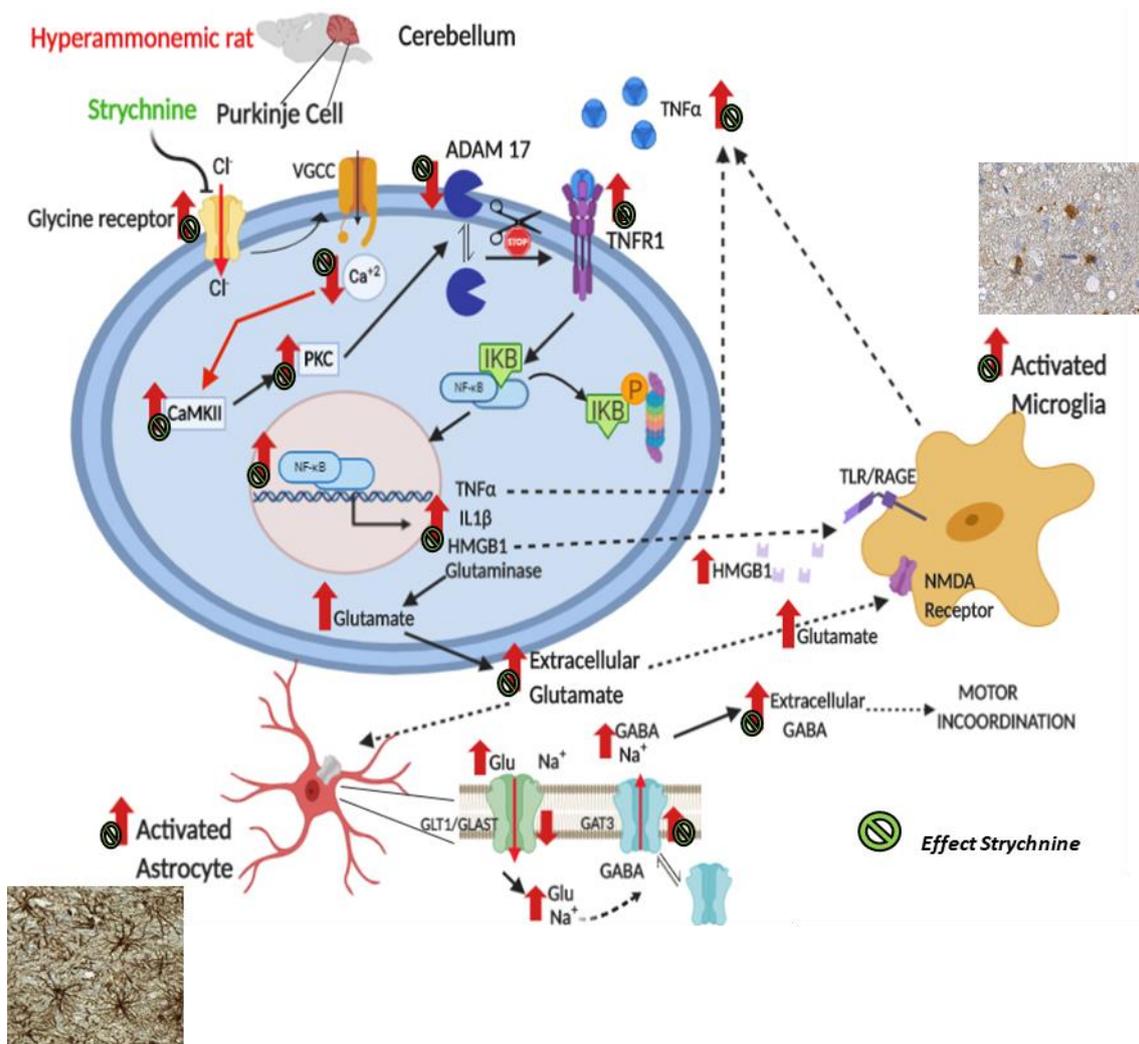


Figura 33. Vía propuesta por la cual el bloqueo de los receptores de glicina reduce la neuroinflamación y restaura la neurotransmisión en el cerebelo de ratas hiperamonémicas a través de una vía ADAM17-TNFR1- NF-κB en las neuronas de Purkinje. Los receptores de glicina se expresan principalmente en las neuronas de Purkinje. En ratas hiperamonémicas, el aumento de la neurotransmisión glicinérgica conduce a una reducción de la expresión en membrana de ADAM17, lo que da como resultado una mayor expresión en superficie y activación de TNFR1 y de la vía NF-κB asociada. Esto aumenta la expresión de TNFα, IL-1β, HMGB1 y glutaminasa en las neuronas de Purkinje. El aumento de la actividad de la glutaminasa conduce a un aumento del glutamato extracelular, que aumenta el GABA extracelular. El aumento de glutamato extracelular y de HMGB1 potencia la activación microglial. Los efectos de la hiperamonemia se indican mediante flechas rojas (↑). Los efectos de la estriquina se indican mediante el símbolo verde (⊖).

hiperamonemia se debería a una mayor neurotransmisión glicinérgica y una reducción de la expresión en membrana de ADAM17 lo que reduce la liberación de TNFR1 y aumenta el TNFR1 en membrana.

El análisis de inmunofluorescencia muestra que los receptores de glicina se expresan principalmente en neuronas de Purkinje, con una expresión comparativamente pobre o nula en microglía y astrocitos. Por tanto, estudiamos los mecanismos en las neuronas de Purkinje. La hiperamonemia reduce ADAM17 en membrana al aumentar la actividad de PKC, como indica el hecho de que la inhibición de PKC normaliza los niveles en membrana de ADAM17 y TNFR1.

Un mecanismo por el cual la hiperamonemia aumenta la actividad de la PKC en el cerebelo ya se ha descrito y está mediado por el aumento de la actividad de CaMKII que, a su vez, indirectamente, aumenta la actividad de la PKC (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a). El aumento de la actividad de CaMKII en hiperamonemia se debe al aumento de la fosforilación en el residuo Thr286, que está modulado bifásicamente por la concentración de calcio (Graupner y Brunel, 2007). En hiperamonemia, los niveles basales de calcio en las neuronas de Purkinje se reducen, lo que aumenta la fosforilación y la actividad de CaMKII (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a). El bloqueo de los receptores de glicina en ratas hiperamonémicas induce un aumento de calcio en las neuronas de Purkinje mediado por los canales de calcio dependientes de voltaje que reduce la fosforilación y la actividad de CaMKII (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a), reduciendo así la actividad de PKC (Fig. 33).

Un mecanismo por el cual la PKC modula la expresión en membrana de ADAM17 es mediante la fosforilación de su residuo treonina 735 a través de la vía PKC-ERK/p38 (Soond *et al.*, 2005; Xu y Derynck, 2010). Sin embargo, los resultados muestran que este mecanismo no es responsable de los efectos de la hiperamonemia en ADAM17 ya que la MAPK p38 aumenta en hiperamonemia, pero este aumento no revierte con el tratamiento con estricnina. Otro mecanismo por el cual la PKC puede reducir la expresión en membrana de ADAM17 es aumentando su liberación en exosomas. Esto se ha demostrado en células estimuladas con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), un activador de PKC o lipopolisacárido (LPS) (Groth *et al.*, 2016). Es posible que un mecanismo similar contribuya a la reducción de los niveles de ADAM17 en membrana en el cerebelo de ratas hiperamonémicas. Esta posibilidad viene apoyada por otros estudios del grupo que muestran un aumento de ADAM17 en los exosomas aislados de plasma de ratas hiperamonémicas en comparación con los de las ratas control.

En ratas hiperamonémicas el bloqueo de los receptores de glicina reduce la fosforilación y la actividad de CaMKII (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a), reduciendo así la actividad de la PKC y normalizando los niveles de ADAM17 y TNFR1 en membrana (Fig. 29).

En ratas con hiperamonemia crónica, el aumento de la expresión de TNFR1 en membrana conduce a un aumento de la translocación nuclear de NF- κ B en microglía y, como consecuencia, a un aumento de la expresión de TNF α , IL1 β y glutaminasa (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a; Balzano *et al.*, 2020b). Ahora demostramos que la activación de esta vía ocurre especialmente en las neuronas de Purkinje, aumentando los niveles de TNF α ,

CAPÍTULO 1: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IL1 β , glutaminasa y HMGB1 en las mismas (Fig. 31 B y D). Todos estos pasos se normalizan al bloquear los receptores de glicina con GMPc extracelular o estricnina, indicando que son una consecuencia del aumento de la neurotransmisión glicinérgica en hiperamonemia (Fig. 33 y 34).

El aumento de NF- κ B en el núcleo aumenta el contenido en las neuronas de Purkinje de TNF α , IL-1 β , glutaminasa y HMGB1 (Figs. 30 y 31). Los niveles aumentados de glutaminasa producen más glutamato, lo que aumenta los niveles de glutamato extracelular y la captación de glutamato por los astrocitos activados.

El aumento de glutaminasa da como resultado una mayor formación de glutamato. Se ha descrito un aumento de la formación de glutamato inducida por TNF α a través del aumento de la expresión de glutaminasa en varias situaciones patológicas (Tilleux *et al.*, 2008; Lehmann *et al.*, 2009; Takaki *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2013). El aumento de glutamato inducido por TNF α se ha propuesto como el mecanismo central por el cual el exceso de TNF α daña la función y la estructura cerebral induciendo excitotoxicidad en una amplia gama de enfermedades neurodegenerativas, incluidas las enfermedades de Parkinson, Huntington y Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica o encefalopatía séptica (Clark *et al.*, 2016). El aumento de glutamato inducido por TNF α también se ha propuesto como la diana terapéutica más lógica en estas situaciones (Clark *et al.*, 2016). El aumento de la expresión de glutaminasa y los niveles de glutamato inducidos por TNF α se producen tanto en la microglía (Takeuchi *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2012) como en las neuronas (Pais *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2013). Los resultados presentados aquí muestran que en el cerebelo de ratas hiperamonémicas también hay un aumento inducido por TNF α de la expresión de glutaminasa en neuronas de Purkinje y de glutamato extracelular. Se ha descrito un aumento similar en la microglía del cerebelo de ratas hiperamonémicas (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a). Sin embargo, la neurotransmisión glicinérgica modularía esta vía principalmente en neuronas porque el receptor de glicina se expresa fuertemente en las neuronas de Purkinje, pero no en la microglía. La inhibición de esta vía y la reducción asociada de los niveles de glutaminasa, TNF α , IL-1 β y HMGB1 en las neuronas de Purkinje de ratas hiperamonémicas por la estricnina respalda esta idea.

En algunas de las situaciones patológicas mencionadas arriba en las que los niveles de TNF α y glutamato extracelular alcanzan niveles elevados, esta vía puede conducir a excitotoxicidad y degeneración neuronal y al deterioro cognitivo asociado (Clark *et al.*, 2016). En el modelo de hiperamonemia crónica utilizado en esta tesis, el aumento de TNF α y glutamato extracelular en el cerebelo parece ser más leve y no alcanza niveles lo suficientemente altos como para inducir la muerte neuronal. Sin embargo, son suficientes para alterar la neurotransmisión, la función cognitiva y la coordinación motora.

El exceso de glutamato en el espacio extracelular debe eliminarse para proteger de la excitotoxicidad del glutamato y mantener la transmisión sináptica normal. El glutamato extracelular es eliminado principalmente por los astrocitos a través de los transportadores de glutamato GLAST y GLT-1 (Lehre *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2004; Furness *et al.*, 2008; Petr *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2019). En el cerebelo de ratas hiperamonémicas, el aumento

de los niveles de glutamato extracelular daría como resultado un mayor transporte a través de los transportadores de glutamato en los astrocitos activados. Estos transportadores co-transportan Na^+ aumentando así el Na^+ intracelular. Se ha descrito que este proceso conduce a un cambio en el gradiente de Na^+ entre el interior y el exterior de la membrana celular que a su vez conduce a la reversión de la función del transportador de GABA GAT-3 que, en lugar de captar GABA, libera GABA al fluido extracelular lo que provocaría un aumento de los niveles de GABA extracelulares (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a). El hecho de que el bloqueo de los transportadores de glutamato GLT-1 y GLAST en experimentos de microdiálisis in vivo redujo el GABA extracelular en el cerebelo de ratas hiperamonémicas apoya que el aumento del transporte de glutamato en astrocitos activados sería el responsable de que aumente el GABA extracelular (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a). De acuerdo con esto, se ha demostrado que en los astrocitos activados la función del transportador de GAT-3 de GABA se invierte y, en lugar de tomar GABA en el astrocito, libera GABA, aumentando así los niveles extracelulares de GABA (Wu *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2018b).

Para confirmar que el bloqueo de los receptores de glicina normaliza el glutamato y el GABA extracelular en el cerebelo de ratas hiperamonémicas in vivo, analizamos estos neurotransmisores mediante microdiálisis en el cerebelo de ratas que se mueven libremente. Las concentraciones extracelulares de glutamato y GABA aumentaron en ratas hiperamonémicas. El bloqueo de los receptores de glicina mediante la administración de estricnina a través de la sonda de microdiálisis redujo el glutamato y el GABA extracelular a niveles normales, apoyando así que el proceso anterior (Fig. 33) también está ocurriendo en el cerebelo in vivo.

Todos estos cambios en las neuronas de Purkinje se transmiten a la microglía para mantenerlas activadas a través de dos mecanismos principales. Un mediador sintetizado en las neuronas de Purkinje que se libera y activa la microglía es HMGB1 y otro es el propio glutamato (Figs. 31 D y 32 A, respectivamente).

La HMGB1 se libera de las neuronas en situaciones asociadas con neuroinflamación, como lesión isquémica, lesión traumática, hemorragia intracerebral y lesión de la médula espinal (Wang *et al.*, 2020). La HMGB1 liberada por las neuronas conduce a la activación de la microglía uniéndose al receptor TLR4 (Kim *et al.*, 2006; Zou y Crews, 2014; Crews y Vetreno, 2016). En ratas hiperamonémicas, la liberación de HMGB1 de las neuronas de Purkinje contribuiría a mantener la activación de la microglía mediante un mecanismo similar. Además, la estricnina reduciría la activación de la microglía al reducir la expresión y liberación de HMGB1 en las neuronas de Purkinje.

Otro mediador liberado por las neuronas de Purkinje en ratas hiperamonémicas que contribuiría a la activación de la microglía es el glutamato en sí. La microglía expresa la mayoría de los tipos de receptores de glutamato, incluidos los receptores NMDA. La activación de los receptores NMDA por el glutamato en la microglía conduce a su activación con adquisición de una morfología ameboide y la liberación de mediadores pro-inflamatorios que promueven la polarización microglial (Kaindl *et al.*, 2012;

Raghunatha *et al.*, 2020). El glutamato liberado por las neuronas de Purkinje en ratas hiperamonémicas también contribuiría a mantener la activación microglial. La reducción de esta liberación de glutamato por la estricnina contribuiría a reducir la activación de la microglía.

En esta tesis también se muestra que la adición de GMPc extracelular, que no atraviesa la membrana celular, también previene todos los procesos desencadenados por la activación de los receptores de glicina en las neuronas de Purkinje de ratas hiperamonémicas (Fig. 34). El GMPc extracelular restaura la expresión en membrana de ADAM17 y TNFR1, normaliza la expresión nuclear de NF- κ B y la expresión de glutaminasa, IL-1 β , TNF α y HMGB1 en neuronas de Purkinje y la activación de microglía y astrocitos. Ya se ha demostrado que el GMPc extracelular también normaliza GAT-3 y los niveles extracelulares de glutamato y GABA en el cerebelo de ratas hiperamonémicas y restaura la coordinación motora in vivo (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

Estos resultados apoyan la idea de que el aumento de la neurotransmisión glicinérgica (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016c) sería una consecuencia de la disminución de los niveles extracelulares de GMPc en el cerebelo de ratas hiperamonémicas, lo que disminuiría la inhibición tónica del receptor de glicina por el GMPc extracelular resultando en una mayor activación del receptor (Erceg *et al.*, 2005b; El-Mlili *et al.*, 2008; Cauli *et al.*, 2009; Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a).

Se ha demostrado que el aumento de los niveles de GMPc mediante el uso de inhibidores de las fosfodiesterasas (PDE) que la degradan (principalmente PDE5) previene o revierte la neuroinflamación en modelos de diferentes patologías como encefalopatía hepática, hiperamonemia, isquemia focal, esclerosis múltiple, Huntington o Alzheimer (Pifarre *et al.*, 2011; Saavedra *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013a; Hernandez-Rabaza *et al.*, 2015; Peixoto, Nunes y Garcia-Osta, 2015; Moretti *et al.*, 2016; Agusti *et al.*, 2017). El aumento sólo de GMPc extracelular también revierte la neuroinflamación en modelos de hiperamonemia crónica y encefalopatía hepática (Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a, 2018a). Esta tesis también identifica un mecanismo por el cual estos efectos protectores podrían estar ocurriendo, al reducir el aumento de activación de los receptores de glicina y la activación de la vía asociada TNFR1-NF- κ B en las neuronas de Purkinje.

En los datos anteriores nos llama la atención que aumente TNF α en las neuronas de Purkinje en el cerebelo de ratas hiperamonémicas, cuando lo habitual es que TNF α se induzca en las células gliales. Se sabe que la síntesis de TNF α se induce en las neuronas en ciertas situaciones patológicas (Liu *et al.*, 1994; Schäfers *et al.*, 2003; Ohtori *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2019). Sin embargo, los mecanismos implicados no se conocen bien (Balzano *et al.*, 2020b). Por estas razones, estudiamos en qué tipos celulares se induce el TNF α a distintos tiempos de hiperamonemia y el papel de la inflamación periférica en este proceso en el cerebelo de ratas hiperamonémicas.

CAPÍTULO 2: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

1. LA HIPERAMONEMIA SOSTENIDA, PERO NO A CORTO PLAZO, INDUCE TNF α EN LAS NEURONAS DE PURKINJE EN RATAS HIPERAMONÉMICAS

Los pacientes con cirrosis hepática pueden desarrollar EHM con deterioro cognitivo leve, déficit de atención, incoordinación motora y enlentecimiento psicomotor. Las ratas con hiperamonemia crónica presentan alteraciones neurológicas similares, incluyendo incoordinación motora, mediadas por la inflamación periférica y la neuroinflamación. La incoordinación motora se debe al aumento de los niveles de TNF α y a la activación de su receptor TNFR1 en el cerebelo.

Uno de los objetivos de la tesis es evaluar si la inflamación periférica es responsable de la inducción de TNF α en ratas hiperamonémicas, el tipo de células en las que aumenta el TNF α , si este aumento está asociado con un aumento de la activación de NF- κ B y TNFR1 y el curso temporal de la inducción de TNF α .

Para corroborar que los efectos encontrados en el modelo animal de hiperamonemia crónica también ocurren en pacientes con cirrosis hepática también analizamos si se induce TNF α en las neuronas de Purkinje de pacientes que mueren con cirrosis hepática. Analizamos el nivel de ARNm de TNF α y el nivel y la localización subcelular de NF- κ B en microglía, astrocitos y neuronas de Purkinje en el cerebelo después de 1, 2 y 4 semanas de hiperamonemia.

Evaluamos si la prevención de la inflamación periférica mediante el tratamiento periférico con un anticuerpo anti-TNF α previene la inducción de TNF α en cerebelo de ratas hiperamonémicas.

Por último, para evaluar la contribución de la activación del receptor TNFR1, analizamos si la inducción de TNF α se revierte por R7050, un compuesto que inhibe la vía TNFR1-NF- κ B en cortes de cerebelo ex vivo.

1.1. El tratamiento periférico con infliximab previene la neuroinflamación en cerebelo de las ratas hiperamonémicas

El diseño experimental de esta parte de la tesis se resume en la Figura 35.

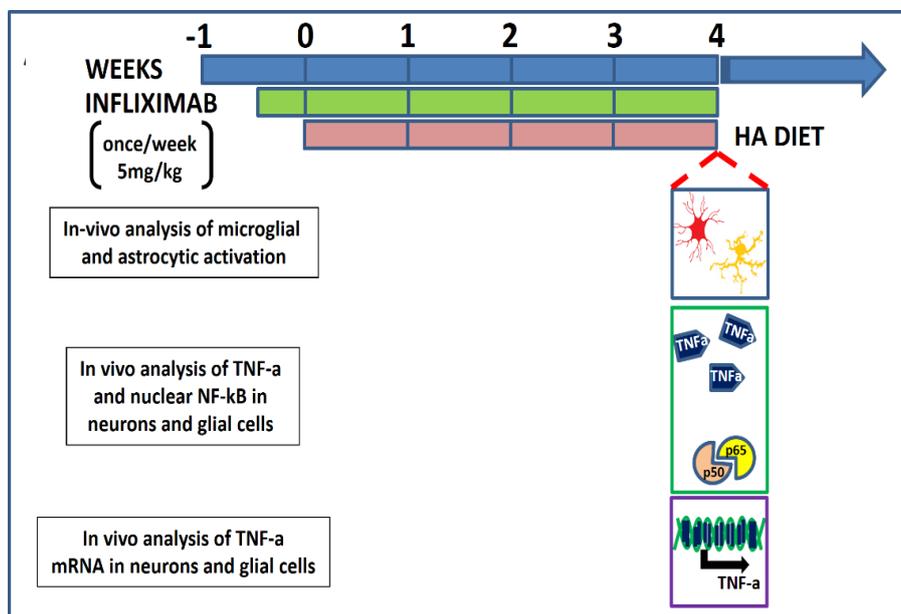


Figura 35. La hiperamonemia sostenida induce $TNF\alpha$ en las neuronas de Purkinje que se previene con el tratamiento con infliximab. Diseño experimental del estudio de esta parte de la tesis. Para evaluar el tipo de células en las que aumenta el $TNF\alpha$ en cerebelo, las ratas se alimentaron con una dieta rica en amonio durante 4 semanas y se perfundieron para el análisis inmunohistoquímico de la activación de microglía y astrocitos, la expresión de $TNF\alpha$ y $NF-\kappa B$ nuclear y la expresión del ARNm de $TNF\alpha$ en neuronas de Purkinje y células gliales. Para evaluar si la inflamación periférica es responsable de la inducción de la neuroinflamación y de $TNF\alpha$, se administró a las ratas una inyección intravenosa de infliximab una vez por semana (5 mg/kg) comenzando 2 días antes de la administración de la dieta con amonio.

Después de 4 semanas de hiperamonemia, las ratas presentan activación de la microglía con disminuciones en la longitud y número de procesos y un aumento en el tamaño del cuerpo celular (Fig. 36 A). Estos cambios morfológicos se reflejaron en una reducción del perímetro ($164 \pm 1 \mu m$, $p < 0,001$) en comparación con las ratas control ($196 \pm 6 \mu m$) (Fig. 36 D). El tratamiento con infliximab previno por completo la activación de la microglía. El perímetro de la microglía en ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab fue de $186 \pm 5 \mu m$, similar al de las ratas control tratadas con infliximab ($193 \pm 6 \mu m$) y las ratas control no tratadas (Fig. 36 D).

Análisis de neuroinflamación a 4 semanas de hiperamonemia

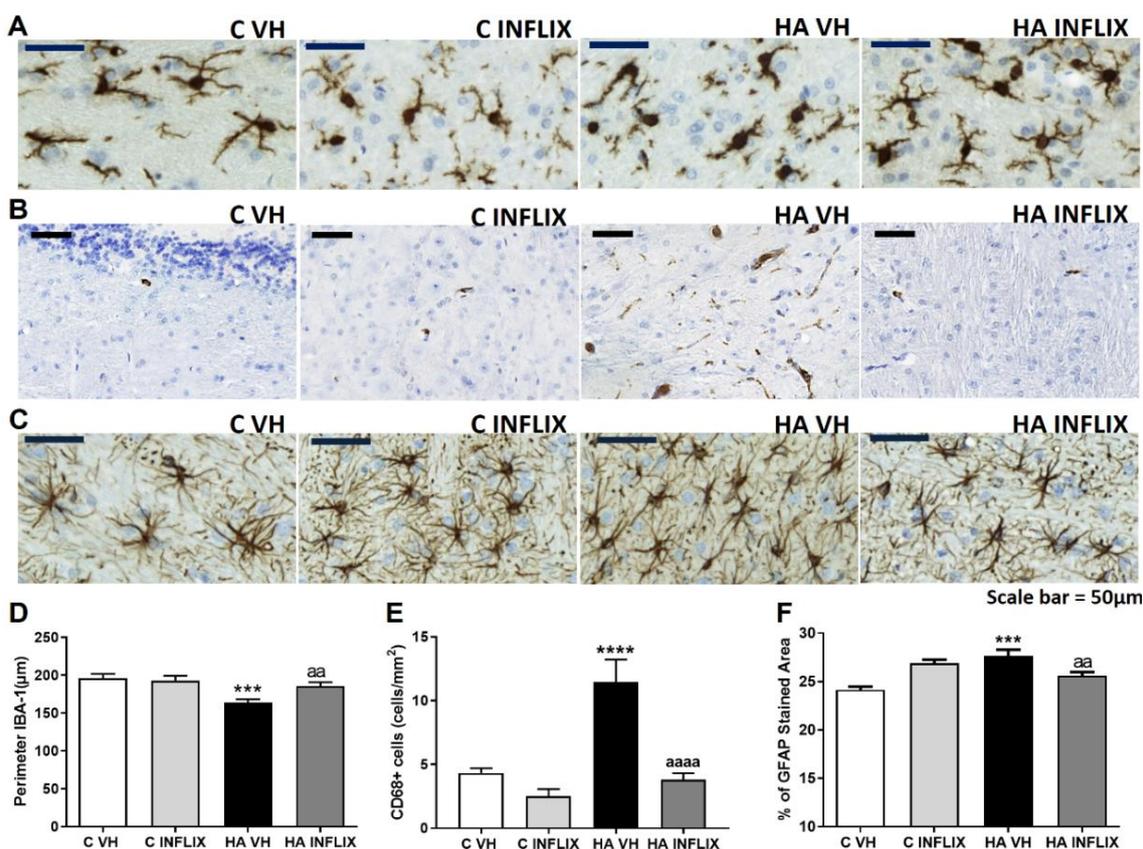


Figura 36. El infliximab previene la activación microglial y de astrocitos en la sustancia blanca del cerebelo de ratas hiperamonémicas. Se muestran imágenes representativas de microglía (A, B) y activación de astrocitos (C) en la sustancia blanca del cerebelo. Se analizó el perímetro de las células microgliales (D), las células que expresan CD68 (E) y el área teñida con GFAP (F). Los valores son la media \pm SEM de 6-8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de los de las ratas control se indican con asteriscos, y los valores significativamente diferentes de las ratas HA se indican con a. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, aa $p < 0,01$, aaaa $p < 0,0001$. Barra de escala = 50 μ m. C VH = ratas control tratadas con vehículo, C INFLIX = ratas control tratadas con infliximab, HA VH = ratas hiperamonémicas tratadas con vehículo, HA INFLIX = ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab.

La activación de la microglía también se analizó evaluando los efectos de la hiperamonemia sobre CD68, un marcador específico de la microglía activada (Fig. 36 B). La hiperamonemia aumentó el número de células teñidas con CD68 en la sustancia blanca a 11 ± 2 células/mm² ($p < 0,0001$) en comparación con 4 ± 1 células/mm² en ratas control (Fig. 36 E). El tratamiento con infliximab previno la activación de la microglía, reduciendo el número de células que expresan CD68 a 4 ± 1 células/mm², que fue similar al de las ratas control (Fig. 36 E).

La hiperamonemia también induce activación de astrocitos en la sustancia blanca del cerebelo, que también se previno mediante el tratamiento con infliximab (Fig. 36 C). El área teñida con GFAP aumentó en ratas hiperamonémicas ($28 \pm 1\%$, $p < 0,001$) en comparación con las ratas control ($24 \pm 1\%$) (Fig. 36 F). El tratamiento periférico con

CAPÍTULO 2: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

infliximab también redujo la activación de astrocitos en ratas hiperamonémicas; hubo menos tinción de GFAP ($26\pm 1\%$) en la sustancia blanca de estas ratas que en las ratas no tratadas (Fig. 36 F).

A continuación, analizamos los efectos de la hiperamonemia y el tratamiento con infliximab sobre la expresión de $TNF\alpha$ en la sustancia blanca mediante inmunohistoquímica (Fig. 37). El número de células que expresan $TNF\alpha$ aumentó a 233 ± 12 células/ mm^2 , $p < 0,001$ en ratas hiperamonémicas en comparación con 171 ± 4 células/ mm^2 en ratas control (Fig. 37 A). El tratamiento con infliximab previno completamente este aumento (141 ± 4 células/ mm^2) (Fig. 37 A, D). Para evaluar si este aumento se produce en microglía o astrocitos, se realizó una doble tinción de fluorescencia para $TNF\alpha$ e Iba-1 (Fig. 38 A) o GFAP (Fig. 37 B). Los aumentos de $TNF\alpha$ en la sustancia blanca se observaron en un grado similar tanto en microglía (Fig. 38 A, flecha blanca; $p < 0,05$) como en astrocitos (Fig. 38 B, flecha naranja; $p < 0,05$) (Fig. 38 C).

Análisis de la expresión de $TNF\alpha$ a 4 semanas de hiperamonemia

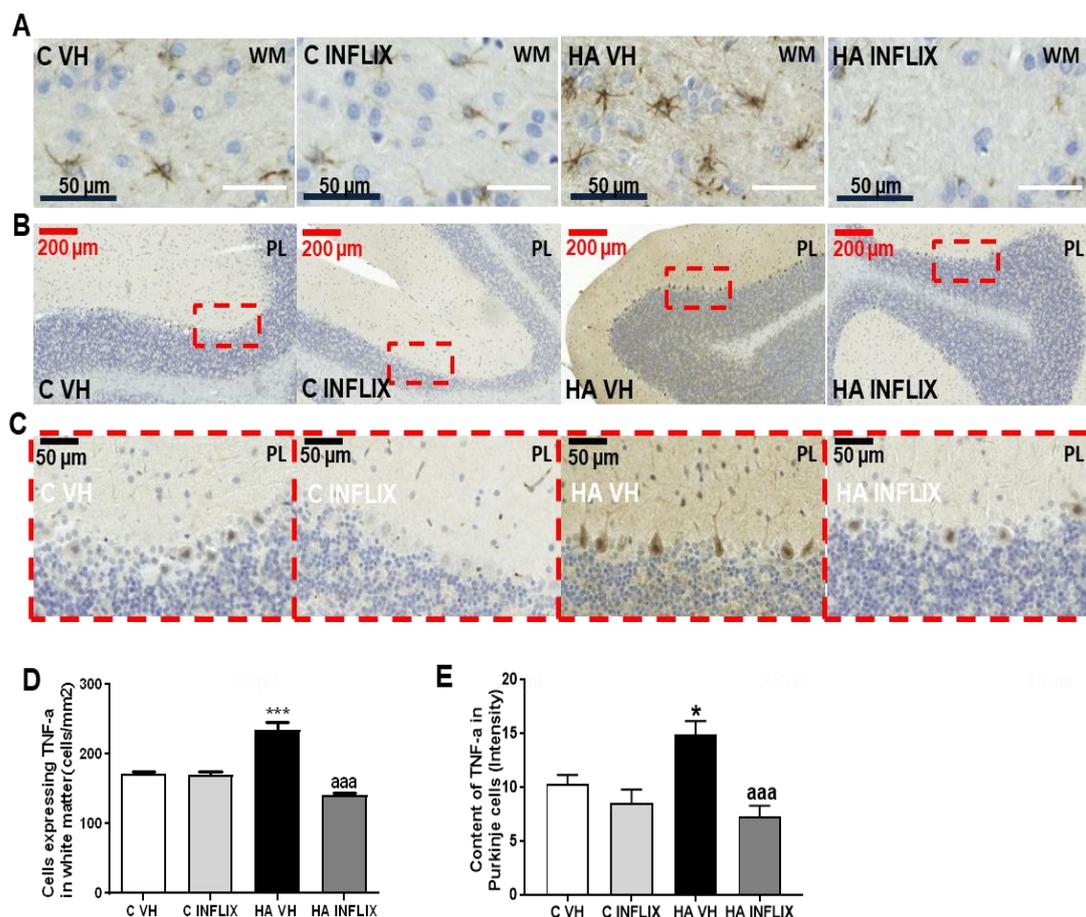


Figura 37. El contenido de $TNF\alpha$ aumenta en la sustancia blanca y en neuronas de Purkinje a las 4 semanas de hiperamonemia y se normaliza con infliximab. Se muestran imágenes representativas de la tinción de $TNF\alpha$ en la sustancia blanca (A) y en las neuronas de Purkinje (B, C), y los datos cuantificados de células que expresan $TNF\alpha$ y su contenido se muestran en D y E. Los valores son la media \pm SEM de 6-8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes

de las ratas control se indican con asteriscos, y los valores significativamente diferentes de las ratas HA VH se indican con a. Un símbolo indica $p < 0,05$; dos símbolos $p < 0,01$ y tres símbolos $p < 0,001$. C VH = ratas control tratadas con vehículo; C INFLIX = ratas control tratadas con infliximab; HA VH = ratas hiperamonémicas tratadas con vehículo; HA INFLIX = ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab.

Análisis de la expresión de TNF α a 4 semanas de hiperamonemia

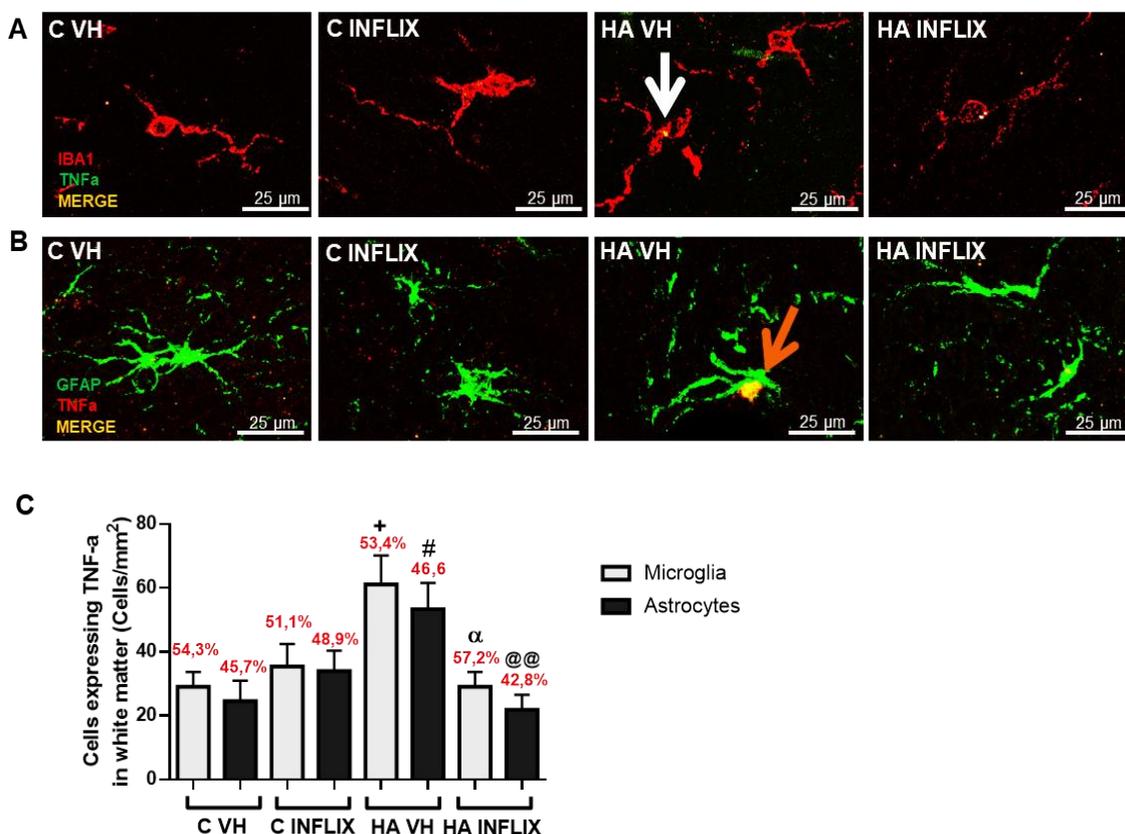


Figura 38. El contenido de TNF α aumenta en microglía y astrocitos a las 4 semanas de hiperamonemia y se normaliza por el tratamiento con infliximab. Se muestran imágenes representativas en la sustancia blanca de la expresión de TNF α en células gliales (A y B) y los datos cuantificados en C. Se realizó doble inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra TNF α e Iba-1 (A) o GFAP (B), y se determinó de las células gliales que expresan TNF α en la sustancia blanca qué porcentaje son microglía y astrocitos (C). Los valores son la media \pm SEM de 6-8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, y los valores significativamente diferentes de las ratas HA VH se indican con a. + Indica diferencia significativa entre microglía que expresa TNF α en ratas HA VH frente a microglía que expresa TNF α en ratas C VH, # indica diferencia significativa entre astrocitos que expresan TNF α en ratas HA VH frente a astrocitos que expresan TNF α en ratas C VH, α indica diferencia significativa entre a microglía que expresan TNF α en ratas HA VH frente a microglía que expresan TNF α en ratas HA INFLIX, y @@ indica diferencia significativa entre astrocitos que expresan TNF α en ratas HA VH frente a astrocitos que expresan TNF α en ratas HA INFLIX. Un símbolo indica $p < 0,05$; dos símbolos indican $p < 0,01$ y tres símbolos indican $p < 0,001$. C VH = ratas control tratadas con vehículo; C INFLIX = ratas control tratadas con infliximab; HA VH = ratas hiperamonémicas tratadas con vehículo; HA INFLIX = ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab.

1.2. La expresión del ARNm de TNF α aumenta en cerebelo a las 4 semanas de hiperamonemia y se normaliza con infliximab

Inesperadamente, también observamos un aumento en la expresión de TNF α en las neuronas de Purkinje en ratas después de 4 semanas de hiperamonemia (Fig. 37 B, C y E). La intensidad de tinción (unidad de intensidad: UI) de TNF α en las neuronas de Purkinje fue mayor en ratas hiperamonémicas (15 ± 1 UI) que en ratas control (10 ± 1 UI) (Fig. 37 E). El tratamiento con infliximab previene el aumento de TNF α en las neuronas de Purkinje (7 ± 1 UI) (Fig. 37 E).

Para confirmar que la tinción de TNF α en neuronas de Purkinje se debe a su síntesis en estas neuronas, analizamos el contenido de ARNm de TNF α mediante hibridación in situ con fluorescencia (Fig. 39 A y D). En comparación con las ratas control (19 ± 1 UI) y ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab (18 ± 2 UI), las ratas hiperamonémicas mostraron un mayor nivel de mRNA TNF α (intensidad media de 26 ± 2 UI) en las neuronas de Purkinje (Fig. 39 A y D).

Análisis del ARNm de TNF α a 4 semanas de hiperamonemia

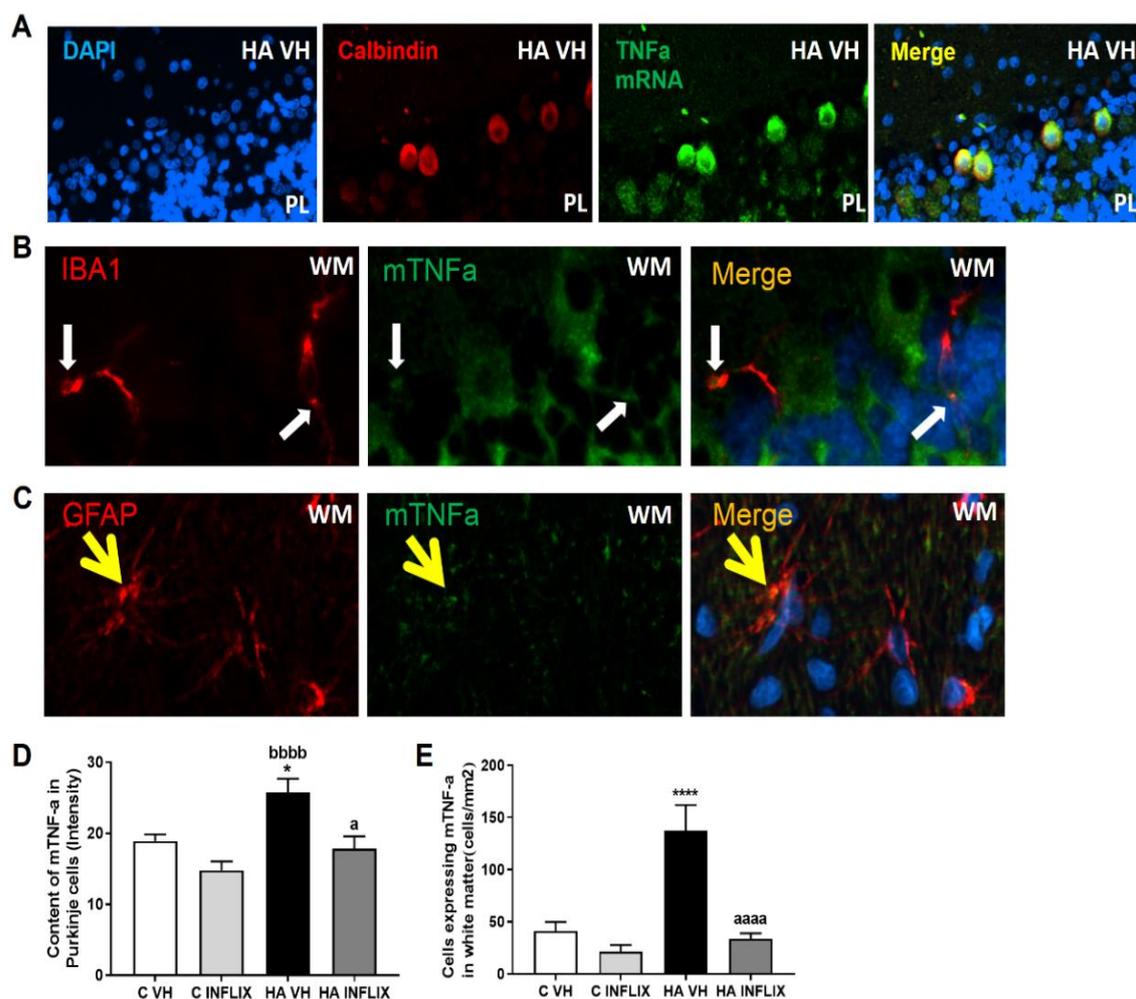


Figura 39. La expresión del ARN mensajero de TNF α aumenta en la sustancia blanca y la capa de Purkinje del cerebelo a las 4 semanas de hiperamonemia y se normaliza con

infiximab. Se muestra la tinción de fluorescencia doble para ARNm de TNF α (verde) y calbindina (rojo, A), Iba-1 (rojo, B) o GFAP (rojo, C). Se cuantificó el contenido de ARNm de TNF α en neuronas de Purkinje (D) y sustancia blanca (E). Los valores son la media \pm SEM de 6-8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de los de las ratas control se indican con asteriscos, los valores significativamente diferentes de los de las ratas HA VH se indican con a, y los valores significativamente diferentes de las ratas control tratadas con infiximab se indican con b. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$; a $p < 0,05$; aaaa $p < 0,0001$; bbbb $p < 0,0001$. C VH = ratas control tratadas con vehículo; C INFLIX = ratas control tratadas con infiximab; HA VH = ratas hiperamonémicas tratadas con vehículo; HA INFLIX = ratas hiperamonémicas tratadas con infiximab.

La expresión de ARNm de TNF α también aumentó en las células gliales en la sustancia blanca de ratas hiperamonémicas (137 ± 24 células/mm²; $p < 0,0001$) en comparación con las ratas control (41 ± 9 células/mm², Fig. 39 E). Las ratas hiperamonémicas tratadas con infiximab mostraron valores similares a las ratas control (34 ± 5 células/mm²) (Fig. 39 E). Nuevamente, la inmunofluorescencia doble mostró que los aumentos en el ARNm de TNF α en la sustancia blanca se producían tanto en la microglía (Fig. 39 B, flecha blanca) como en los astrocitos (Fig. 39 C, flecha amarilla).

1.3. El infiximab previene la translocación nuclear de las subunidades p50 y p65 de NF- κ B en neuronas de Purkinje y células gliales en hiperamonemia crónica

A continuación, evaluamos si la hiperamonemia puede inducir la expresión de TNF α en neuronas de Purkinje aumentando la activación del factor de transcripción NF- κ B. Para ello analizamos la localización nuclear de sus subunidades p50 y p65 (Fig. 40 y 41). La hiperamonemia altera fuertemente la distribución intracelular de p50, aumentando la proporción núcleo/citosol ($0,56 \pm 0,03$) en comparación a las ratas control ($0,37 \pm 0,02$) (Fig. 40 A y C) y reduciendo considerablemente el nivel de p50 en el nucleolo (Fig. 40 A y D). El tratamiento con infiximab previno todos estos cambios en la distribución de p50 ($0,43 \pm 0,03$) (Fig. 40 C y D).

La intensidad de tinción para la subunidad p65 de NF- κ B en el núcleo también aumentó en las neuronas de Purkinje de ratas hiperamonémicas ($0,8 \pm 0,01$) en comparación con las ratas control ($0,77 \pm 0,01$), y esto también se previno con infiximab ($0,76 \pm 0,01$) (Fig. 40 B y E).

La expresión de p50 también se aumentó en las células gliales en ratas hiperamonémicas (Fig. 41 A-D). El número de células que expresan p50 en microglía y astrocitos aumentó más de 3 veces en ratas hiperamonémicas, y esto se previno con el tratamiento con infiximab (Fig. 41 A-D).

CAPÍTULO 2: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de la localización de NF- κ B en neuronas de Purkinje a 4 semanas de hiperamonemia

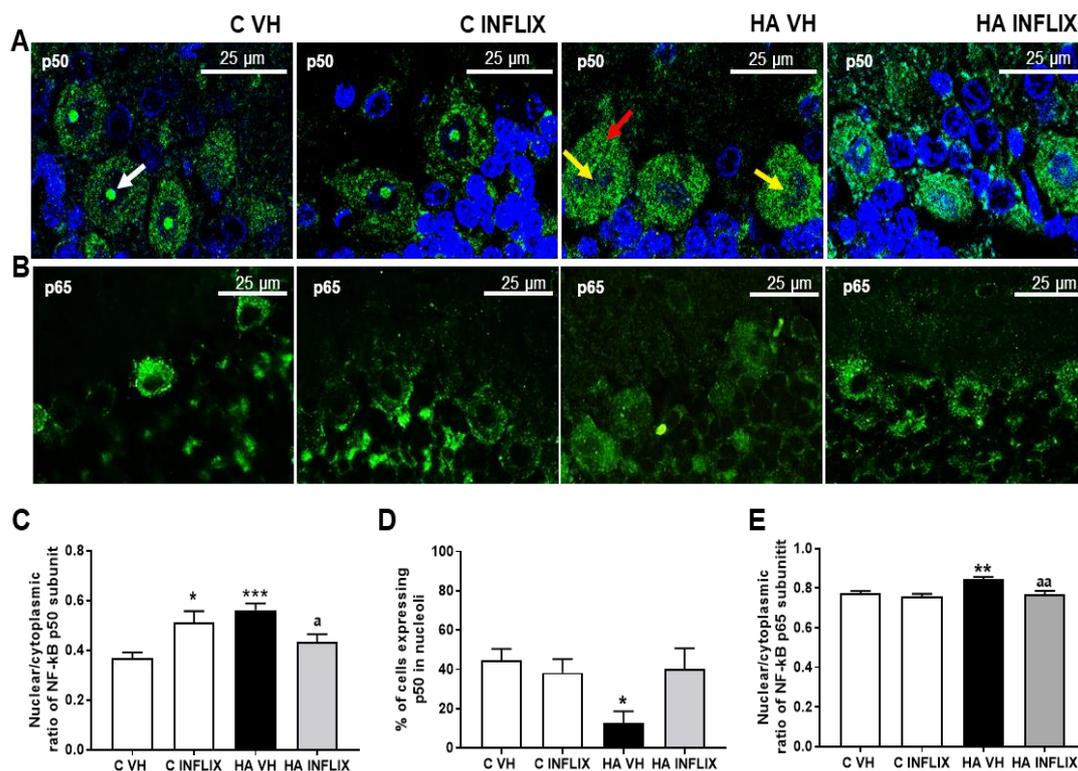


Figura 40. La hiperamonemia sostenida aumenta la translocación nuclear de las subunidades p50 y p65 de NF- κ B en neuronas de Purkinje. El tratamiento con infliximab previene dicha translocación. El análisis de la localización subcelular de NF- κ B en neuronas se realizó mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos contra las subunidades p50 (A) y p65 (B) de NF- κ B (tinción verde). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. Se cuantifican las proporciones núcleo/citosol de p50 (C) y p65 (E) y la proporción de células que contienen p50 en los nucléolos (D). Los valores son la media \pm SEM de 6-8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, y los valores significativamente diferentes de las ratas HA VH se indican con a. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, a $p < 0.05$; aa $p < 0.01$. C VH = ratas control tratadas con vehículo, C INFLIX = ratas control tratadas con infliximab, HA VH = ratas hiperamonémicas tratadas con vehículo, HA INFLIX = ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab.

Análisis de la localización de NF- κ B en células gliales a 4 semanas de hiperamonemia

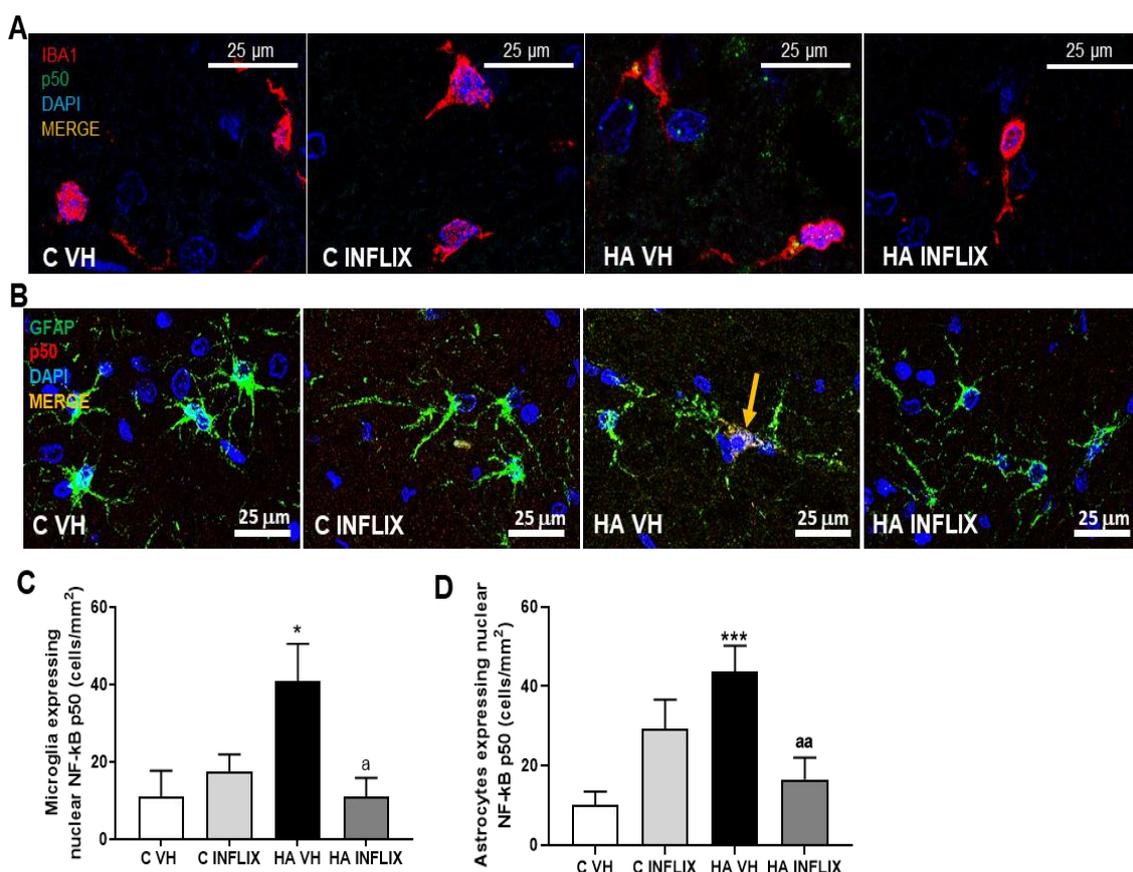


Figura 41. La hiperamonemia sostenida aumenta la translocación nuclear de las subunidades p50 de NF- κ B en células gliales. Para analizar la translocación nuclear de NF- κ B en células gliales, se realizó doble inmunofluorescencia para NF- κ B p50 (verde en A y rojo en B) e Iba-1, un marcador microglial (rojo en A), o GFAP, un marcador de astrocitos (verde en B). Las imágenes fusionadas muestran la colocalización de estas proteínas (amarillo). Se cuantificó el número de células de microglía (C) y astrocitos (D) que expresan p50 nuclear. Los valores son la media \pm SEM de 6-8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, y los valores significativamente diferentes de las ratas HA VH se indican con a. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, a $p < 0.05$; aa $p < 0.01$. C VH = ratas control tratadas con vehículo, C INFLIX = ratas control tratadas con infliximab, HA VH = ratas hiperamonémicas tratadas con vehículo, HA INFLIX = ratas hiperamonémicas tratadas con infliximab.

1.4. La translocación nuclear de NF- κ B y el aumento de TNF α son revertidos por R7050, lo que indica que están mediados por la activación de TNFR1

Se evaluó si la inducción de la translocación nuclear de p50 y el aumento de la expresión de TNF α en ratas hiperamonémicas están mediadas por la activación del receptor de TNF α , TNFR1. Para analizarlo, bloqueamos la formación del complejo TNFR1-TRADD/RIP1/TRAF2 usando el compuesto R7050. Estos experimentos se realizaron en rodajas frescas de cerebelo ex vivo de ratas control e hiperamonémicas. La incubación con R7050 redujo la expresión de TNF α en las neuronas de Purkinje (34 ± 3 $p < 0.05$; Fig.

CAPÍTULO 2: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

42 A), microglía (23 ± 3 $p < 0,0001$; Fig. 42 B) y astrocitos (21 ± 4 $p < 0,0001$; Fig. 42 C) de ratas hiperamonémicas a valores similares a los de las ratas control (Fig. 42 D y E).

Análisis ex vivo de los efectos del tratamiento con R7050 sobre TNF α a 4 semanas de hiperamonemia

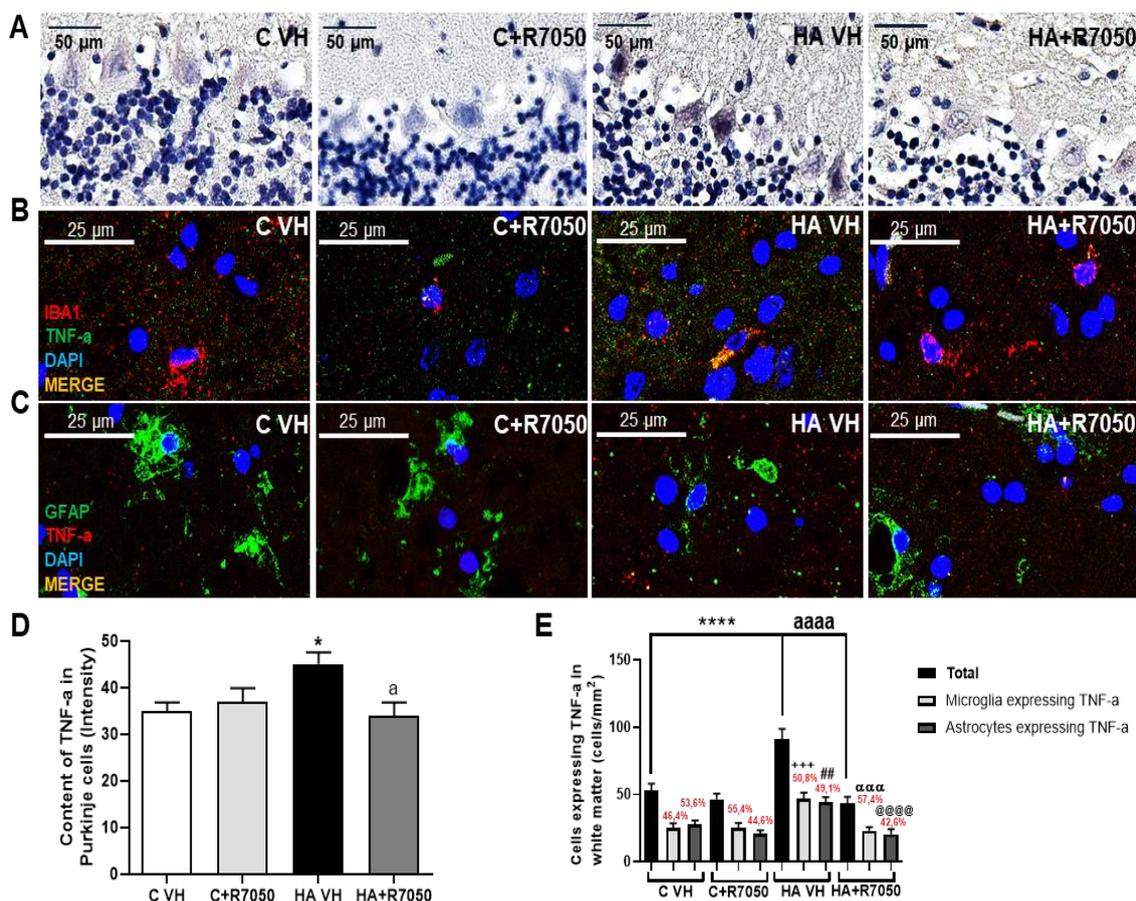


Figura 42. La síntesis de TNF α en el cerebelo depende de la formación del complejo TRADD/RIP1/TRAF2. El análisis de la expresión de TNF α se realizó en cortes ex vivo incubados con R7050. Se muestran imágenes representativas de la tinción de TNF α en las neuronas de Purkinje (A), y los datos cuantificados del contenido de TNF α se muestran en D. Se realizó doble inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra TNF α e Iba-1 (B) o GFAP (C), y se determinó de las células gliales que expresan TNF α en la sustancia blanca qué porcentaje son microglía y astrocitos (E). Los valores son la media \pm SEM de 8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, y los valores significativamente diferentes de las ratas HA VH se indican con a. + indica diferencia significativa entre microglía que expresa TNF α en ratas HA VH vs microglía que expresa TNF α en ratas C VH, # indica diferencia significativa entre astrocitos que expresan TNF α en ratas HA VH vs microglía que expresa TNF α en ratas HA + R7050, y @ indica diferencia significativa entre astrocitos que expresan TNF α en ratas HA VH frente a astrocitos que expresan TNF α en ratas HA + R7050. Un símbolo indica $p < 0,05$, dos símbolos indican $p < 0,01$, tres símbolos indican $p < 0,001$ y cuatro símbolos indican $p < 0,0001$. C VH = cortes de cerebelo obtenidos de ratas control tratadas con vehículo, C + R7050 = cortes de cerebelo obtenidos de ratas control e incubados con R7050, HA VH = cortes de cerebelo obtenidos de ratas hiperamonémicas tratadas con vehículo, HA + R7050 = cortes de cerebelo obtenidos de ratas hiperamonémicas ratas e incubadas con R7050.

Análisis ex vivo de los efectos del tratamiento con R7050 sobre la localización de NF-κB a 4 semanas de hiperamonemia

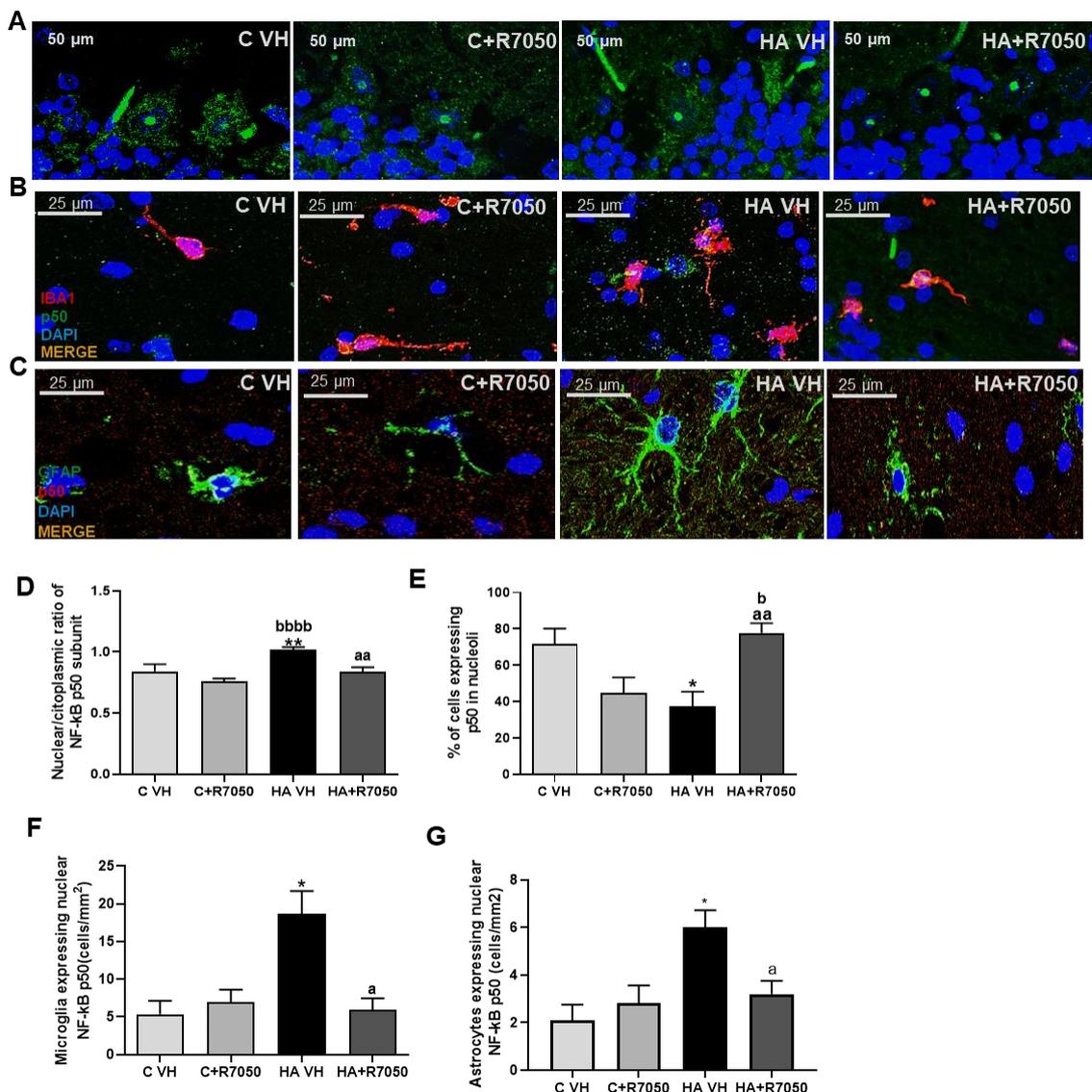


Figura 43. La translocación nuclear de NF-κB en el cerebelo depende de la formación del complejo TRADD/RIP1/TRAF2. El análisis de NF-κB en neuronas se realizó en cortes ex vivo incubados con R7050 mediante inmunofluorescencia usando anticuerpo contra la subunidad p50 (A y D). Se cuantificaron las proporciones núcleo/citosol de p50 (D) y la proporción de células que contienen p50 en los nucléolos (E). Para analizar la translocación nuclear de NF-κB en células gliales, se realizó doble inmunofluorescencia para NF-κB p50 (verde en B y rojo en C) e Iba-1, un marcador de microglía (rojo en B), o GFAP, un marcador de astrocitos (verde en C). Las imágenes fusionadas muestran la colocalización de estas proteínas (amarillo). Se cuantificó el número de microglía (F) y astrocitos (G) que expresan p50 nuclear. Los valores son la media ± SEM de 8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, y los valores significativamente diferentes de las ratas HA VH se indican con a. Un símbolo indica $p < 0.05$, dos símbolos indican $p < 0.01$, tres símbolos indican $p < 0.001$ y cuatro símbolos indican $p < 0.0001$. C VH = cortes de cerebelo obtenidos de ratas control tratadas con vehículo, C + R7050 = cortes de cerebelo obtenidos de ratas control e incubados con R7050, HA VH = cortes de cerebelo obtenidos de ratas hiperamonémicas tratadas con vehículo, HA + R7050 = cortes de cerebelo obtenidos de ratas hiperamonémicas ratas e incubadas con R7050.

Evaluamos si la normalización de los niveles de TNF α por R7050 está asociada con la normalización de la distribución subcelular de NF- κ B. R7050 normalizó la distribución núcleo/citosol de p50 ($0,8\pm 0,04$) y restauró el contenido nucleolar de p50 en las neuronas de Purkinje de ratas hiperamonémicas (Fig. 43 A, D y E). R7050 también normalizó la expresión de p50 en microglía ($6\pm 1,5$ células/mm² Fig. 43 B y F) y astrocitos ($3\pm 0,5$ células/mm² Fig. 43 C y G) en la sustancia blanca de ratas hiperamonémicas a niveles similares a los de las ratas control.

1.5. El TNF α aumenta en las células gliales, pero no en las neuronas de Purkinje en cerebelo a las 2 semanas de hiperamonemia

Todos los estudios anteriores se realizaron a 4 semanas de hiperamonemia y mostraron que la hiperamonemia crónica induce la expresión de TNF α en las neuronas de Purkinje. Como esta no es una situación común ya que, en el sistema nervioso central, la microglía y los astrocitos suelen ser las principales fuentes de TNF α , evaluamos si la hiperamonemia sostenida es necesaria para la inducción de TNF α y si dicha inducción también ocurre después de períodos más cortos de hiperamonemia. El diseño experimental de esta parte de la tesis se resume en la Figura 44.

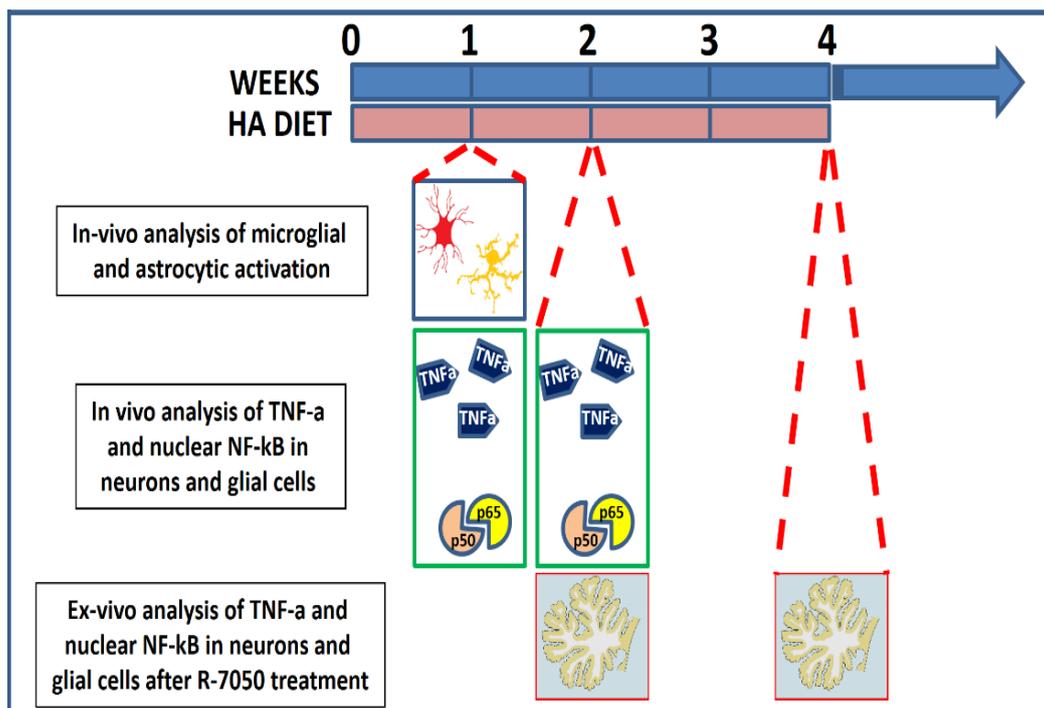


Figura 44. La hiperamonemia sostenida pero no a corto plazo induce TNF α en las neuronas de Purkinje. Para analizar la evolución temporal de la inducción de TNF α , las ratas se alimentaron con una dieta rica en amonio y se sacrificaron a diferentes tiempos (1, 2 y 4 semanas) para el análisis de la activación microglial y de astrocitos después de 1 semana de hiperamonemia, análisis de la expresión de TNF α y de NF- κ B nuclear en neuronas de Purkinje y células gliales después de 1 y 2 semanas de hiperamonemia, y se utilizaron cortes frescos de cerebelo ex vivo tratados o no con R7050 para el análisis de la expresión de TNF α y la localización nuclear de NF- κ B en las neuronas de Purkinje y células gliales después de 2 y 4 semanas de hiperamonemia.

Repetimos el análisis de la expresión de TNF α tras 2 semanas de hiperamonemia (Fig. 45 y 46). No se observó ningún aumento de TNF α en las neuronas de Purkinje (Fig. 45 A y E), sin embargo, el TNF α aumentó en las células gliales en la sustancia blanca (225 ± 10 células/mm 2 $p<0,01$; Fig. 45 B y F), tanto en microglía (76 ± 12 células/mm 2 $p<0,01$; Fig. 45 C y G) como en astrocitos (44 ± 8 células/mm 2 $p<0,01$; Fig. 45 D y G). El aumento de TNF α fue ligeramente mayor en las células de microglía (64%) que en los astrocitos (36%) (Fig. 45G).

Análisis de la expresión de TNF α a 2 semanas de hiperamonemia

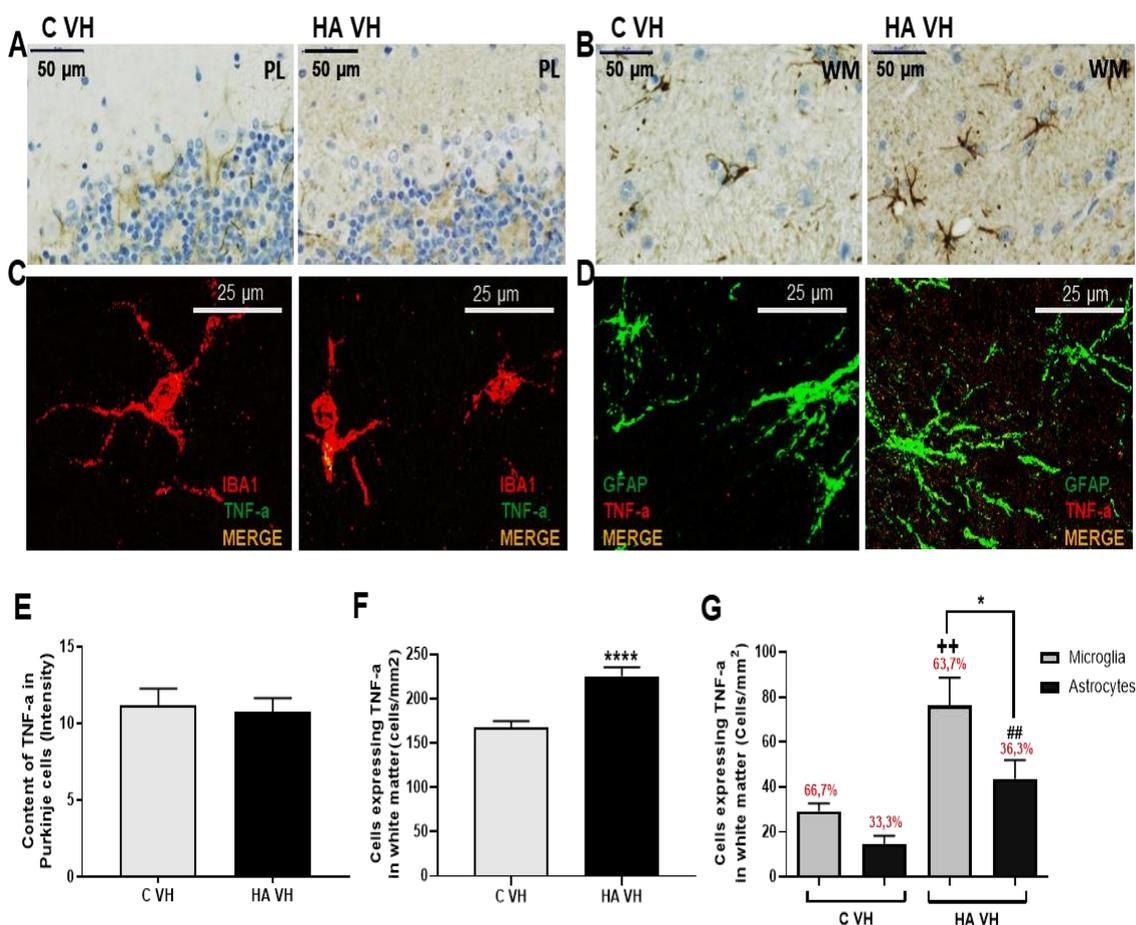


Figura 45. El TNF α aumenta en las células gliales, pero no en las neuronas de Purkinje a las 2 semanas de hiperamonemia. Se muestran imágenes de la tinción de TNF α representativas en las neuronas de Purkinje (A) y en la sustancia blanca (B) y los datos cuantificados del contenido de TNF α (E) y el número de células que expresan TNF α (F). Se realizó doble inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra TNF α e Iba-1 (C) o GFAP (D), y se determinó de las células gliales que expresan TNF α en la sustancia blanca qué porcentaje son microglía y astrocitos (G). Las imágenes fusionadas muestran la colocalización de estas proteínas (amarillo). Los valores son la media \pm SEM de 6-8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de los de las ratas control se indican con asteriscos. * $p<0,05$, ** $p<0,05$, **** $p<0,0001$. ++ indica diferencia significativa entre la microglía que expresa TNF α en ratas HA VH frente a la microglía que expresa TNF α en ratas C VH ($p <0,01$) y ## indica diferencia significativa entre astrocitos que expresan TNF α en ratas HA VH frente a astrocitos que expresan TNF α en ratas C VH ($p<0,01$). C VH = ratas control tratadas con vehículo, HA VH = ratas hiperamonémicas tratadas con vehículo.

Análisis de la localización subcelular de NF-κB a 2 semanas de hiperamonemia

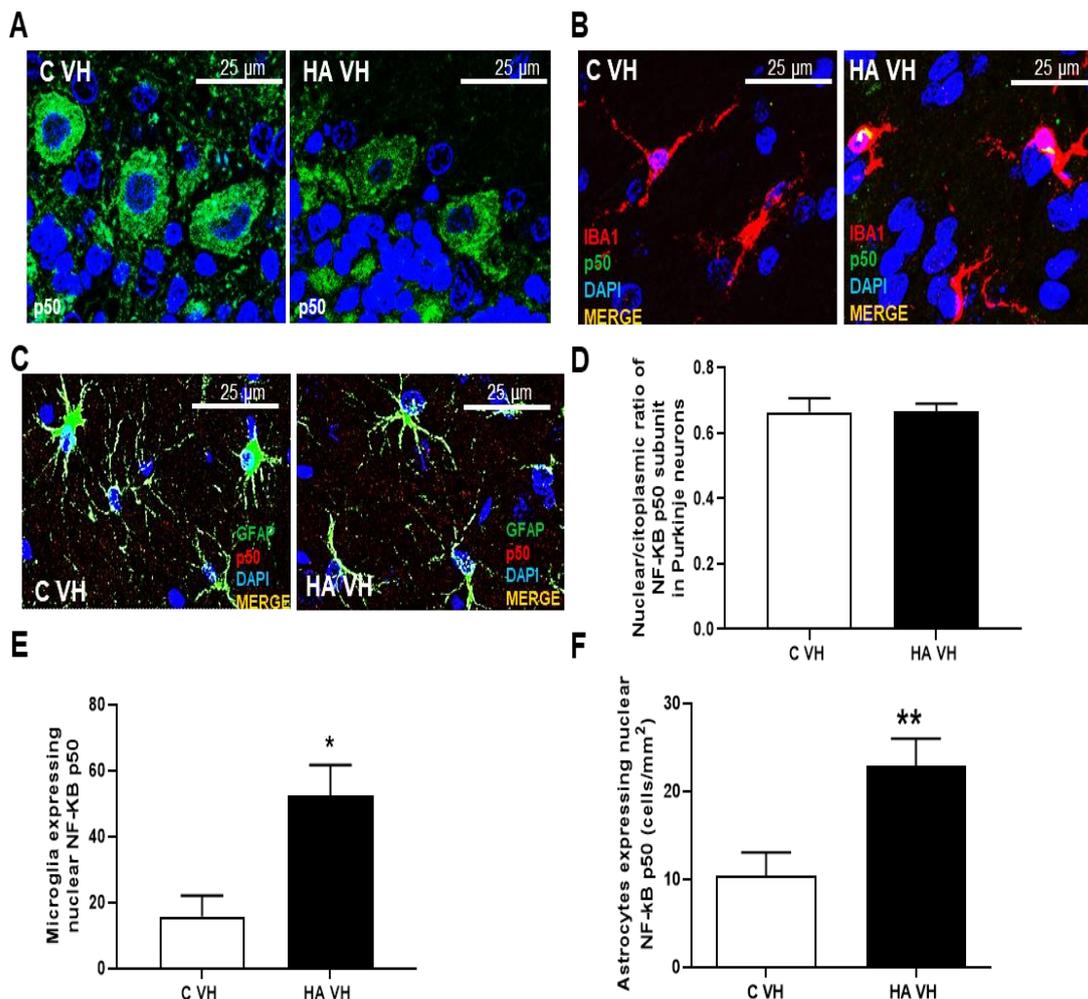


Figura 46. La translocación nuclear de NF-κB no aumenta en las neuronas de Purkinje, pero si en las células gliales a las 2 semanas de hiperamonemia. El análisis de la localización de NF-κB en neuronas se realizó mediante inmunofluorescencia usando anticuerpo contra la subunidad p50 (A). Se cuantificó la distribución núcleo/citosol de p50 (D). Para analizar la translocación nuclear de NF-κB en células gliales, se realizó doble inmunofluorescencia para NF-κB p50 (verde en B y rojo en C) e Iba-1, un marcador de microglía (rojo en B), o GFAP, un marcador de astrocitos (verde en C). Las imágenes fusionadas muestran la colocación de estas proteínas (amarillo). Se cuantificó el número células de microglía (E) y astrocitos (F) que expresan p50 nuclear. Los valores son la media ± SEM de 6-8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de los de las ratas control se indican con asteriscos. * p<0.05, ** p<0.05. C VH = ratas control tratadas con vehículo, HA VH = ratas hiperamonémicas tratadas con vehículo.

También analizamos la translocación nuclear de NF-κB a las 2 semanas de hiperamonemia (Fig. 46 A-F). No se observó ningún efecto de la hiperamonemia sobre la distribución subcelular de p50 en las neuronas de Purkinje, con una distribución similar a la observada en las ratas control (Fig. 46 A y D). Además, de acuerdo con el aumento de TNFα, las ratas expuestas a 2 semanas de hiperamonemia mostraron un aumento de la expresión de p50 en microglía (52±9 células/mm² en comparación con 16±6 células/mm²

en las ratas control; Fig. 46 B y E) y astrocitos (24 ± 3 células/mm² en comparación con 10 ± 3 células/mm² en las ratas control; Fig. 46 C y F).

1.6. R7050 normaliza la expresión de p50 en microglía y astrocitos en la sustancia blanca de ratas a las 2 semanas de hiperamonemia

También analizamos el efecto de R7050 para evaluar el papel de la activación de TNFR1 en la inducción de la translocación nuclear de p50 y la expresión de TNF α a las 2 semanas de hiperamonemia (Fig. 47 y 48).

Análisis del efecto del tratamiento con R7050 sobre la expresión de TNF α a 2 semanas de hiperamonemia

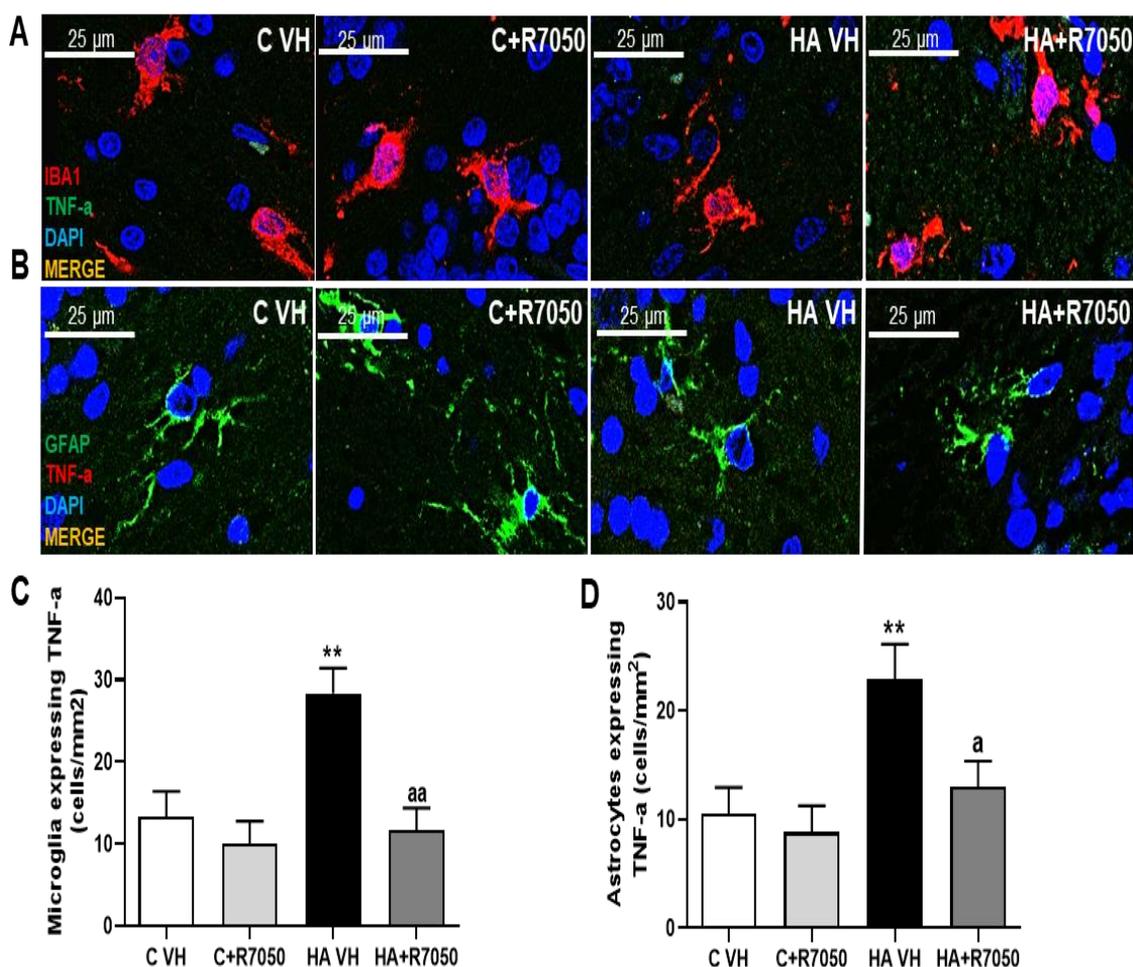


Figura 47. Análisis del efecto del tratamiento con R7050 sobre la expresión de TNF α a 2 semanas de hiperamonemia. Los efectos del tratamiento con R7050 sobre la expresión de TNF α en microglía (A y C) y astrocitos (B y D) a las 2 semanas de hiperamonemia. Los valores son la media \pm SEM de 8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, y los valores significativamente diferentes de las ratas HA VH se indican con a. ** $p < 0.01$, a $p < 0.05$ y aa $p < 0.01$. C VH = rodajas de cerebelo obtenidas de ratas control tratadas con vehículo; C + R7050 = rodajas de cerebelo obtenidas de ratas control e incubadas con R7050; HA VH = rodajas de cerebelo obtenidas de ratas hiperamonémicas tratadas con vehículo, HA + R7050 = rodajas de cerebelo obtenidas de ratas hiperamonémicas e incubadas con R7050.

CAPÍTULO 2: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del efecto del tratamiento con R7050 sobre la localización de NF-κB a 2 semanas de hiperamonemia

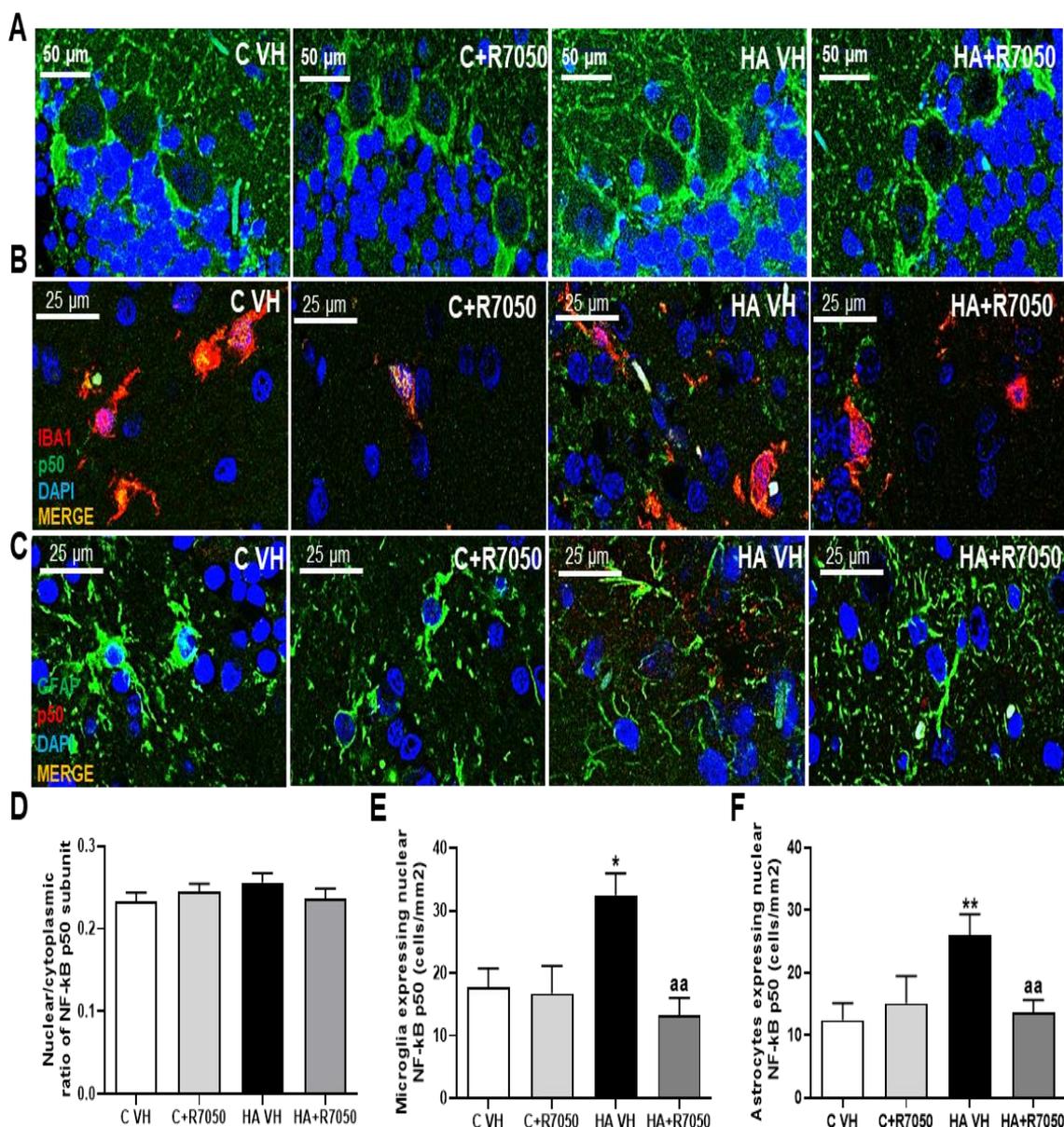


Figura 48. Análisis del efecto del tratamiento con R7050 sobre la localización de NF-κB a 2 semanas de hiperamonemia. Los efectos del tratamiento con R7050 sobre la translocación nuclear de p50 en neuronas de Purkinje (A y D), microglía (B y E) y astrocitos (C y F) a las 2 semanas de hiperamonemia. Los valores son la media ± SEM de 8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, y los valores significativamente diferentes de las ratas HA VH se indican con a. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y aa $p < 0.01$. C VH = rodajas de cerebelo obtenidas de ratas control tratadas con vehículo; C + R7050 = rodajas de cerebelo obtenidas de ratas control e incubadas con R7050; HA VH = rodajas de cerebelo obtenidas de ratas hiperamonémicas tratadas con vehículo, HA + R7050 = rodajas de cerebelo obtenidas de ratas hiperamonémicas e incubadas con R7050.

En las ratas hiperamonémicas, la incubación con R7050 reduce la expresión de TNF α en microglía (12 ± 3 células/mm² $p < 0,001$; Fig. 47 A y C) y en astrocitos (13 ± 2 células/mm² $p < 0,005$; Fig. 47 B y D) a valores similares a las ratas control (Fig. 47 C y D).

Después de 2 semanas de hiperamonemia, la distribución núcleo/citosol de p50 no se alteró en las neuronas de Purkinje con R7050 (Fig.48 A y D). En ratas hiperamonémicas aumentó la expresión de p50 tanto en microglía (Fig.48 B y E) como en astrocitos (Fig.48 C y F) (33 ± 3 células/mm² $p<0,05$ y 26 ± 3 células/mm² $p<0,01$ respectivamente) en comparación con las ratas control (18 ± 3 células/mm² y 12 ± 3 células/mm² respectivamente). R7050 normalizó la expresión de p50 en microglía (13 ± 3 células/mm² $p<0,01$; Fig. 48 B y E) y astrocitos (14 ± 3 células/mm² $p<0,01$; Fig. 42 C y F) en la sustancia blanca a las 2 semanas de hiperamonemia.

1.7. El TNF α y la activación de NF- κ B no aumentan en ratas hiperamonémicas a 1 semana de hiperamonemia

Analizamos los cambios en la expresión de TNF α y la activación de NF- κ B después de 1 semana de hiperamonemia (Figura 49). A este tiempo, no observamos ningún aumento en la expresión de TNF α en las neuronas de Purkinje (Fig. 49 A y D), ni en microglía (Fig. 49 B y E) o astrocitos (Fig. 49 C y E). La expresión de NF- κ B también permaneció inalterada en las neuronas de Purkinje (Fig. 49 F e I), microglía (Fig. 49 G y J) y astrocitos (Fig. 49 H y K).

1.8. Activación de microglía y astrocitos en cerebelo de ratas hiperamonémicas a 1 semana de hiperamonemia

A pesar de la falta de efecto sobre el TNF α y NF- κ B, tanto la microglía como los astrocitos están activados en la sustancia blanca del cerebelo a 1 semana de hiperamonemia. Esto se reflejó en la reducción del perímetro de la microglía (181 ± 6 μ m Fig. 50 A y B), aumento de la expresión de CD68 (15 ± 2 células/mm² Fig. 50 C y D) y aumento del área teñida con GFAP ($30\pm 1\%$ Fig. 50 E y F) en comparación con las ratas control.

Análisis de la expresión de TNF α y la localización de NF- κ B a 1 semana de hiperamonemia

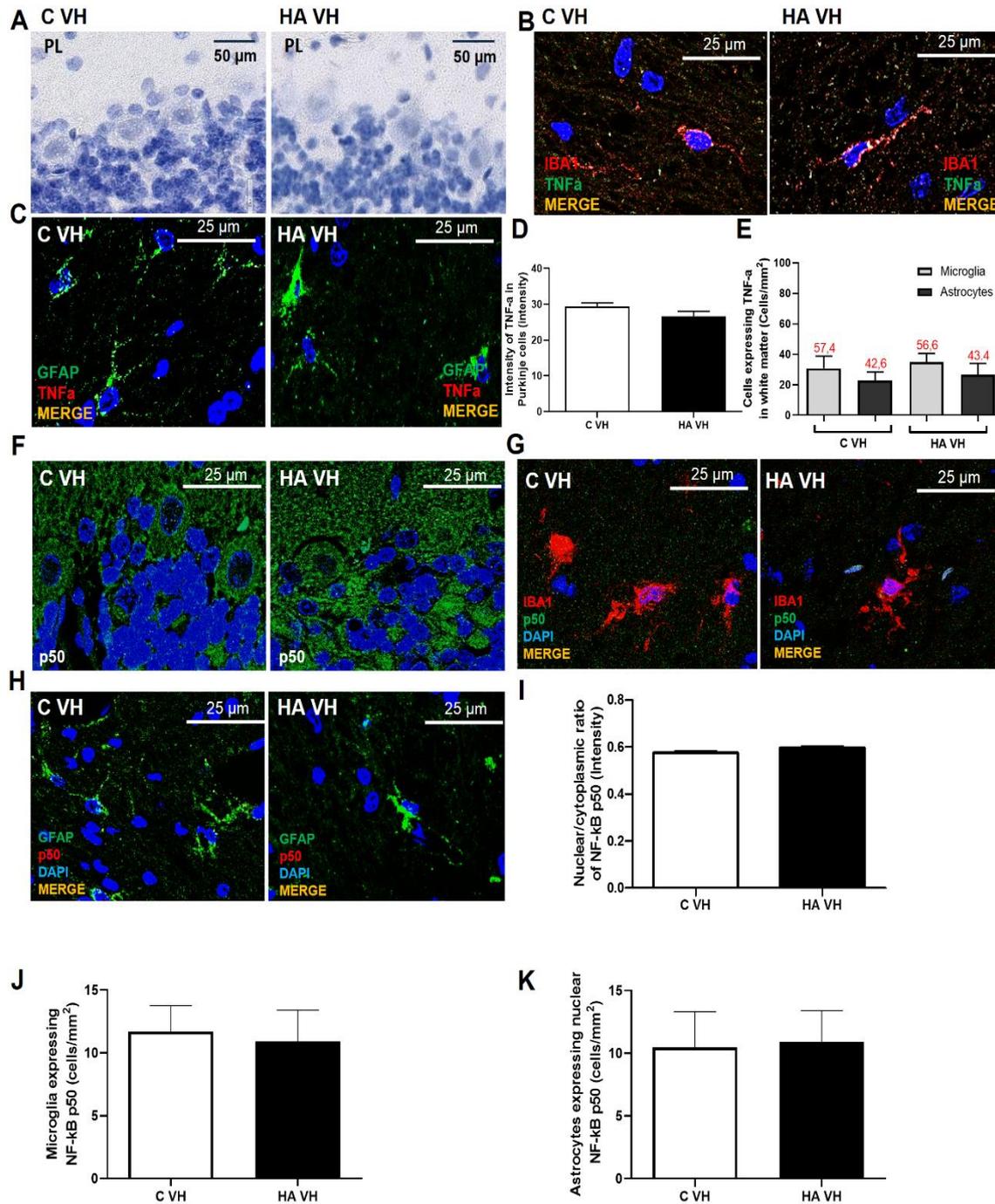


Figura 49. La expresión de TNF α y la activación de NF- κ B no aumentan en ratas hiperamonémicas a una semana de hiperamonemia. Se muestran imágenes representativas de la expresión de TNF α y la localización de NF- κ B en neuronas de Purkinje (A y F, respectivamente), microglía (B y G, respectivamente) y astrocitos (C y H, respectivamente). El contenido de TNF α y la relación núcleo/citosol de la subunidad p50 de NF- κ B se cuantificaron y se muestran en D e I, respectivamente. El porcentaje de microglía y astrocitos que expresan TNF α , se representa en E. El número de células de microglía y astrocitos que expresan p50 nuclear se cuantificó y se muestra en J y K, respectivamente. Los valores son la media \pm SEM de 6-8 ratas

por grupo. C VH = ratas control tratadas con vehículo, HA VH = ratas hiperamonémicas tratadas con vehículo.

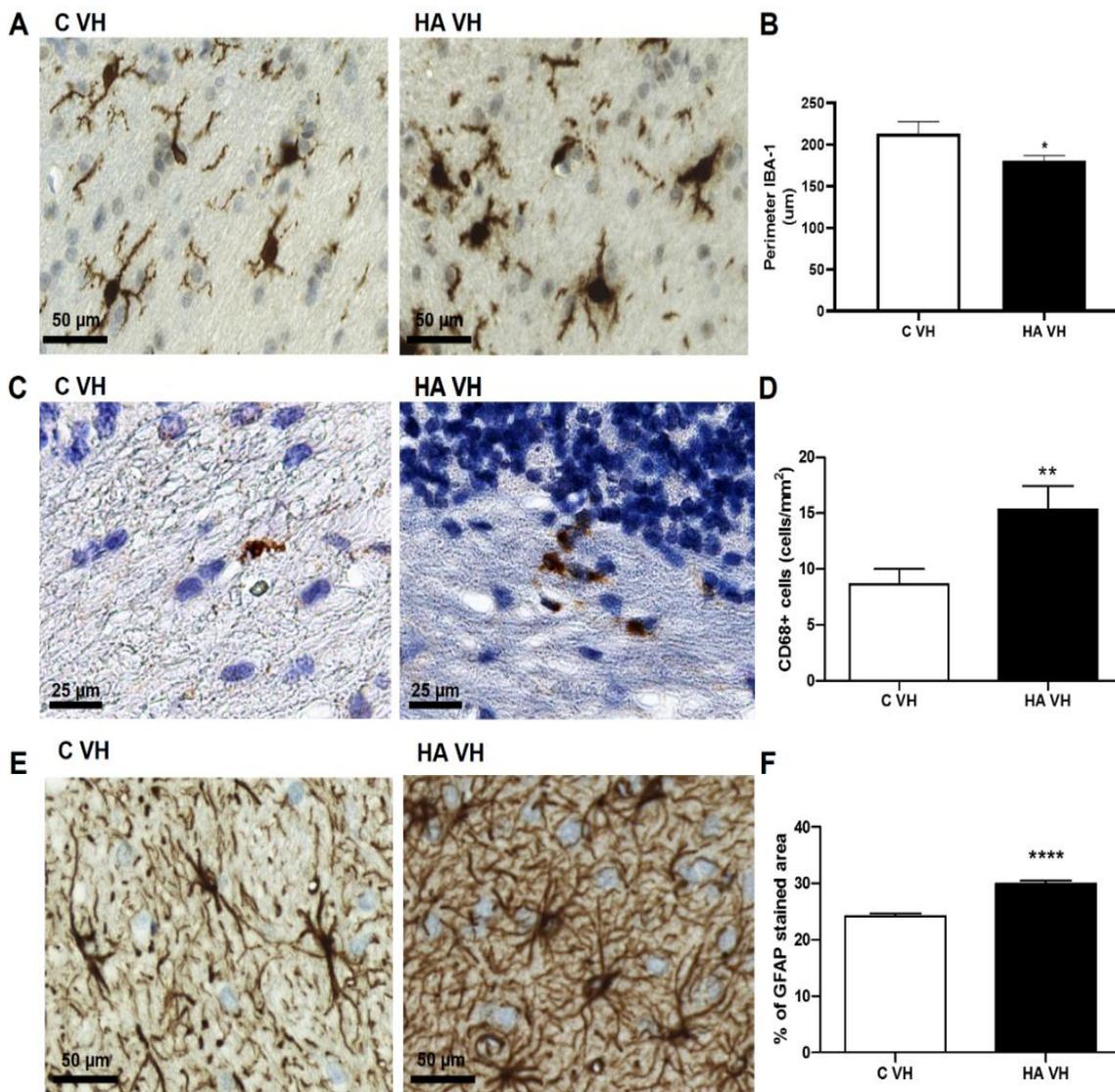


Figura 50. La microglía y los astrocitos están activados a 1 semana de hiperamonemia. Se muestran imágenes representativas de microglía (A y C) y de astrocitos (E) en la sustancia blanca del cerebelo. Se analizó el perímetro de las células microgliales (B), el número de células que expresan CD68 (D) y el área teñida con GFAP (F). Los valores son la media \pm SEM de 6-8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y **** $p < 0.0001$. C VH = ratas control tratadas con vehículo, HA VH = ratas hiperamonémicas tratadas con vehículo.

1.9. Los pacientes cirróticos presentan un aumento de TNF α en las neuronas de Purkinje

El diseño experimental de esta parte de la tesis se resume en la Figura 51.

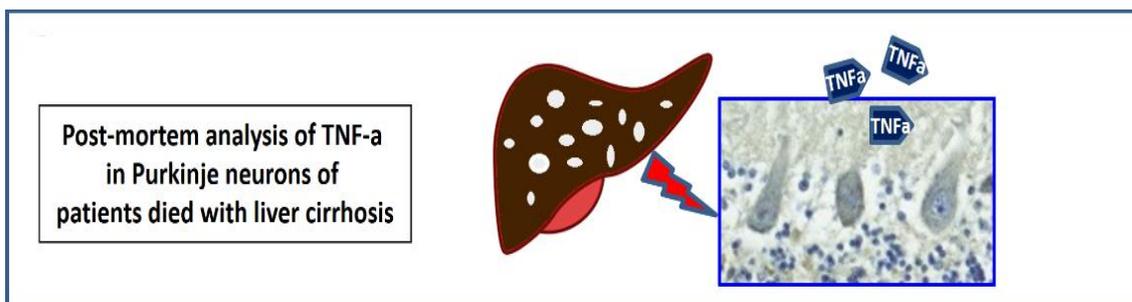


Figura 51. La expresión de TNF α está aumentada en neuronas de Purkinje en pacientes fallecidos con cirrosis hepática. Para evaluar si el TNF α también se induce en las neuronas de Purkinje de pacientes cirróticos, se analizó por inmunohistoquímica el contenido de TNF α en muestras de cerebelo post mortem de pacientes que murieron con cirrosis hepática.

Los pacientes con cirrosis hepática muestran hiperamonemia sostenida. Analizamos si el aumento de TNF α encontrado en las neuronas de Purkinje en las ratas hiperamonémicas ocurre también en pacientes cirróticos y si la hiperamonemia sostenida conduce a un aumento del nivel de TNF α en las neuronas de Purkinje de estos pacientes. Como se muestra en la Fig. 52, las neuronas de Purkinje de los pacientes fallecidos con cirrosis hepática mostraron un mayor contenido de TNF α en comparación con los sujetos control que fallecieron sin enfermedades hepáticas o neurodegenerativas.

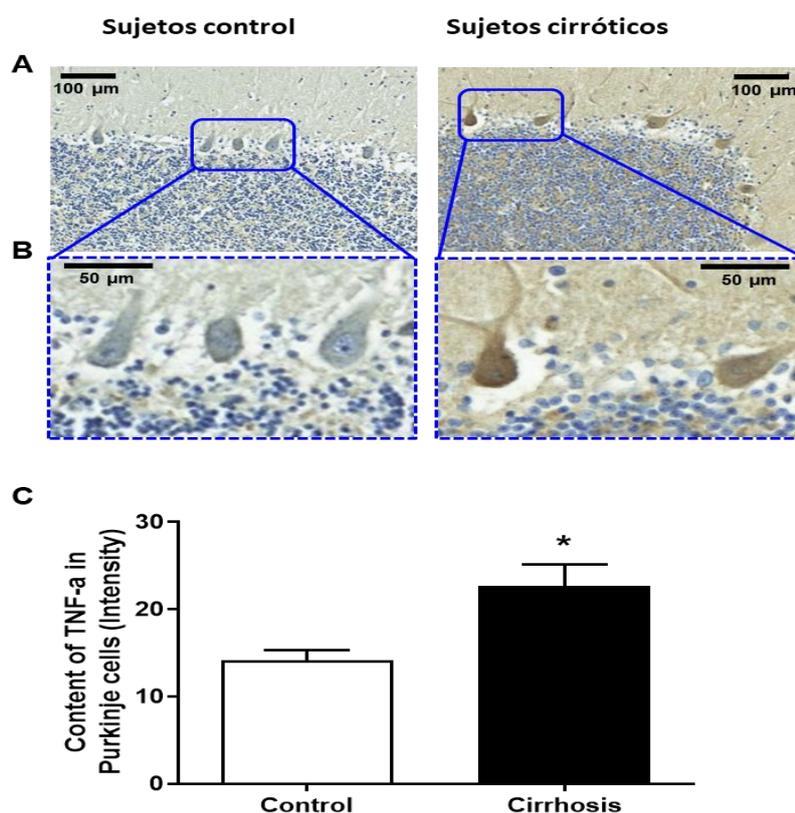


Figura 52. El contenido de TNF α está aumentado en las neuronas de Purkinje de los pacientes que fallecen con cirrosis hepática. Se muestran imágenes representativas de la expresión de TNF α en neuronas de Purkinje (A y B). El contenido de TNF α se cuantificó y se muestra en C. Los valores son la media \pm SEM de 3 o 4 sujetos por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos * $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

La hiperamonemia sostenida, pero no a corto plazo, induce TNF α en las neuronas de Purkinje en el cerebelo de ratas hiperamonémicas.

Este estudio muestra que la hiperamonemia sostenida (4 semanas), pero no a corto plazo (2 semanas), induce la expresión de TNF α en las neuronas de Purkinje en ratas. Además, la expresión de TNF α también aumenta en las neuronas de Purkinje de pacientes que fallecen con cirrosis hepática y que han sufrido hiperamonemia sostenida.

La inducción de TNF α en las neuronas de Purkinje se asocia con un aumento de la localización nuclear de NF- κ B, un factor de transcripción que promueve la transcripción del mRNA de TNF α (Ahn y Aggarwal, 2005). Mostramos que el ARNm de TNF α también está aumentado en las neuronas de Purkinje, lo que indica que el TNF α se sintetiza dentro de las neuronas de Purkinje, probablemente debido al aumento de la translocación nuclear de NF- κ B (Fig. 53 A).

Tanto la translocación nuclear de NF- κ B como el aumento del nivel de TNF α en las neuronas de Purkinje se revierten al bloquear con R7050 la vía de transducción de señales TNFR1-TRADD / RIP1 / TRAF2 que se activa por la activación del receptor TNFR1 por TNF α (Fig. 53 B). Esto sugiere que el TNF α producido en la glía activa TNFR1 en las neuronas de Purkinje, induciendo la translocación de NF- κ B al núcleo y aumentando la transcripción del mRNA de TNF α y la síntesis de la proteína TNF α (Fig. 53). Mediante este proceso, el TNF α puede causar un bucle autocrino tanto en la glía como en las neuronas, exacerbando aún más los efectos de la neuroinflamación en el cerebro.

Los resultados presentados en esta tesis muestran que la hiperamonemia induce la síntesis de TNF α en microglía y astrocitos activados a las 2 semanas de hiperamonemia, mientras que a este tiempo el TNF α no está aumentado en las neuronas de Purkinje. También mostramos que después de 1 semana de hiperamonemia, se activan tanto la microglía como los astrocitos, pero aún no se induce la expresión de TNF α . Esto indica que el proceso sigue un curso temporal en el que la hiperamonemia induce la activación de microglía y astrocitos a la semana. Además, se induce la expresión de TNF α en ambos tipos de células gliales (pero no en las neuronas de Purkinje) a las 2 semanas. El TNF α liberado por las células gliales activaría TNFR1 en las neuronas de Purkinje, conduciendo a la inducción de la expresión de TNF α .

Recientemente, hemos demostrado que la hiperamonemia per se induce inflamación periférica aumentando en sangre el TNF α , IL-6 y PGE2 pro-inflamatorios y disminuyendo la IL-10 anti-inflamatoria (Balzano *et al.*, 2020a). Estos factores contribuyen a la neuroinflamación en el hipocampo y al deterioro cognitivo en ratas (Balzano *et al.*, 2020a).

En esta tesis mostramos que el bloqueo de TNF α periférico con un anticuerpo anti-TNF α (infliximab) previene la activación de microglía y astrocitos y la inducción de TNF α , lo que indica que el TNF α periférico y la inflamación desencadenan la activación glial y

CAPÍTULO 2: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

todos los procesos descritos anteriormente, que conducen a la expresión de TNF α en las neuronas de Purkinje en el cerebelo. Sin embargo, los mecanismos por los cuales las señales inflamatorias periféricas pueden inducir la activación de las células gliales y la expresión de TNF α en el cerebelo no están claros. Existen varios mecanismos por los cuales la inflamación sistémica puede inducir neuroinflamación, incluido (a) el transporte activo de ciertas citocinas al cerebro (Banks *et al.*, 1995); (b) la activación de los receptores de citocinas por sus ligandos (IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF α ...) en las células endoteliales, lo que desencadena la liberación de factores inflamatorios en el cerebro (Rummel *et al.*, 2006); (c) la entrada directa de citocinas en las regiones circunventriculares debido a la falta de una barrera hematoencefálica intacta en estas áreas del cerebro; y (d) la infiltración de monocitos o linfocitos periféricos en el cerebro (D'Mello, Le y Swain, 2009).

La síntesis de TNF α en neuronas ya se ha descrito en algunas situaciones patológicas, como lesión de la médula espinal (Ohtori *et al.*, 2004), accidente cerebrovascular (Liu *et al.*, 1994) y lesión del nervio ciático (Schäfers *et al.*, 2003). El TNF α e IL-1 β se expresan en las neuronas del hipocampo in vivo en respuesta a lesiones (Tchélingérian, Saux y Jacque, 1996) y meningitis neumocócica (Izadpanah *et al.*, 2014). Los estudios de hibridación in situ han demostrado que, en la meningitis neumocócica murina, el ARNm de TNF α se induce inicialmente en las células astrogliales, pero aumenta considerablemente en las neuronas del hipocampo a las 18-24 h (Izadpanah *et al.*, 2014). La expresión de ARNm y proteínas de TNF α también se induce en neuronas del hipocampo de ratas con encefalopatía hepática (Dadsetan *et al.*, 2016b). El veneno de la araña *Phoneutria nigriventerel* provoca la permeabilidad de la barrera hematoencefálica e induce la expresión de TNF α en las neuronas de Purkinje en ratas (da Cruz-Höfling *et al.*, 2009).

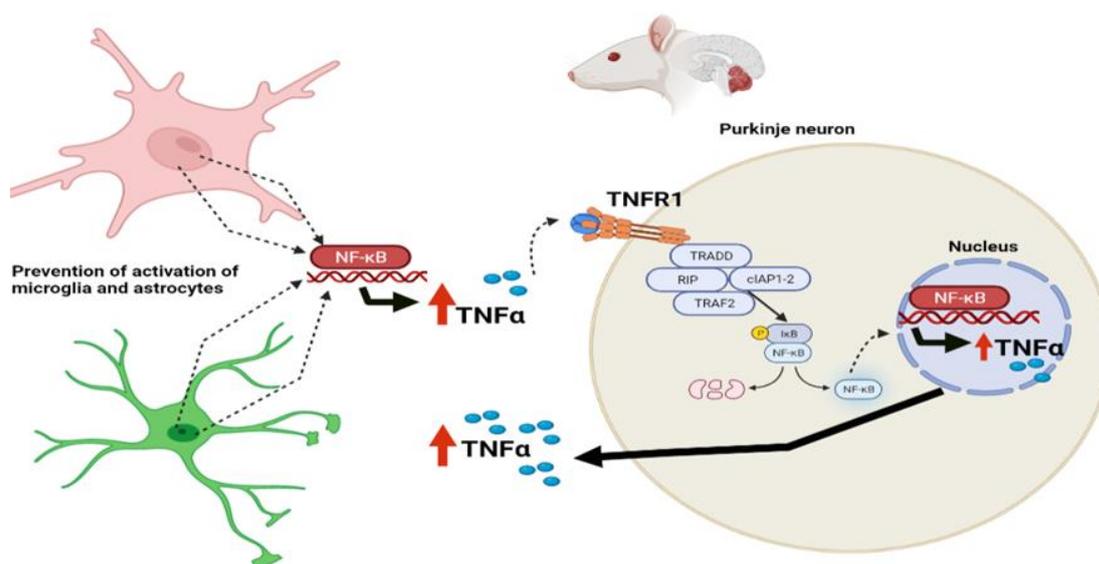
Estos estudios sugieren que la inducción de la expresión de TNF α en neuronas, incluidas las neuronas de Purkinje, puede ocurrir en diferentes situaciones patológicas y está precedida por la inducción de TNF α en células gliales. Sin embargo, los mecanismos subyacentes siguen sin estar claros.

La inducción de TNF α por la hiperamonemia sostenida puede contribuir a las alteraciones neurológicas observadas en hiperamonemia y encefalopatía hepática al alterar la función de las neuronas de Purkinje y la neurotransmisión e inducir muerte neuronal. El tráfico y la expresión en membrana de los receptores AMPA y NMDA se ven alterados por niveles elevados de TNF α (Beattie *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 2008; Wheeler *et al.*, 2009; Weaver-Mikaere *et al.*, 2013; Olmos y Lladó, 2014). El aumento de TNF α puede alterar la expresión en membrana y la función de los receptores AMPA y NMDA en las neuronas de Purkinje, alterando así su actividad y la neurotransmisión asociada. Del mismo modo podría alterar la neurotransmisión GABAérgica (Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a). Esto puede contribuir al deterioro de la función motora en hiperamonemia y encefalopatía hepática.

Además, se ha demostrado que el TNF α induce una pérdida neuronal mediada por excitotoxicidad en algunas enfermedades neurodegenerativas (Clark y Vissel, 2016). En condiciones neuroinflamatorias, el TNF α induce la liberación de glutamato de la microglía y los astrocitos a través de la estimulación de TNFR1, la inducción de glutaminasa y el aumento de la síntesis y liberación de glutamato. El TNF α también inhibe la captación de glutamato en los astrocitos, lo que aumenta aún más los niveles de glutamato extracelular (Olmos y Lladó, 2014). Además, en las neuronas, el TNF α aumenta rápidamente la fuerza sináptica excitadora a través de TNFR1, lo que induce una entrada excesiva de calcio y produce muerte neuronal excitotóxica (Olmos y Lladó, 2014). El aumento de la expresión de TNF α también puede contribuir a la degeneración de las neuronas de Purkinje en el cerebelo de los pacientes que mueren con cirrosis hepática, como ha descrito recientemente nuestro grupo (Balzano *et al.*, 2018a y 2018b).

Los datos anteriores indican que el aumento de TNF α y la activación de TNFR1 juegan un papel clave en la inducción de la neuroinflamación y en las alteraciones en las neuronas de Purkinje, pero no se conocen bien los mecanismos detallados de cómo la hiperamonemia induce un aumento de TNF α en el cerebelo de ratas hiperamonémicas. En el siguiente capítulo estudiamos estos mecanismos. La activación de TNFR1 podría aumentar S1P y la activación de S1PR2 lo que contribuiría a la inducción y mantenimiento de la neuroinflamación y a alterar la neurotransmisión. Vamos a estudiar si la activación de TNFR1 induce estas alteraciones potenciando la activación de la vía CCL2-CCR2-BDNF como consecuencia de la activación de receptores de esfingosina-1-fosfato en el cerebelo de ratas hiperamonémicas.

A



B

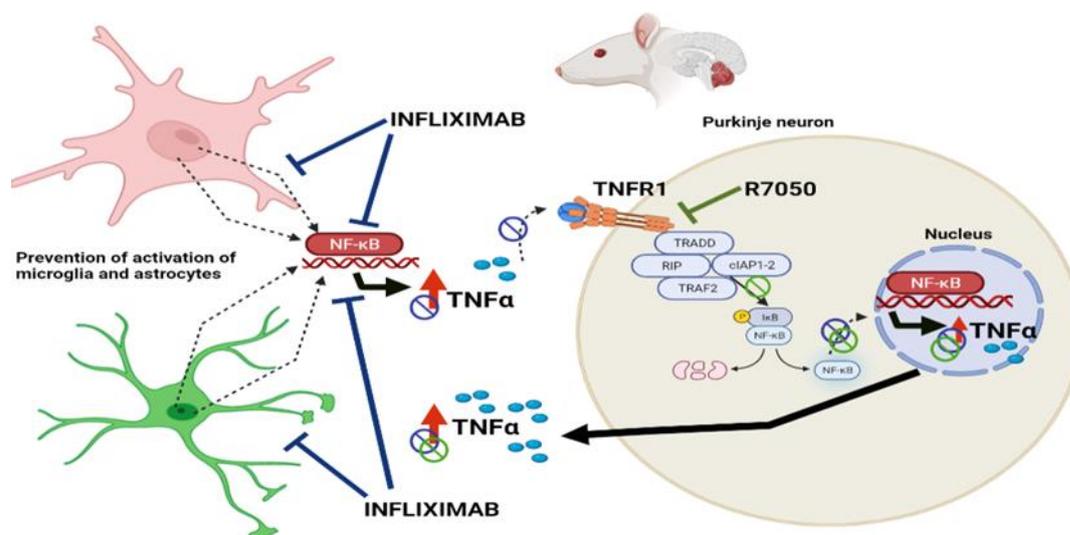


Figura 53. Mecanismos propuestos por los que la hiperamonemia crónica aumenta el TNF α en neuronas y células gliales. A) La hiperamonemia crónica induce la activación de microglía y astrocitos en la sustancia blanca del cerebelo. En las células gliales activadas aumenta la translocación nuclear de NF- κ B, que induce la transcripción de TNF α pro-inflamatorio. El TNF α producido en la glía se une al receptor TNFR1 en las neuronas de Purkinje, lo que lleva a la activación de la vía NF- κ B y la síntesis de TNF α en estas neuronas. **B)** El tratamiento periférico con infliximab reduce la activación de las células gliales y la síntesis de TNF α , lo que evita la activación de la vía NF- κ B y la síntesis de TNF α en las neuronas de Purkinje. Por otra parte, el tratamiento ex vivo de cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas con R7050 reduce la síntesis de TNF α en células gliales y neuronas indicando que está mediada por la activación de la vía TNFR1-TRAD/RIP1-NF- κ B. Los efectos de la hiperamonemia se indican mediante flechas rojas (↑). Los efectos del infliximab y R7050 se indican mediante el símbolo azul y verde respectivamente (⊘ ⊚).

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

1. LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR 2 DE ESFINGOSINA-1-FOSFATO (S1PR2) ESTÁ AUMENTADA EN CEREBELO DE RATAS HIPERAMONÉMICAS E INDUCE NEUROINFLAMACIÓN Y ALTERACIONES EN LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA Y GLICINÉRGICA

1.1. La expresión en membrana y la activación de S1PR2 aumentan en cerebelo de ratas hiperamonémicas, especialmente en las neuronas de Purkinje

La hiperamonemia crónica aumenta ($p < 0.001$) el contenido de S1PR2 en todo el cerebelo analizado por Western blot a $123 \pm 5\%$ respecto a las ratas control (Fig. 54 A-C). Analizamos por inmunohistoquímica los tipos celulares en los que se produce este aumento y encontramos que S1PR2 aumenta especialmente en las neuronas de Purkinje (Fig. 54 D-I) con un aumento en la intensidad de tinción hasta 58 ± 2 UI ($p < 0.0001$) en las ratas hiperamonémicas en comparación con las ratas control (46 ± 1 UI). La hiperamonemia también aumenta ($p < 0.005$) la expresión en membrana de S1PR2 al $142 \pm 11\%$ respecto a las ratas control (Fig. 55 A-C). Todos estos cambios se revierten añadiendo JTE-013 a los cortes ex vivo de cerebelo de ratas hiperamonémicas.

Hipotetizamos que estos cambios en S1PR2 se deben a la activación del receptor de TNF α TNFR1. Para evaluar esta hipótesis estudiamos si bloqueando las respuestas intracelulares a la activación de TNFR1 con R7050 se evitan los cambios en S1PR2 en cortes frescos de cerebelo de ratas hiperamonémicas ex vivo. R7050 no impidió el aumento del contenido total de S1PR2 en las neuronas de Purkinje o en todo el cerebelo, que se mantuvo en $134 \pm 19\%$ de las ratas control (Fig. 54 A, D, G).

Por el contrario, R7050 revirtió por completo el aumento de la expresión en membrana de S1PR2, volviendo a los niveles de las ratas control (Fig. 55 A). Como sólo el S1PR2 expuesto en la superficie de la membrana puede ser activado por S1P, estos datos indican que bloquear la transducción de señal asociada a la activación de TNFR1 evita por completo el aumento de la activación de S1PR2 en cerebelo y en neuronas de Purkinje en ratas hiperamonémicas.

Como se muestra en la Fig. 55 D-E, la doble inmunofluorescencia con calbindina muestra que TNFR1 se expresa en las neuronas de Purkinje. Por lo tanto, es posible que la activación de TNFR1 module directamente la expresión en membrana de S1PR2 en las neuronas de Purkinje.

Evaluamos si la hiperamonemia altera los niveles de S1P, el agonista de S1PR2. Los niveles de S1P en cerebelo son similares en ratas hiperamonémicas ($3,6 \pm 0,2$ ng/mg de

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

proteína) y en ratas control ($3,5 \pm 0,3$ ng/mg de proteína). Sin embargo, como la expresión en membrana del receptor aumenta notablemente en hiperamonemia, la activación de las vías de transducción de señales asociadas también aumenta. Una de las consecuencias de la activación de S1PR2 es la producción de la quimiocina CCL2 (Oskeritzian *et al.*, 2015).

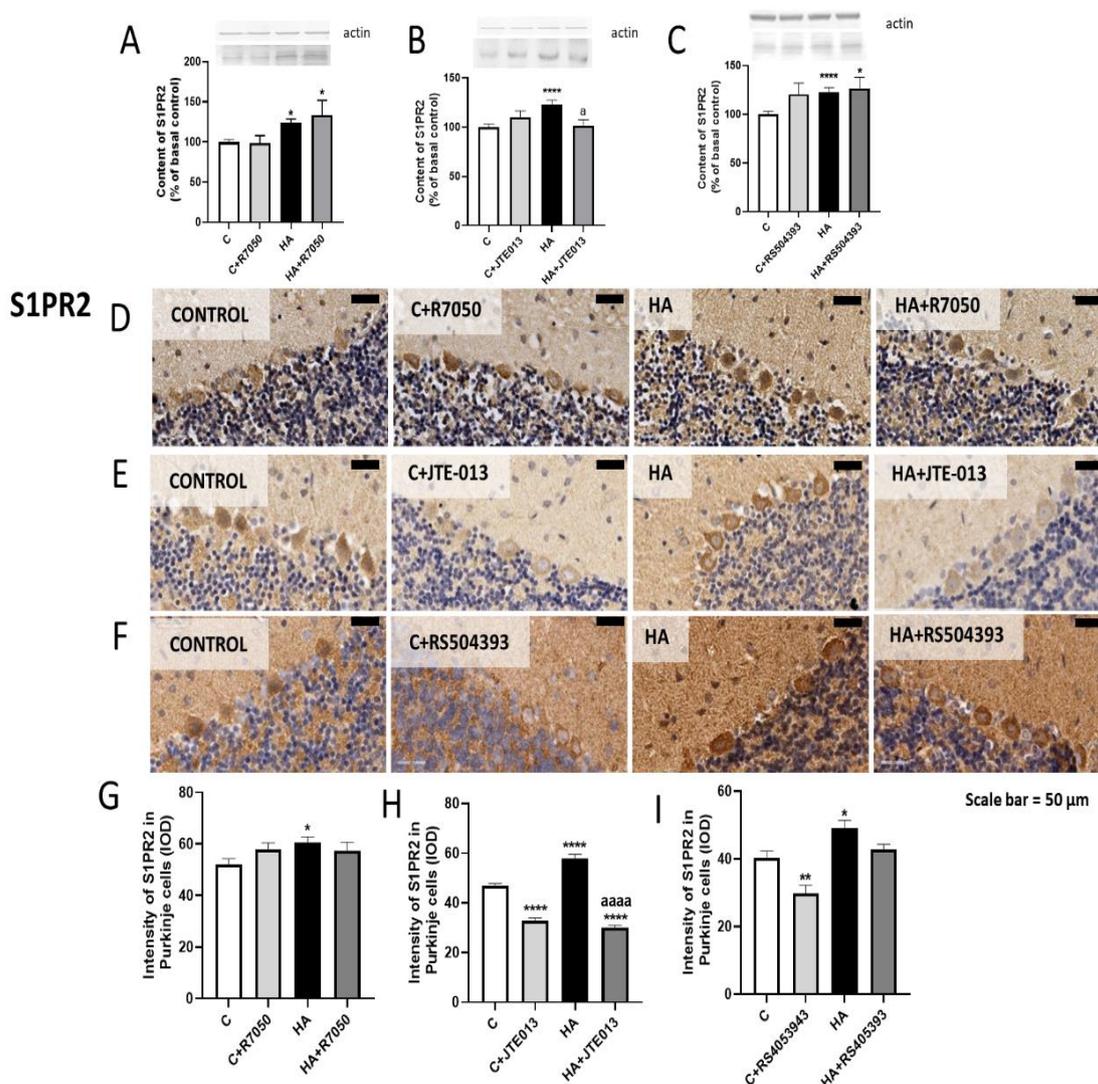


Figura 54. La hiperamonemia aumenta el contenido de S1PR2 en cerebelo, especialmente en las neuronas de Purkinje. Esto se invierte bloqueando S1PR2, pero no TNFR1 o CCR2. El contenido total de S1PR2 en el cerebelo de ratas control (C) e hiperamonémicas (HA) se analizó por Western blot (A-C). También se muestran los efectos de bloquear TNFR1 con R7050 (A), S1PR2 con JTE-013 (B) o CCR2 con RS504393 (C) en el contenido de S1PR2. Los efectos de la hiperamonemia y del bloqueo de TNFR1 con R7050 (D, G), S1PR2 con JTE-013 (E, H) o CCR2 con RS504393 (F, I) sobre el contenido de S1PR2 en neuronas de Purkinje se analizó por inmunohistoquímica con tinción DAB usando anticuerpos contra S1PR2 (D-I). Las imágenes representativas se muestran en D-F. El contenido de S1PR2 en las neuronas de Purkinje (G-I) se cuantificó como se describe en Materiales y métodos. Los valores son la media \pm SEM de 22-40 ratas por grupo en A-C y 6-8 ratas por grupo en D-I. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican mediante asterisco y de ratas hiperamonémicas se indican por "a". *

$p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$; a $p < 0.05$, aaaa $p < 0.0001$. Los datos fueron analizados utilizando un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de Turkey post hoc.

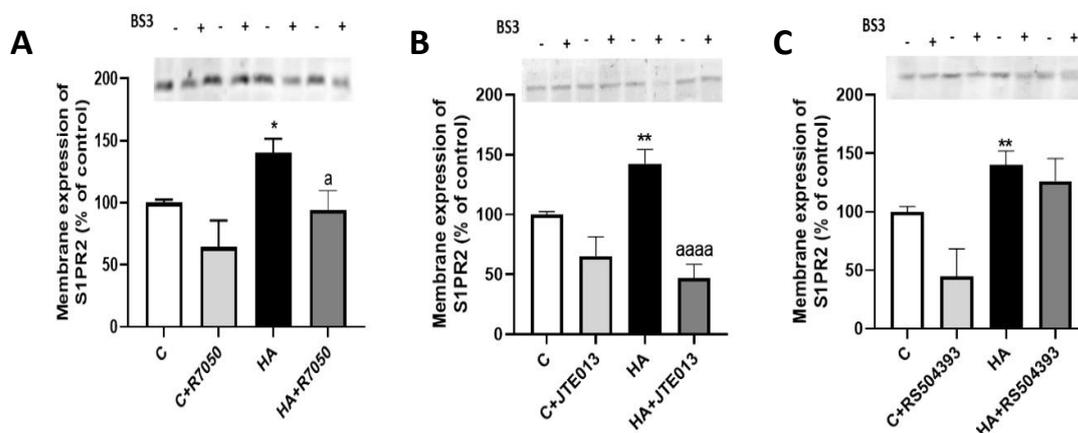


Figura 55. La hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de S1PR2 en cerebelo. Esto se invierte bloqueando TNFR1 o S1PR2, pero no CCR2. La expresión en membrana de S1PR2 (A-C) se analizó utilizando el procedimiento del BS3 en rodajas de ratas control e hiperamonémicas tratadas o no con R7050 (A), JTE-013 (B) o RS504393 (C). Los valores son la media \pm SEM de 12-21 ratas por grupo en A-C. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican mediante asterisco y de ratas hiperamonémicas se indican por "a". * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; a $p < 0.05$, aaaa $p < 0.0001$. Los datos fueron analizados utilizando un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de Turkey post hoc.

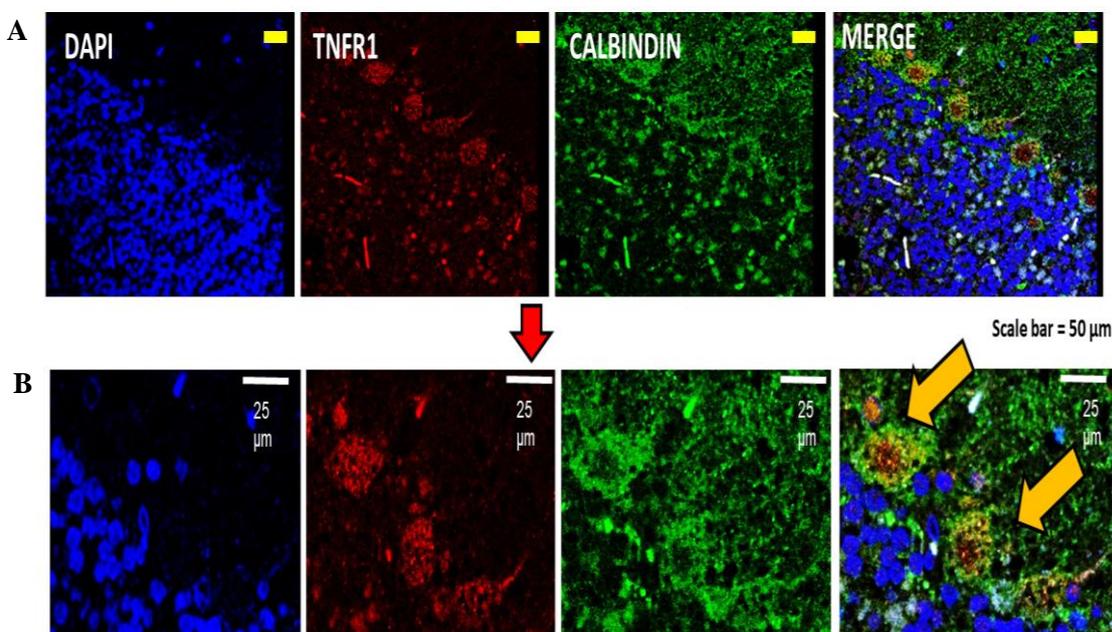


Figura 56. El receptor de TNF α TNFR1 se expresa especialmente en las neuronas de Purkinje en el cerebelo de ratas hiperamonémicas. A y B son imágenes de una doble tinción de inmunofluorescencia que muestra que TNFR1 colocaliza con calbindina (un marcador de neuronas de Purkinje).

1.2. En ratas hiperamonémicas, la activación de TNFR1 y el aumento de la expresión en membrana de S1PR2 inducen un aumento de CCL2,

especialmente en las neuronas de Purkinje, que contribuye a la activación de microglía

La hiperamonemia crónica aumenta ($p < 0.0001$) el contenido de CCL2 analizado por Western blot en todo el cerebelo a $129 \pm 5\%$ en comparación con las ratas control (Fig. 57 A-C). Además, el CCL2 aumenta especialmente en las neuronas de Purkinje a $135 \pm 5\%$ del control ($p < 0.0003$) analizado por inmunohistoquímica (Fig. 57 D-I). El aumento del CCL2 en las neuronas de Purkinje de ratas hiperamonémicas se revierte bloqueando S1PR2 con JTE-013, lo que disminuye el contenido al $66 \pm 7\%$ (Fig. 57 D, G), confirmando así que su aumento está mediado por la activación de S1PR2. JTE-013 también normalizó el contenido de CCL2 en todo el cerebelo al $101 \pm 5\%$ analizado por western blot (Fig. 57 A). El contenido de CCL2 en las neuronas de Purkinje en ratas hiperamonémicas también se redujo con el tratamiento R7050 al $82 \pm 7\%$ (Fig. 57 E, H) y en todo el cerebelo al $70 \pm 11\%$ de los controles (Fig. 57 B).

Se ha descrito que la sobreexpresión CCL2 en el cerebro promueve la activación de microglía y astrocitos (Joly-Amado *et al.*, 2020). Para evaluar si la activación excesiva de S1PR2 está implicada en la inducción de la activación de microglía y astrocitos en cerebelo de ratas hiperamonémicas evaluamos si esta se revierte bloqueando S1PR2 con JTE-013 en rodajas de cerebelo de ratas hiperamonémicas *ex vivo*.

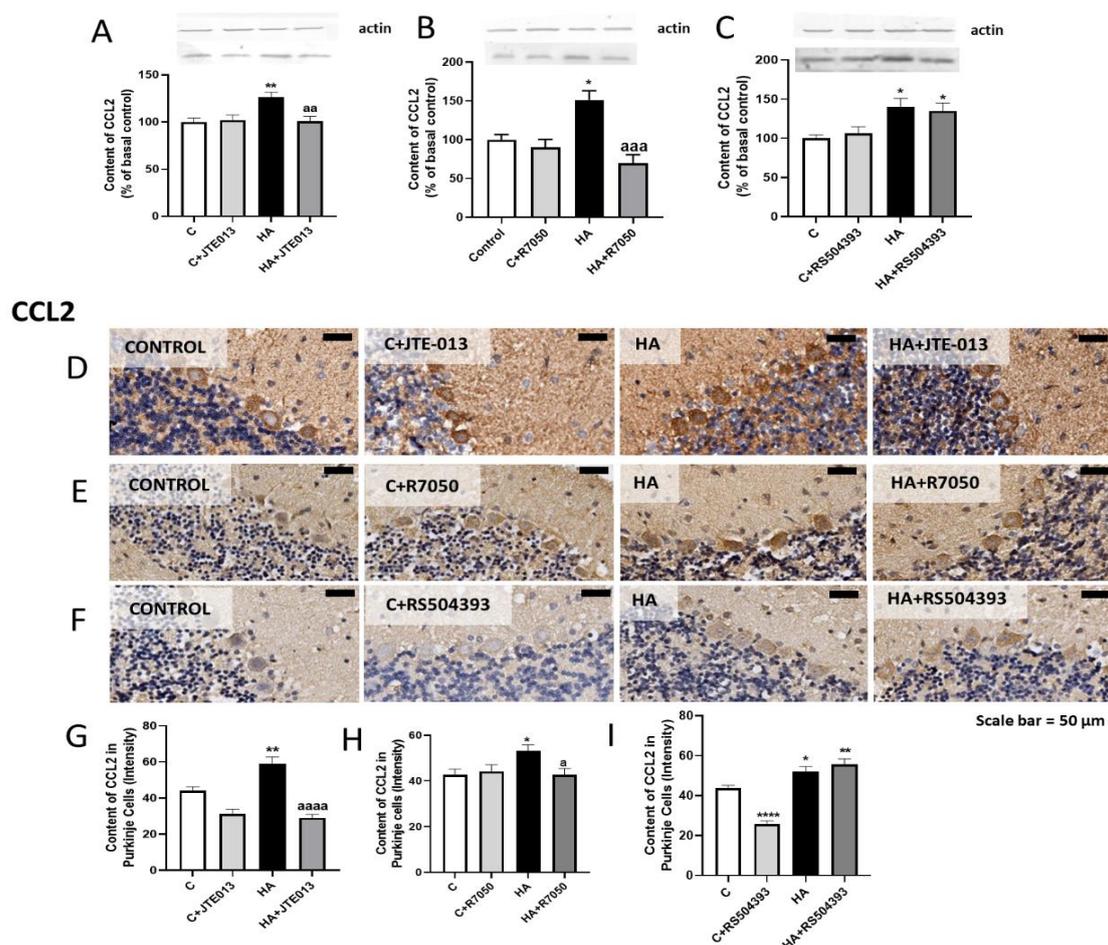


Figura 57. La hiperamonemia aumenta el contenido de CCL2 en cerebelo, especialmente en las neuronas de Purkinje. Esto se revierte bloqueando TNFR1 o S1PR2, pero no CCR2. El contenido total de CCL2 en cerebelo de ratas control (C) e hiperamonémicas (HA) se analizó por Western blot (A-C). También se muestran los efectos sobre el contenido de CCL2 de bloquear TNFR1 con R7050 (A), S1PR2 con JTE-013 (B) o CCR2 con RS504393 (C). El contenido de CCL2 en las neuronas de Purkinje y los efectos del bloqueo de TNFR1 con R7050 (D,G), S1PR2 con JTE-013 (E,H) o CCR2 con RS504393 (F,I) se analizó por inmunohistoquímica usando anticuerpos contra CCL2 (D-I). Las imágenes representativas se muestran en D-F. El contenido de CCL2 en las neuronas de Purkinje (G-I) se cuantificó como se describe en Métodos. Los valores son la media±SEM de 22-32 ratas por grupo en A-C y 6-8 ratas por grupo en D-I. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican mediante asterisco y de ratas hiperamonémicas se indican por "a". * p<0.05, ** p<0.01, **** p<0.0001; a p<0.05, aa p<0.01, aaa p<0.001, aaaa p<0.0001. Los datos fueron analizados utilizando un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de Turkey post hoc.

1.3. La activación de S1PR2 desempeña un papel en la inducción de neuroinflamación y activación de microglía y astrocitos en el cerebelo de ratas hiperamonémicas

IBA-1

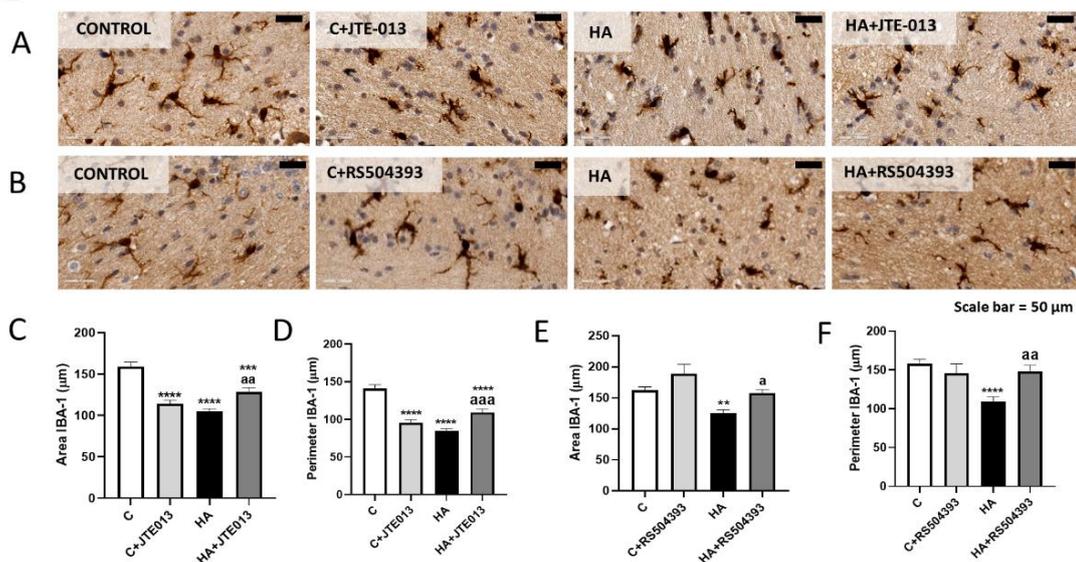


Figura 58. El bloqueo de S1PR2 con JTE-013 o de CCR2 con RS504393 reduce la activación de microglía en la sustancia blanca del cerebelo de ratas hiperamonémicas. La inmunohistoquímica se realizó en rodajas de cerebelo de ratas control e hiperamonémicas tratadas o no con JTE-013 o RS504393 con tinción DAB utilizando anticuerpos contra IBA1 (A-B). Para analizar la activación de microglía, se midieron el área (C, E) y el perímetro (D, F) utilizando el software de análisis ImageJ. Los valores son la media±SEM de 6-8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican mediante asterisco y de ratas hiperamonémicas se indican por "a". ** p<0.01, ***p<0,001, **** p<0.0001; a p<0.05, aa p<0.01, aaa p<0.001. Los datos fueron analizados utilizando un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de Turkey post hoc.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se muestra en la Fig. 58 A-F, las ratas hiperamonémicas muestran activación de la microglía en la sustancia blanca del cerebelo. El área de la microglía en ratas hiperamonémicas se redujo ($p < 0.0001$) a $105 \pm 3 \mu\text{m}^2$ en comparación con $159 \pm 5 \mu\text{m}^2$ en las ratas control (Fig. 58 C-F). El tratamiento con JTE-013 aumentó ($p < 0.001$) el área de microglía en ratas hiperamonémicas a $129 \pm 5 \mu\text{m}^2$ (Fig. 58 A, C), lo que indica la disminución de la activación microglial. Se obtuvieron resultados similares para el perímetro de la microglía. El perímetro de microglía se redujo ($p < 0.0001$) a $85 \pm 3 \mu\text{m}$ en comparación con $141 \pm 5 \mu\text{m}$ en ratas control (Fig. 58 D). El tratamiento con JTE-013 aumentó ($p < 0.002$) el perímetro de microglía en ratas hiperamonémicas a $109 \pm 4 \mu\text{m}$, lo que indica una disminución de la activación microglial (Fig. 58 D).

Las ratas hiperamonémicas también muestran activación de astrocitos en cerebelo, el área teñida por GFAP es del $30 \pm 2\%$, que es mayor ($p < 0.0006$) que en las ratas control ($22 \pm 1\%$) (Fig. 59 A-D). El tratamiento con JTE-013 redujo ($p < 0.0001$) el área teñida por GFAP al $19 \pm 1\%$, lo que indica que se revierte la activación de astrocitos en ratas hiperamonémicas (Fig. 59 A, C).

Estos datos indican que el aumento de la activación de S1PR2 en hiperamonemia contribuye a la activación de microglía y astrocitos, que se reducen al bloquear S1PR2. Esto sugiere que la activación de S1PR2 en neuronas de Purkinje induce la liberación de algún factor que induce la activación glial.

Se ha propuesto que el CCL2 contribuye a la activación microglial en el dolor neuropático a través de la activación de su receptor CCR2 en microglía. Para evaluar si el CCL2 liberado de las neuronas de Purkinje en ratas hiperamonémicas media la activación de microglía y / o astrocitos estudiamos sí bloqueando el receptor CCR2 ex vivo con RS504393 reduce estas activaciones. Como se muestra en la Fig. 58 B, E y F, este tratamiento revirtió por completo la activación microglial en ratas hiperamonémicas, aumentando ($p < 0.004$) el área de microglía a $158 \pm 6 \mu\text{m}^2$, y el perímetro a $148 \pm 8 \mu\text{m}$ (Fig. 58 E, F), similar a las ratas control. Por el contrario, RS504393 no revirtió la activación de los astrocitos, el área teñida por GFAP se mantuvo en $31 \pm 1\%$ (Fig. 59 B, D).

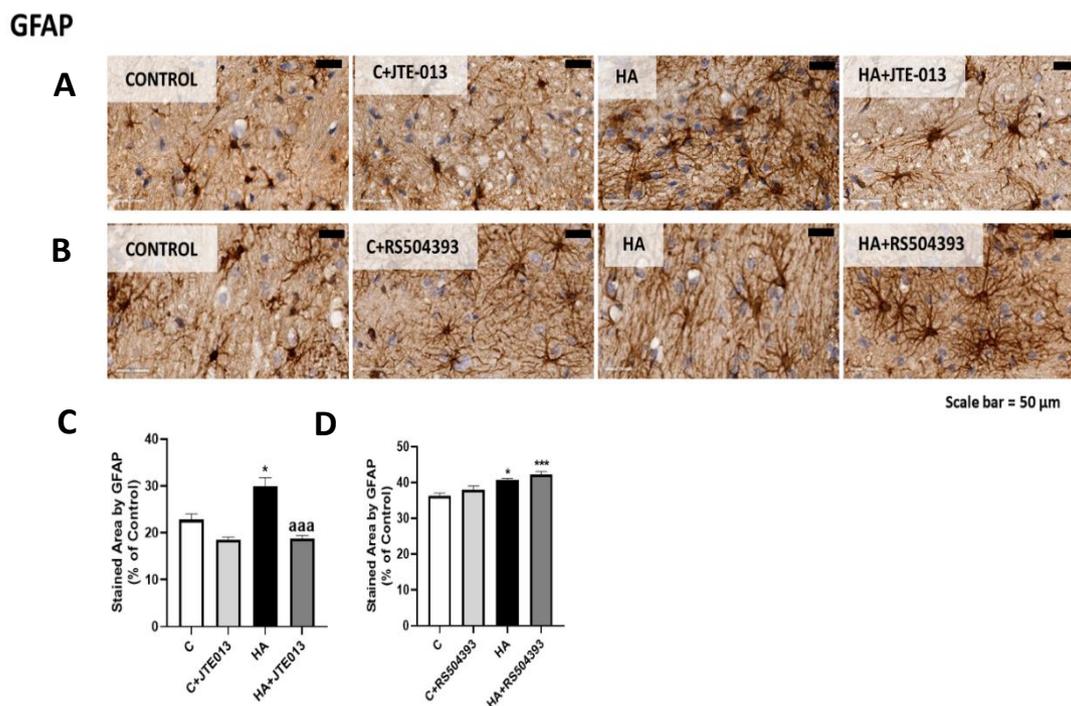


Figura 59. El bloqueo de S1PR2 con JTE-013 reduce la activación de astrocitos en la sustancia blanca del cerebelo de ratas hiperamonémicas. Sin embargo, el bloqueo de CCR2 con RS504393 no revierte la activación de astrocitos. La inmunohistoquímica se realizó en rodajas de cerebelo de ratas control e hiperamonémicas tratadas o no con JTE-013 o RS504393 con tinción DAB utilizando anticuerpos contra GFAP (A-B). El área teñida por GFAP se midió como un indicador de activación de astrocitos (C-D). Los valores son la media \pm SEM de 6-8 ratas por grupo. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican mediante asterisco y de ratas hiperamonémicas se indican por "a". * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; a $p < 0.05$, aaa $p < 0.001$. Los datos fueron analizados utilizando un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de Turkey post hoc.

Estos datos indican que la hiperamonemia aumenta la expresión de membrana de S1PR2, aumentando su activación, principalmente en las neuronas de Purkinje. Esto media la activación de microglía y astrocitos, que se evitan bloqueando el S1PR2 con JTE-013. La activación de la microglía estaría mediada por la liberación de CCL2 por las neuronas de Purkinje, que activa su receptor CCR2 en microglía conduciendo a la activación microglial. La activación de los astrocitos estaría mediada por un proceso diferente, sin involucrar al receptor CCR2.

La neuroinflamación inducida por hiperamonemia altera la neurotransmisión GABAérgica en el cerebelo, lo que conduce a la incoordinación motora y a una menor capacidad de aprendizaje (Cauli *et al.*, 2009; Gonzalez-Usano *et al.*, 2014; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a; Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a). Por lo tanto, otro objetivo de esta tesis era identificar las vías de transducción de señales mediante las cuales la activación de esta vía S1PR2-CCL2-CCR2 podría contribuir a inducir la neuroinflamación y alterar la neurotransmisión en el cerebelo de ratas hiperamonémicas. Analizamos los pasos de la vía que se muestra en Fig. 60.

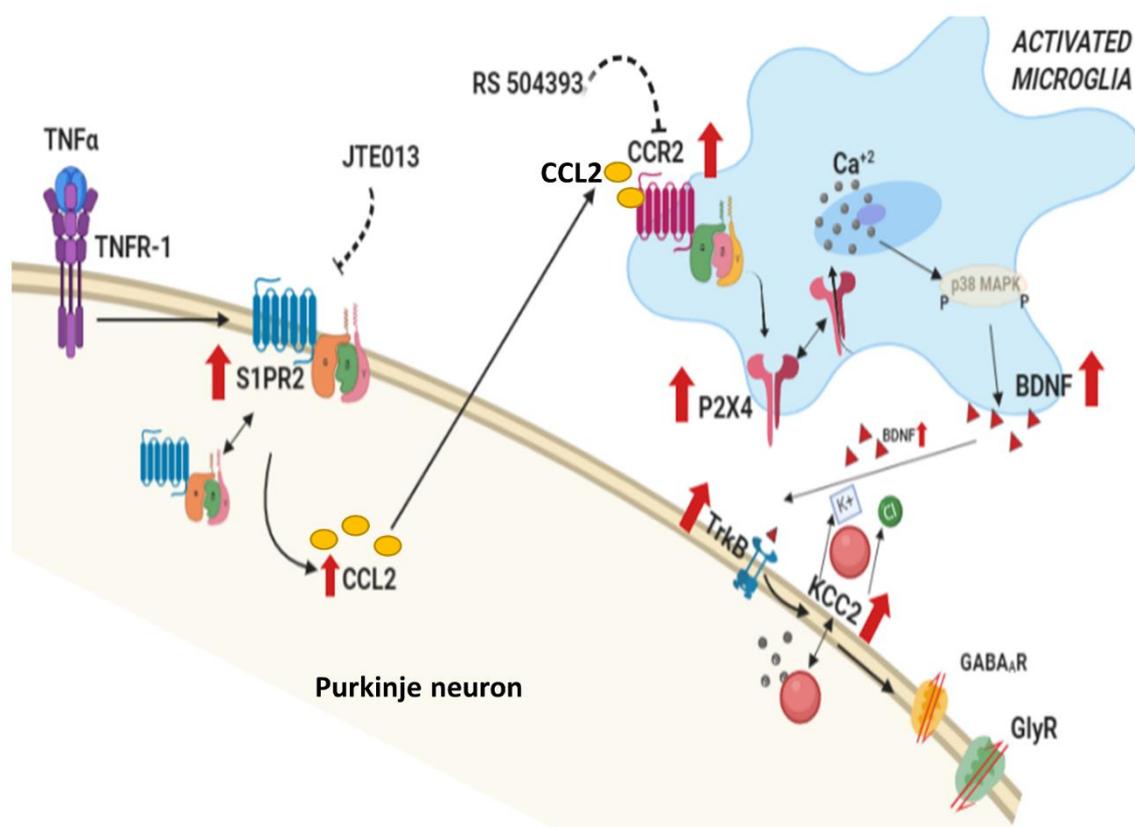


Figura 60. Vía TNFR1-S1PR2-CCR2-TrkB propuesta por la cual la hiperamonemia induce neuroinflamación y altera la neurotransmisión inhibitoria en el cerebelo de ratas hiperamonémicas. La expresión en membrana y la activación de TNFR1 y S1PR2 se producen principalmente en las neuronas de Purkinje de ratas hiperamonémicas, lo que conduce a una mayor formación de CCL2. El CCL2 liberado por las neuronas de Purkinje activa su receptor CCR2 en microglía, lo que conduce a la activación de microglía con aumento de la expresión en membrana de CCR2 y de receptores P2X4R y aumento de la síntesis de BDNF. El BDNF liberado por la microglía activada, activa TrkB y las vías de transducción asociadas en neuronas de Purkinje, lo que conduce a una mayor expresión en membrana de KCC2, que altera el gradiente transmembrana de Cl⁻, produciendo una alteración en la neurotransmisión GABAérgica y glicinérgica. Los efectos de la hiperamonemia se indican mediante flechas rojas (↑).

1.4. El aumento de la expresión en membrana de P2X4R en ratas hiperamonémicas es una consecuencia de la activación de S1PR2 en las neuronas de Purkinje, la liberación de CCL2 y la activación de CCR2 en microglía

Como se muestra en la Fig. 61 A-C, la expresión en membrana de P2X4R aumenta en ratas hiperamonémicas al $142 \pm 13\%$ de las ratas control ($p < 0.02$) y este aumento se revierte bloqueando el S1PR2 con JTE-013, que reduce ($p < 0.0025$) la expresión en membrana de P2X4R al $58 \pm 22\%$ (Fig. 61 A). El bloqueo del receptor CCR2 o de TNFR1 con RS504393 o R7050, también reduce ($p < 0.0001$) la expresión en membrana de P2X4R al $64 \pm 6\%$ y $36 \pm 15\%$ de las ratas control, respectivamente (Fig. 61 B, C).

1.5. La hiperamonemia aumenta la fosforilación y la actividad de la MAPKp38, pero por mecanismos independientes de S1PR2 y de CCR2 y dependientes de TNFR1

La activación de MAPKp38 se asocia al aumento de la fosforilación en los residuos Thr180/Tyr182. La hiperamonemia aumenta ($p < 0,007$) la fosforilación de p38 al $143 \pm 8\%$ en comparación con las ratas control (Fig. 61 D-F). Sin embargo, esta fosforilación no se revierte con los tratamientos con JTE-013 o RS504393 y la fosforilación se mantuvo en $153 \pm 21\%$ y $149 \pm 22\%$ respectivamente (Fig. 61 D, E). En contraste, R7050 redujo ($p < 0.001$) la fosforilación MAPKp38 a niveles normales ($109 \pm 18\%$ de las ratas control) (Fig. 61 F).

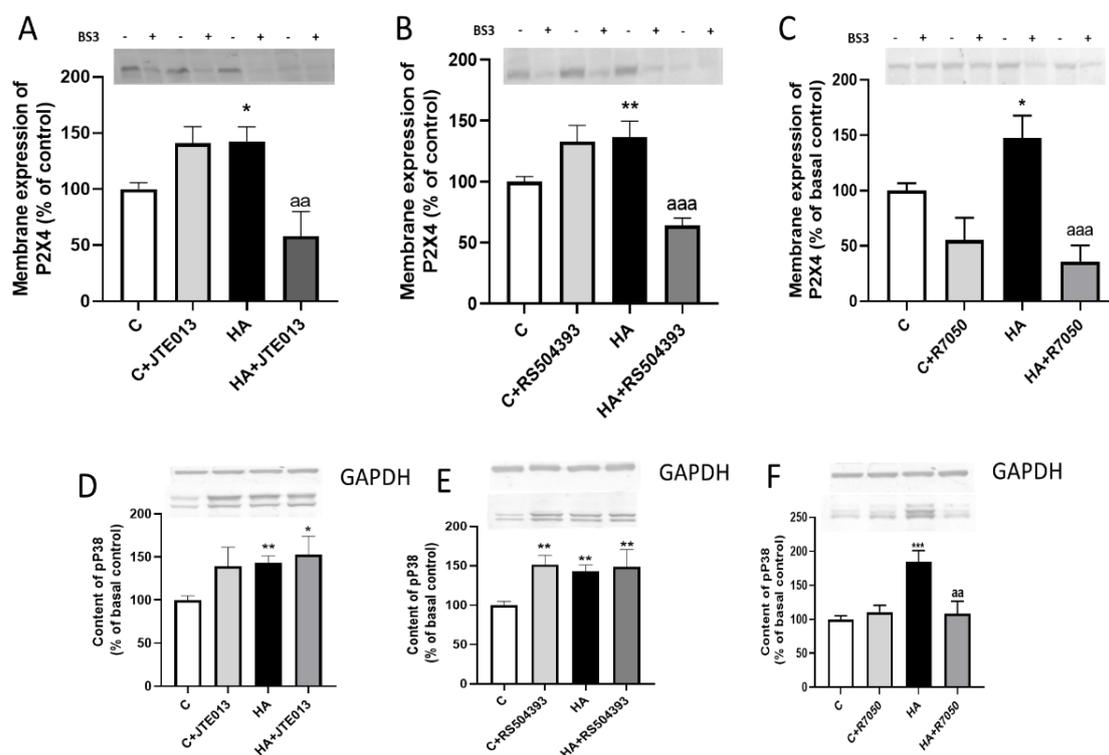


Figura 61. La hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de P2X4R y la fosforilación de p38 en cerebelo. El bloqueo de S1PR2 y CCR2 normaliza la expresión en membrana de P2X4R, pero no la fosforilación p38. La expresión en membrana de P2X4R (A-C) se analizó mediante el procedimiento del BS3, como se describe en Métodos, en cortes de ratas control e hiperamonémicas (HA). También se muestran los efectos de bloquear S1PR2 con JTE-013 (A), CCR2 con RS504393 (B) o TNFR1 con R7050 (C), sobre la expresión en membrana de P2X4R. La activación de p38 se asocia al aumento de la fosforilación en los residuos Thr180/Tyr182. El contenido de MAPKp38 fosforilado (pP38) fue analizado en cortes de ratas control e hiperamonémicas (D-F) tratadas o no con JTE-013 (A), RS504393 (B) o R7050 (C). GAPDH se utilizó como control de carga. Los valores son media \pm SEM de 13-38 ratas por grupo en A-C y 12-32 ratas por grupo en D-F. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican mediante asterisco y de ratas hiperamonémicas se indican por "a". * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; aa $p < 0.01$, aaa $p < 0.001$. Los datos fueron analizados utilizando un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de Turkey post hoc.

1.6. La hiperamonemia aumenta el contenido de BDNF en microglía en el cerebelo, pero no en las neuronas de Purkinje

Una de las vías por las que CCL2-CCR2 modula la neuroinflamación y la neurotransmisión es mediante la liberación de BDNF por la microglía activada. Estudiamos el contenido y la expresión de BDNF en ratas control e hiperamonémicas.

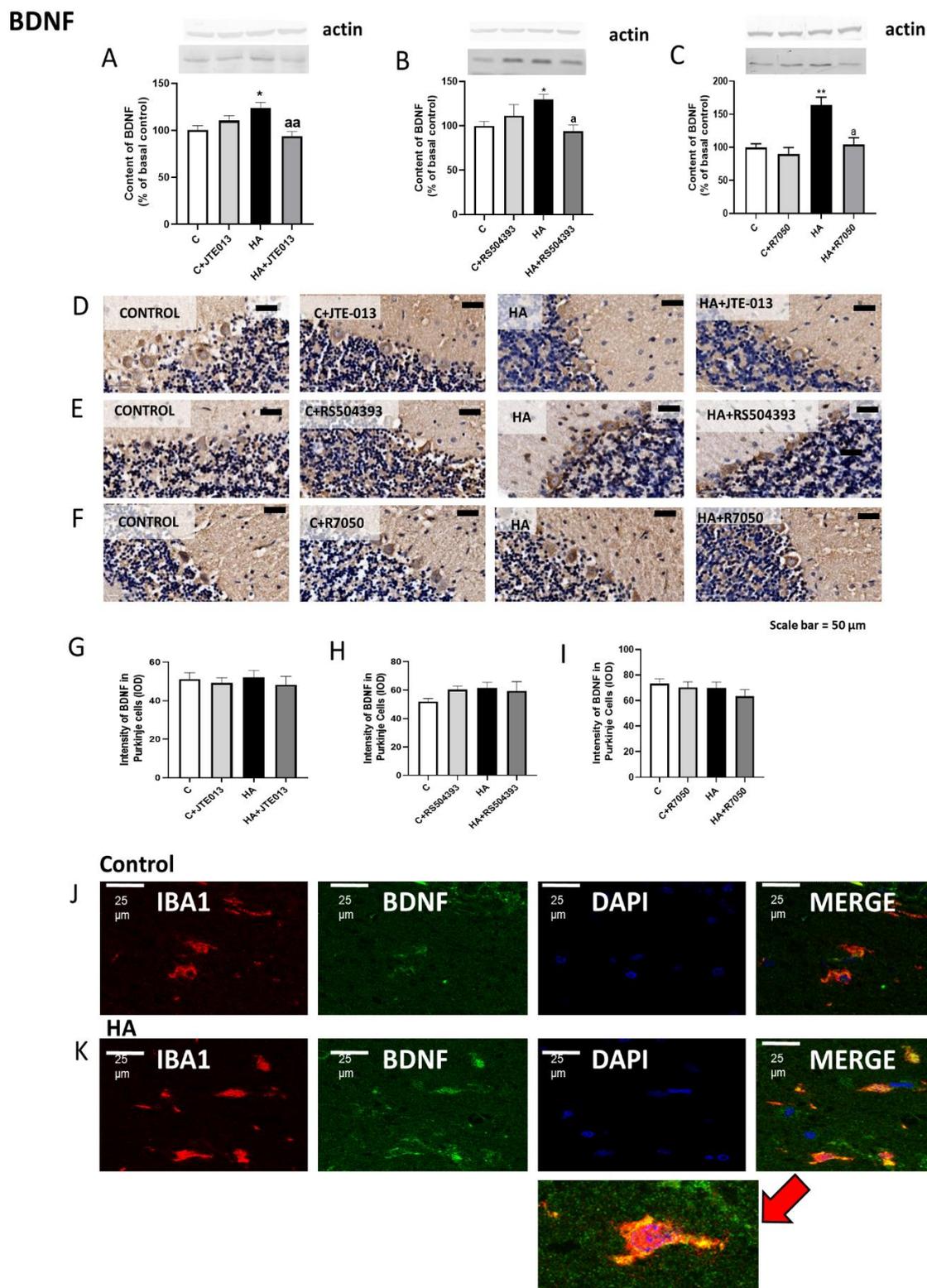


Figura 62. La hiperamonemia aumenta el contenido de BDNF en microglía en el cerebelo, pero no en las neuronas de Purkinje. El aumento de BDNF se revierte bloqueando S1PR2, CCR2 o TNFR1. El contenido total de BDNF en el cerebelo de ratas control (C) e hiperamonémicas (HA) se analizó por Western blot (A-C). También se muestran los efectos de bloquear S1PR2 con JTE-013 (A), CCR2 con RS504393 (B) o TNFR1 con R7050 (C) sobre el contenido de BDNF. Los efectos de la hiperamonemia y del bloqueo de S1PR2 con JTE-013 (D, G), CCR2 con RS504393 (E, H) o TNFR1 con R7050 (F, I) sobre el contenido de BDNF en las neuronas de Purkinje se analizaron por inmunohistoquímica con tinción DAB utilizando anticuerpos contra BDNF (D-I). Las imágenes representativas se muestran en D-F. El contenido de BDNF en las neuronas de Purkinje (G-I) se cuantificó como se describe en Métodos. BDNF se incrementa principalmente en células microgliales de ratas hiperamonémicas (J-K). La tinción de la doble fluorescencia se realizó utilizando anti-BDNF y anti-IBA1 como se describe en los métodos. Las imágenes representativas de la tinción de la doble fluorescencia muestran que BDNF colocaliza con microglía. Los valores son \pm SEM de 32-50 ratas por grupo en A-C y 6-8 ratas por grupo en G-I. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican mediante asterisco y de ratas hiperamonémicas se indican por "a". * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; a $p < 0.05$, aa $p < 0.01$. Los datos fueron analizados utilizando un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de Turkey post hoc.

El contenido de BDNF no aumentó en las neuronas de Purkinje en ratas hiperamonémicas (Fig. 62 D-I), pero aumentó en microglía (Fig. 62 J-K) y en cerebelo entero ($p < 0.02$) a $126 \pm 6\%$ de las ratas control (Fig. 62 A-C). Este aumento del contenido total de BDNF se revirtió por completo mediante el tratamiento con JTE-013 ($94 \pm 5\%$, $p < 0.001$) (Fig. 62 I), RS504393 ($94 \pm 5\%$, $p < 0.001$) (Fig. 62 J) o R7050 ($104 \pm 10\%$, $p < 0.002$) (Fig. 62 K), indicando que está mediado por la activación de S1PR2, liberación de CCL2 por las neuronas de Purkinje y activación de CCR2, pero no por activación de la MAPK p38. Sin embargo, no se observan diferencias del contenido de BDNF en las neuronas de Purkinje de ratas hiperamonémicas (52 ± 3 UI; Fig. 62 D-F) con respecto a las ratas control (51 ± 3 UI; Fig. 62 D-F). El contenido de BDNF en las neuronas de Purkinje en ratas hiperamonémicas no cambió con los tratamientos JTE-013 (48 ± 4 UI; Fig. 62 D, G), RS504393 (59 ± 7 UI; Fig. 62 E, H) y R7050 (63 ± 5 UI; Fig. 62 F, I).

1.7. La activación de S1PR2, CCL2, activación del CCR2 en microglía y la activación de TrkB por el aumento de los niveles de BDNF conducen a un aumento de la expresión en membrana de KCC2

La liberación de BDNF por la microglía activada en hiperamonemia, activa al receptor TrkB modulando el cotransportador KCC2 y la concentración del Cl^- intracelular. La actividad y expresión en membrana de KCC2 depende del nivel de activación de TrkB, por eso analizamos la expresión en membrana de KCC2.

La hiperamonemia aumenta ($p < 0,005$) la expresión en membrana de KCC2 al $135 \pm 12\%$ de las ratas control (Fig. 63 A-C). Este aumento se revierte por completo bloqueando S1PR2 con JTE-013 ($45 \pm 9\%$, $p < 0.0001$) (Fig. 63 A), CCR2 con RS504393 ($96 \pm 12\%$, $p < 0.003$) (Fig. 63 B) o la señalización TNFR1 con R7050 ($70 \pm 14\%$, $p < 0.009$) (Fig. 63 C).

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hipotesizamos que los cambios en KCC2 estarían mediados por la activación de TrkB por BDNF en neuronas de Purkinje (Huang *et al.*, 2012). Analizamos los efectos de la hiperamonemia sobre la cantidad y expresión en membrana de TrkB. La hiperamonemia aumenta la cantidad total de TrkB en todo el cerebelo al $139 \pm 8\%$ de las ratas control ($p < 0.0001$) (Fig. 63 D-F). Los tratamientos con JTE-013 ($100 \pm 10\%$, $p < 0.01$) (Fig. 63 D), RS504393 ($79 \pm 13\%$, $p < 0.01$) (Fig. 63 E) o R7050 ($130 \pm 10\%$, $p < 0.9$) (Fig. 63 F) redujeron la cantidad de TrkB en cerebelo de ratas hiperamonémicas, a niveles similares a los de las ratas control.

La expresión en membrana de TrkB aumentó en ratas hiperamonémicas al $154 \pm 13\%$ ($p < 0,0006$) en comparación a las ratas control (Fig. 63 G-I) y este aumento se revirtió por el tratamiento con JTE-013 ($91 \pm 30\%$, $p < 0.02$) (Fig. 63 G), RS504393 ($40 \pm 3\%$, $p < 0.004$) (Fig. 63 H) o R7050 ($53 \pm 11\%$, $p < 0.0001$) (Fig. 63 I).

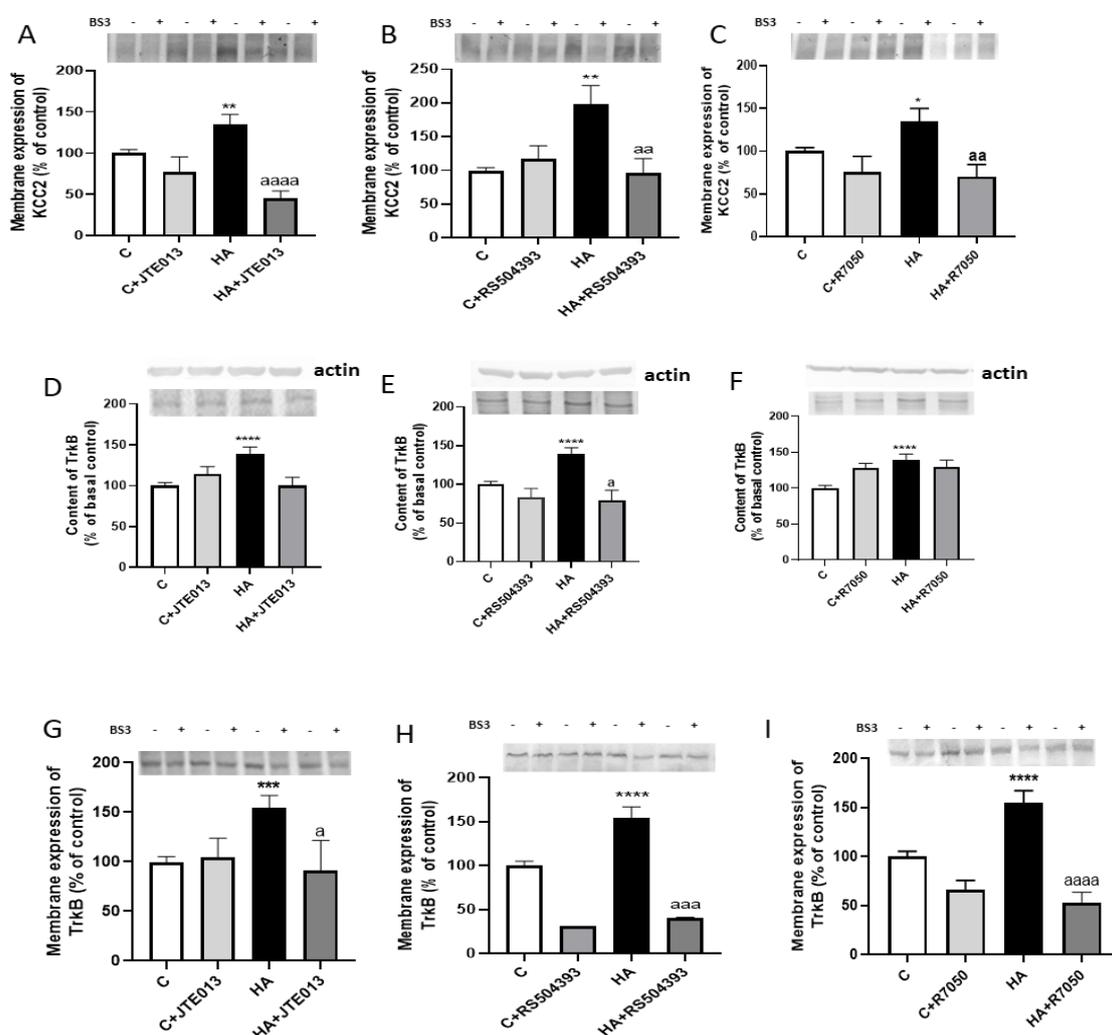


Figura 63. La hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de KCC2 y el contenido y la expresión en membrana de TrkB en el cerebelo. El bloqueo de S1PR2, CCR2 o TNFR1 revierte estos efectos. La expresión en membrana de KCC2 (A-C) y TrkB (G-I) se analizaron mediante el procedimiento del BS3 en rodajas de ratas control (C) e hiperamonémicas (HA). También se muestran los efectos de bloquear S1PR2 con JTE-013 (A, G), CCR2 con RS504393 (B, H) o TNFR1 con R7050 (C, I), sobre la expresión en membrana de KCC2 o TrkB. El

contenido total de TrkB fue analizado por western blot en rodajas de ratas control e hiperamonémicas (D-F) tratadas o no con JTE-013 (D), RS504393 (E) o R7050 (F). La actina fue utilizada como control de carga. Los valores son la media \pm SEM de 12-50 ratas por grupo en (A-C), 12-32 ratas en (D-F) y 12-29 ratas por grupo en (G-I). Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican mediante asterisco y de ratas hiperamonémicas se indican por "a". * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; a $p < 0.05$, aa $p < 0.01$, aaa $p < 0.001$, aaaa $p < 0.0001$. Los datos fueron analizados utilizando un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de Turkey post hoc (en A-F) y la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis seguida de la prueba post hoc de Dunnett (en G-I).

Para comprobar el posible papel de la activación de TrkB por los niveles aumentados de BDNF en hiperamonemia, analizamos los efectos de bloquear el receptor TrkB con el antagonista ANA12 sobre todos los pasos del proceso resumido en la Fig. 60. ANA12 no revirtió el aumento del CCL2 en ratas hiperamonémicas, que se mantuvo en $131 \pm 9\%$ de las ratas control (Fig. 64 A), ni el aumento de la expresión en membrana de CCR2 ($128 \pm 9\%$) (Fig. 64 B) o P2X4R ($170 \pm 22\%$) (Fig. 64 C) o el aumento del contenido BDNF ($119 \pm 10\%$) (Fig. 64 D).

Por el contrario, ANA12 revirtió el aumento en el contenido de TrkB en ratas hiperamonémicas ($105 \pm 7\%$, $p < 0.001$) (Fig. 64 E) y de la expresión en membrana de TrkB ($65 \pm 5\%$, $p < 0.001$) (Fig. 64 F) y KCC2 ($41 \pm 28\%$, $p < 0.006$) (Fig. 64 G).

ANA12 revirtió tanto el contenido como la expresión en membrana de TrkB y la expresión en membrana de KCC2. Esto indica que el bloqueo de TrkB con ANA12 no impidió ninguno de los efectos que ocurren antes de la activación de TrkB (Ver Fig. 60). Estos datos indican que el aumento de la expresión en membrana de TrkB y KCC2 en el cerebelo de ratas hiperamonémicas es una consecuencia de la activación por BDNF de TrkB en las neuronas de Purkinje.

El aumento de la expresión en membrana de KCC2 aumentaría su capacidad de extraer Cl^- de las neuronas de Purkinje hacia el medio extracelular. Esto aumentaría el gradiente de Cl^- entre el exterior y el interior de las neuronas, lo que contribuiría a alterar la neurotransmisión GABAérgica en el cerebelo y a la inducción de incoordinación motora en ratas hiperamonémicas.

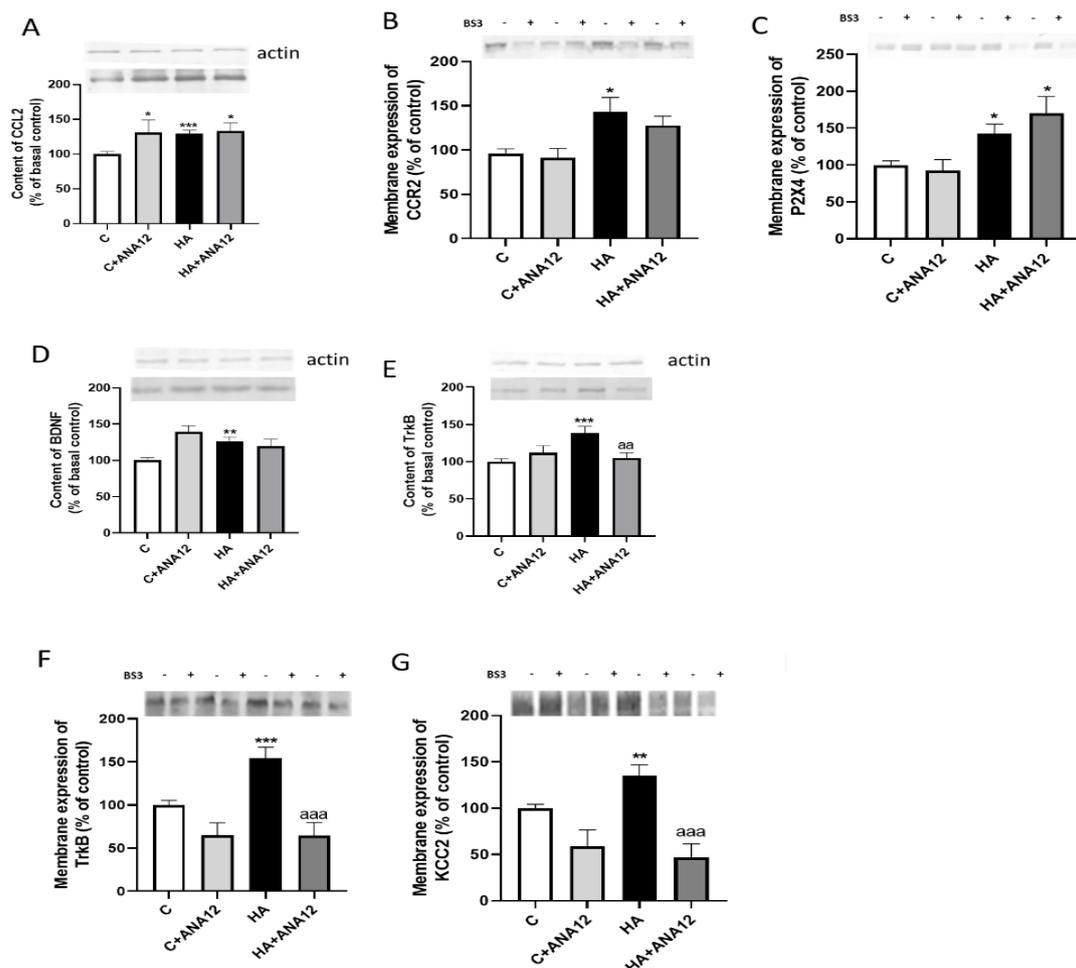


Figura 64. El bloqueo de TrkB con ANA12 revierte el aumento de la expresión en membrana de KCC2 y TrkB y en el contenido de TrkB, pero no en los pasos anteriores de la vía. El contenido total de CCL2 (A), BDNF (D) y TrkB (E) se analizó mediante western blot utilizando la actina como control de carga. La expresión en membrana de CCR2 (B), P2X4R (C), TrkB (F) y KCC2 (G) se analizaron utilizando el procedimiento del BS3 en cortes de cerebelo de ratas control (C) e hiperamónémicas (HA), usando el tratamiento con ANA12 para bloquear TrkB. Los valores son la media \pm SEM de 12-42 ratas por grupo en (A, D y E) y 12-24 ratas por grupo (B, C, F y G). Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican mediante asterisco y de ratas hiperamónémicas se indican por "a". * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; aa $p < 0.01$, aaa $p < 0.001$. Los datos fueron analizados utilizando un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de Turkey post hoc.

1.8. El bloqueo de S1PR2 con JTE-013 in vivo revierte la activación de la vía S1PR2-CCR2-BDNF-TrkB-KCC2 y restaura la coordinación motora en ratas hiperamónémicas

Para evaluar si el aumento de la activación de S1PR2 juega un papel en la incoordinación motora en ratas hiperamónémicas, ensayamos si el bloqueo de S1PR2 in vivo mediante la administración continua de JTE-013 a través de mini-bombas osmóticas restaura la coordinación motora en ratas hiperamónémicas. Las ratas hiperamónémicas muestran incoordinación motora en el test del Beam Walking (Fig. 65 A). Realizaron más resbalones ($1,1 \pm 0,1$, $p < 0,05$) que las ratas control ($0,5 \pm 0,1$). El tratamiento con JTE-013

restauró la coordinación motora en ratas hiperamonémicas a $0,6 \pm 0,1$ resbalones que no es diferente de las ratas control (Fig. 65 A).

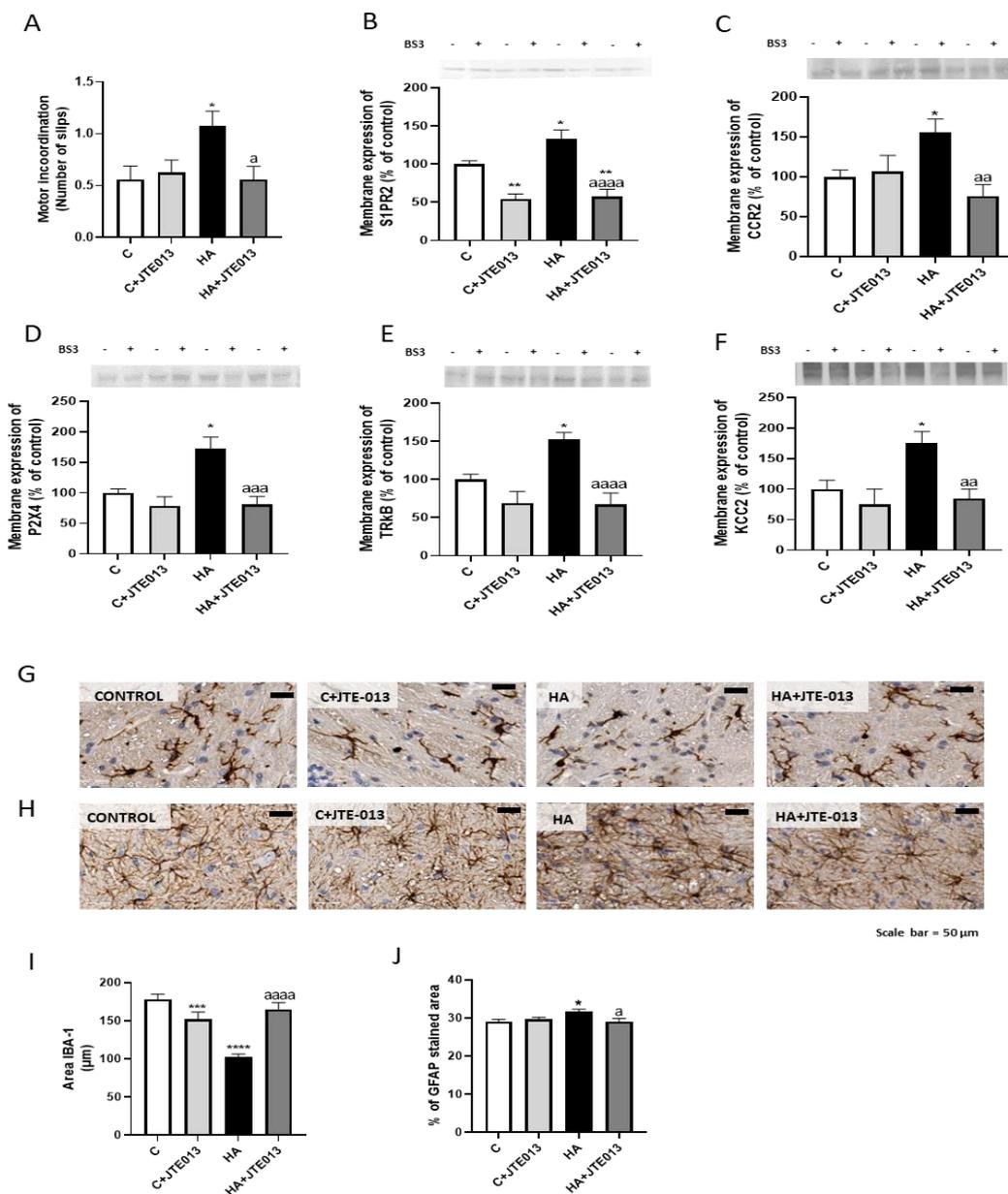


Figura 65. El bloqueo de S1PR2 con JTE-013 in vivo revierte la activación de la vía S1PR2-CCR2-BDNF-TrkB-KCC2 y restaura la coordinación motora en ratas hiperamonémicas.

A: Se sometieron ratas control (C) e hiperamonémicas (HA) tratadas con DMSO o JTE-013 a la prueba del Beam Walking. El número de resbalones se muestra como una medida de incoordinación motora. El tratamiento in vivo con JTE-013 también revirtió el aumento en la expresión en membrana de S1PR2 (B), CCR2 (C), P2X4R (D), TrkB (E) y KCC2 (F), así como la activación de microglía (G e I) y de astrocitos (H y J). Los valores son la media \pm SEM de 14-16 ratas por grupo en (A), 12-32 ratas en (B-F) y 6-8 ratas por grupo en (G-J). Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con un asterisco y de las ratas hiperamonémicas se indican con una "a". * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; a $p < 0.05$, aa $p < 0.01$, aaa $p < 0.001$, aaaa $p < 0.0001$. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de Turkey post hoc (en A-C, F, H y J) y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba post hoc de Dunnett (en D-E, G y I).

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tratamiento in vivo con JTE-013 también revirtió el aumento en la expresión en membrana de S1PR2 (Fig. 65 B), CCR2 (Fig. 65 C), P2X4R (Fig. 65 D), TrkB (Fig. 65 E) y KCC2 (Fig. 65 F), así como la activación de microglía (Fig. 65 G e I) y astrocitos (Fig. 65 H y J), lo que confirma que los resultados obtenidos anteriormente ex vivo reproducen los efectos del bloqueo del S1PR2 in vivo.

Estos resultados muestran que la hiperamonemia crónica aumenta la activación de S1PR2 al aumentar su expresión en membrana. Esto conduce a un aumento de los niveles de CCL2, especialmente en las neuronas de Purkinje. El CCL2 liberado por las neuronas activa el receptor CCR2 en microglía, lo que conduce a la activación de la microglía y al aumento de la expresión en membrana de P2X4R y del contenido de BDNF en microglía, que se libera y activa TrkB en las neuronas de Purkinje, lo que aumenta la expresión en membrana de KCC2 (Fig. 60).

DISCUSIÓN

La hiperamonemia aumenta tanto el contenido total como la expresión en membrana de S1PR2. El aumento en la expresión en membrana de S1PR2 se revierte por R7050, lo que indica que está mediado por la activación de TNFR1 por TNF α . Como sólo el S1PR2 expuesto en la superficie de la membrana puede ser activado por S1P, estos resultados indican que el bloqueo de la transducción de señales asociada a la activación de TNFR1 evita por completo la activación de S1PR2 en cerebelo y en neuronas de Purkinje en ratas hiperamonémicas. Esto se confirma por el hecho de que R7050 revierte el aumento mediado por S1PR2 de la quimiocina CCL2. El aumento en el contenido y expresión en membrana de S1PR2 parecen ocurrir principalmente en las neuronas de Purkinje, como indica el aumento del contenido de S1PR2 y de CCL2 (consecuencia de la activación S1PR2) en las neuronas de Purkinje mostradas por inmunohistoquímica en ratas hiperamonémicas y por su reducción cuando bloqueamos S1PR2 con JTE-013. Encontramos también que TNFR1 se expresa en las neuronas de Purkinje, de acuerdo con lo descrito por Kaur *et al.* (2014). Por lo tanto, estos datos apoyan que la activación de TNFR1 en las neuronas de Purkinje desencadena el tráfico de S1PR2 a la membrana y el aumento de CCL2.

Estos resultados sugieren que, en las neuronas de Purkinje, TNF α activaría una reacción de alimentación autocrina de la señalización S1P-S1PR2 similar a lo que sucede en las células endoteliales. Zhang *et al.* (2013b) demostraron que, en células endoteliales en cultivo, el tratamiento con TNF α aumenta la expresión de S1PR2 (pero no de S1PR1 o S1PR3). La eliminación de S1PR2 suprime la regulación de S1PR2 por TNF α . Esto indica que la activación de S1PR2 es necesaria para su propia regulación por el TNF α .

Una de las consecuencias de la activación de S1PR2 es la producción de la quimiocina CCL2 (Oskeritzian *et al.*, 2015). Mostramos que el contenido de CCL2 aumenta principalmente en las neuronas de Purkinje en ratas hiperamonémicas. Además, el aumento del CCL2 se revierte bloqueando el S1PR2 con JTE-013 o la señalización de TNFR1 con R7050, lo que indica que está mediado por la vía TNF α -TNFR1-S1PR2. Se ha descrito que CCL2 promueve la activación de microglía a través de la activación de su receptor CCR2 (Zhang *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Joly-Amado *et al.*, 2020). Aquí mostramos que en ratas hiperamonémicas la activación microglial en cerebelo se revierte por R7050, por JTE-013 y por RS504393 un antagonista del CCR2, lo que indica que está mediada por la activación de TNFR1 y de S1PR2 y por el aumento posterior del CCL2 y el aumento de la activación de su receptor CCR2. El bloqueo de CCR2 con RS504393 no afecta al aumento de S1PR2 en Purkinje, el contenido total de S1PR2 en cerebelo o la expresión en membrana de S1PR2. Esto indica que la activación de la vía S1PR2-CCL2 en las neuronas de Purkinje es necesaria para la activación glial en hiperamonemia y que precede a la activación de CCR2 y de la microglía en cerebelo.

Un objetivo de esta tesis fue identificar las vías de transducción de señales implicadas en los efectos de la activación de S1PR2 sobre la neuroinflamación y la neurotransmisión. Como se indica en la introducción, sobre la base de diferentes estudios sobre vías

implicadas en otras situaciones patológicas, principalmente en diferentes tipos de dolor, hipotetizamos que en el cerebelo de ratas hiperamonémicas, el CCL2 liberado por las neuronas activa el CCR2 en microglía, lo que conduce a la activación de la microglía y al aumento de la expresión en membrana de P2X4R y del contenido de BDNF, lo que activaría TrkB en las neuronas de Purkinje, conduciendo a una mayor expresión en membrana de KCC2 (Fig. 60), lo que alteraría la neurotransmisión GABAérgica.

La hiperamonemia aumenta la expresión en membrana de P2X4R, que también se revierte por R7050, por JTE-013 y por RS504393, lo que indica que está mediada por la activación de la vía TNFR1-S1PR2-CCL2-CCR2. El CCR2 en el cerebelo de ratas hiperamonémicas se expresa principalmente en microglía. Esto sugiere que el CCL2 liberado de las neuronas de Purkinje activaría CCR2 en microglía, lo que conduciría a la translocación de P2X4R a la membrana celular, lo que resultaría en una mayor activación de P2X4R. Esto coincide con lo descrito por Toyomitsu *et al.* (2012) que muestran que, en cultivos primarios de microglía, el CCL2 promueve el tráfico de receptores P2X4 a la membrana celular. La síntesis de BDNF inducida por P2X4R en microglía se ha demostrado claramente en el dolor neuropático y se ha propuesto que media la afluencia de calcio y la activación de la MAPK p38 (Trang *et al.*, 2009). Liu *et al.* (2018) y Long *et al.* (2020) describieron que también en la alodinia trigeminal y en la migraña, la activación del receptor P2X4 en microglía aumenta la síntesis y liberación de BDNF a través de la activación de MAPK p38. En esta tesis mostramos que en cerebelo de ratas hiperamonémicas hay un aumento de P2X4R en membrana y en el contenido de BDNF, como en los estudios mencionados.

El aumento del BDNF se produce en microglía, pero no en las neuronas de Purkinje de ratas hiperamonémicas, apoyando que sería debido a la activación de CCR2 y de P2X4R. Sin embargo, el aumento del BDNF no está mediado por el aumento de la fosforilación de p38. El aumento de BDNF inducido por hiperamonemia se revierte con R7050, JTE-013 y RS504393, lo que indica que está mediado por la activación de TNFR1, S1PR2 y CCR2. Las ratas hiperamonémicas también muestran un aumento de la fosforilación de p38 en cerebelo, sin embargo, este aumento no se revierte por JTE-013 o RS504393, pero se revierte completamente en R7050. Esto indica que el aumento de la fosforilación de p38 se debe al aumento de activación de TNFR1, pero no a la activación de S1PR2 o CCR2. Como estos tratamientos revierten el aumento del BDNF, pero no el de la fosforilación de p38, esto indica que el aumento del BDNF no está mediado por el aumento de fosforilación de p38.

El aumento del BDNF en el cerebelo contribuiría a la alteración de la neurotransmisión inhibitoria descrita en cerebelo en hiperamonemia (Cauli *et al.*, 2009; Cabrera-Pastor *et al.*, 2016a y c). La activación de TrkB por BDNF alteraría la neurotransmisión GABAérgica induciendo cambios en el cotransportador neuronal de K-Cl KCC2. Está bien establecido que la vía BDNF-TrkB-KCC2 desempeña un papel importante en la alteración de la neurotransmisión inhibitoria en el dolor neuropático. Ferrini y De Koninck (2013) proponen que, en el dolor neuropático, el BDNF liberado por la microglía activa señales mediadas por TrkB en neuronas, lo que conduce a la disminución de KCC2,

alterando la homeostasis de cloro, lo que conduce a una neurotransmisión GABAérgica y glicinérgica alterada. Sin embargo, Lee-Hotta *et al.* (2019) propusieron que BDNF puede aumentar o disminuir la expresión y función de KCC2 dependiendo de las vías intracelulares activadas.

La activación de TrkB por BDNF también modula la neurotransmisión inhibitoria en las neuronas de Purkinje (Drake-Baumann, 2005). Cheng *et al.* (2005) demostraron que, en rodajas de cerebelo, la adición de BDNF potencia la función del receptor GABA_A en neuronas de Purkinje a través de la activación del receptor TrkB. El aumento de la neurotransmisión GABAérgica observado en el cerebelo de ratas hiperamonémicas podría ser mediada, al menos en parte, por el aumento de los niveles de BDNF y la activación de TrkB en las neuronas de Purkinje, lo que conduce a una mayor expresión en membrana y función de KCC2. KCC2 es un cotransportador K⁺-Cl⁻ específico de las neuronas. La inhibición hiperpolarizante mediada por los receptores GABA_A depende de la extrusión del cloruro por KCC2. El cotransporte K⁺-Cl⁻ mediado por KCC2 determina el gradiente electroquímico de los iones cloruro en las neuronas, determinando así la eficacia o incluso la polaridad de las transmisiones sinápticas GABAérgicas y glicinérgicas que dependen de la magnitud de los gradientes transmembranas en cloruro (Chamma *et al.*, 2012; Tillman *et al.*, 2019). El aumento de KCC2 aumenta la eficacia de extrusión neuronal de cloro (Rivera, Voipio y Kaila, 2005). El aumento de la expresión en membrana de KCC2 en las neuronas de ratas hiperamonémicas mejoraría su actividad y la extrusión de cloro, resultando en una reducción de la concentración intracelular de Cl⁻ y un aumento del gradiente de cloro entre los compartimentos intra- y extracelulares de las neuronas de Purkinje lo que, a su vez, aumentaría las respuestas a la activación de los receptores GABA_A.

Un aumento similar de la magnitud de la respuesta GABAérgica debido al aumento de la actividad de KCC2 ha sido descrito por Granados-Rojas *et al.* (2020) que proponen que el aumento del KCC2 podría ser responsable del efecto beneficioso de la dieta cetogénica en las enfermedades en las que se altera el sistema GABAérgico, aumentando su eficiencia inhibitoria.

Los resultados de esta parte de la tesis muestran que la hiperamonemia crónica aumenta la activación de S1PR2 al aumentar su expresión en membrana. Esto conduce a un aumento de los niveles de CCL2, especialmente en las neuronas de Purkinje. El CCL2 liberado por las neuronas activa su receptor CCR2 en microglía, lo que conduce a la activación de microglía y al aumento de la expresión en membrana de P2X4 y del contenido de BDNF, que activa TrkB en las neuronas de Purkinje, lo que conduce a una mayor expresión de membrana de KCC2 (Fig. 60). Esto a su vez alteraría la neurotransmisión GABAérgica y glicinérgica, que es responsable del deterioro del aprendizaje de una tarea condicional en el laberinto Y y de la incoordinación motora en ratas hiperamonémicas (Cauli *et al.*, 2009; Gonzalez-Usano *et al.*, 2014; Llansola *et al.*, 2015; Johansson *et al.*, 2015; Hernández-Rabaza *et al.*, 2016a; Cabrera-Pastor *et al.*, 2018a y 2019a). Esto sugiere que bloquear la vía S1PR2-CCL2-CCR2-BDNF-KCC2 en cualquiera de sus pasos mejoraría la neurotransmisión inhibitoria y la incoordinación

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

motora y la capacidad de aprendizaje en ratas hiperamonémicas y en pacientes con hiperamonemia y EHM.

Cada vez hay más evidencia del potencial terapéutico de los antagonistas de S1PR2, que parecen ser herramientas prometedoras para diferentes patologías. Blankenbach *et al.* (2016) proponen que los antagonistas selectivos de los receptores S1PR2 podrían ser útiles en hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar, hipertensión portal y fibrosis hepática. También sugieren un posible efecto beneficioso en la diabetes mellitus tipo 2 y aterosclerosis. También se ha propuesto reducir la activación de S1PR2 para mejorar la esclerosis múltiple (Seyedsadr *et al.*, 2019), accidente cerebrovascular (Kim *et al.*, 2015) y para el rescate de la lesión periinfarto en isquemia cerebral (Matsumoto *et al.*, 2020).

En esta tesis también mostramos que el bloqueo del S1PR2 en ratas hiperamonémicas in vivo normaliza la vía S1PR2-CCL2-CCR2-BDNF-TrkB-KCC2, reduce la activación de microglía y astrocitos y restaura la coordinación motora en ratas hiperamonémicas. Los resultados muestran que los antagonistas de S1PR2 tienen efectos beneficiosos para reducir la activación glial y la neuroinflamación y mejorar la neurotransmisión inhibitoria en el cerebelo y la incoordinación motora en la hiperamonemia crónica y, probablemente, en pacientes con cirrosis hepática y EHM, y en otras patologías en las que la neuroinflamación aumenta la neurotransmisión GABAérgica.

DISCUSIÓN GENERAL

En esta tesis mostramos que un aumento de la neurotransmisión glicinérgica en cerebelo de ratas hiperamonémicas contribuye a inducir neuroinflamación y alteraciones de la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica. El aumento de la neurotransmisión glicinérgica sería consecuencia de la disminución de los niveles de GMPc extracelular en el cerebelo como muestra el hecho de que el aumento del GMPc extracelular revierte todo el proceso por el que la hiperamonemia crónica aumenta la neurotransmisión glicinérgica y la neuroinflamación y altera la neurotransmisión GABAérgica. Los receptores de glicina se expresan principalmente en las neuronas de Purkinje. En ratas hiperamonémicas, el aumento de la neurotransmisión glicinérgica conduce a una reducción de la expresión en la membrana de ADAM17, una proteasa que modula la expresión en membrana de TNFR1. La disminución de ADAM17 en membrana reduce el procesamiento de TNFR1, dando como resultado una mayor expresión en membrana y activación de TNFR1 y de la vía NF- κ B asociada. El aumento de la actividad del factor de transcripción NF- κ B aumenta la expresión en las neuronas de Purkinje de citocinas pro-inflamatorias como TNF α , IL1 β y de proteínas como HMGB1 y glutaminasa. El aumento de la actividad de la glutaminasa conduce a un aumento del glutamato extracelular. El aumento de glutamato extracelular y de HMGB1 potencia la activación microglial al actuar sobre los receptores TLR4 y NMDA, respectivamente. Por otra parte, el aumento del glutamato extracelular conduce a una mayor captación de glutamato y Na⁺ por los astrocitos activados alterando el gradiente de Na⁺ y, como consecuencia, la función del transportador GABA GAT3 se invierte y, en lugar de captar GABA, libera GABA al medio extracelular, lo que produce un aumento de los niveles de GABA extracelular y altera la neurotransmisión GABAérgica. Este aumento de la neurotransmisión GABAérgica conduce a incoordinación motora en ratas hiperamonémicas. Estos resultados identifican un mecanismo por el cual la neuroinflamación modula la neurotransmisión y las alteraciones neurológicas asociadas. El bloqueo de los receptores de glicina con estricnina o con GMPc extracelular previene por completo el aumento de la activación de la vía ADAM-TNFR1-NF- κ B en ratas hiperamonémicas y por ende reduce la neurotransmisión glicinérgica y la neuroinflamación en cerebelo. Estos resultados arrojan luz sobre posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de la incoordinación motora y otras alteraciones neurológicas debidas al aumento de la neurotransmisión inhibitoria, glicinérgica y/o GABAérgica en hiperamonemia crónica, encefalopatía hepática y otras patologías asociadas a neuroinflamación.

También mostramos que la hiperamonemia sostenida (pero no a corto plazo) induce la expresión de TNF α en las neuronas de Purkinje debido a la activación de TNFR1 por el TNF α producido en las células gliales (y más tarde también por el TNF α producido en las propias neuronas de Purkinje). La activación de TNFR1 induce la translocación de NF- κ B al núcleo y la transcripción del ARNm de TNF α en el cerebelo de ratas hiperamonémicas. La inducción de TNF α en las neuronas de Purkinje altera la función de estas células y contribuye a la alteración de la neurotransmisión y al deterioro neurológico. La inducción de TNF α en las neuronas de Purkinje de ratas hiperamonémicas se previene in vivo mediante tratamiento periférico con un anticuerpo

DISCUSIÓN GENERAL

anti-TNF α (influximab) lo que indica que el TNF α periférico y la inflamación desencadenan la activación de microglía y astrocitos y todos los procesos descritos anteriormente, que conducen a la expresión de TNF α en las neuronas de Purkinje. La inducción de TNF α también se previene ex vivo en cortes frescos de cerebelo por tratamiento con R7050, que previene la transducción de señales de TNFR1 en las neuronas de Purkinje, la translocación nuclear de NF- κ B y la inducción de TNF α . Esto sugiere que los tratamientos que reducen la inflamación periférica o la activación de NF- κ B pueden mejorar la función cognitiva y motora en hiperamonemia sostenida y encefalopatía hepática y en otras patologías asociadas a un aumento de TNF α . El uso de moléculas o compuestos para inhibir la vía de señalización de NF- κ B se ha sugerido como una opción terapéutica para trastornos neurológicos como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer etc.

Por otra parte, en esta tesis también identificamos mecanismos detallados por los que la hiperamonemia crónica induce neuroinflamación en el cerebelo y por los que ésta altera la neurotransmisión GABAérgica, conduciendo a incoordinación motora. Los resultados obtenidos mediante experimentos ex vivo en cortes frescos de cerebelo, muestran que la hiperamonemia crónica aumenta la activación del receptor 2 de la esfingosina 1 fosfato (S1PR2) al aumentar su expresión en membrana. Esto conduce a un aumento de los niveles de la quimiocina CCL2, especialmente en las neuronas de Purkinje. El CCL2, liberado por las neuronas, activa su receptor CCR2 en microglía lo que conduce a la activación de la microglía y a neuroinflamación. El uso de un antagonista de S1PR2, JTE-013, en experimentos ex vivo en cortes de cerebelo de ratas hiperamonémicas, revierte la neuroinflamación y la activación de la microglía.

La activación de la microglía aumenta la expresión en membrana de receptores purinérgicos como P2X4 y la síntesis y liberación de BDNF. El aumento de BDNF activa a su receptor, TrkB, en las neuronas de Purkinje alterando la expresión en membrana del cotransportador de Cl⁻ KCC2 produciendo cambios en la homeostasis del cloruro. Como consecuencia, se altera la neurotransmisión GABAérgica produciendo incoordinación motora en las ratas con hiperamonemia crónica. El bloqueo de cualquier paso de la vía S1PR2-CCR2-CCL2-BDNF-TrkB mediante el uso de antagonistas mejora la neuroinflamación y la neurotransmisión inhibitoria y podría ser útil para mejorar la incoordinación motora y la capacidad de aprendizaje en hiperamonemia, encefalopatía hepática y otras patologías asociadas a neuroinflamación.

Para evaluar la utilidad terapéutica de antagonistas del receptor S1PR2 que hemos identificado como posible diana terapéutica, se ensayó en ratas hiperamonémicas in vivo si la administración mediante mini-bombas osmóticas de JTE-013, un antagonista del receptor S1PR2, tiene efectos beneficiosos. Comprobamos que el tratamiento con JTE-013 restaura la coordinación motora analizada mediante el test del Beam Walking y revierte la neuroinflamación incluyendo la activación de astrocitos y microglía. S1PR2 constituye una nueva diana terapéutica para mejorar la neurotransmisión inhibitoria en el cerebelo y la incoordinación motora en hiperamonemia crónica y, probablemente, en pacientes con cirrosis hepática y EHM.

CONCLUSIONS

1. Glycinergic neurotransmission modulates neuroinflammation in cerebellum. This opens up new possibilities to reduce neuroinflammation by acting on glycine receptors.
2. In hyperammonemic rats, increased glycinergic neurotransmission leads to reduced membrane expression of ADAM17, resulting in increased membrane expression and activation of TNFR1 and of the associated pro-inflammatory NF- κ B pathway.
3. This leads to increased expression in Purkinje neurons of TNF α , IL-1 β , HMGB1 and glutaminase I. Increased glutaminase activity leads to increased extracellular glutamate, leading to increased extracellular GABA concentration. This altered neurotransmission leads to motor incoordination. The increase in extracellular glutamate and HMGB1 would enhance microglial activation by acting on the TLR4 and NMDA receptors, respectively.
4. Reducing glycine receptors activation with strychnine or by increasing extracellular cGMP reverses activation of the above ADAM17-TNFR1-NF- κ B pathway in hyperammonemic rats. This supports that the increase in glycinergic neurotransmission in hyperammonemia is due to the reduced levels of extracellular cGMP which enhance activation of the glycine receptor. These results suggest that glycine receptor or the steps of the ADAM17-TNFR1-NF- κ B pathway could be new therapeutic targets for the treatment of motor incoordination and other neurological alterations due to increased glycinergic and/or GABAergic neurotransmission in chronic hyperammonemia, hepatic encephalopathy and other pathologies associated with neuroinflammation.
5. Sustained (but not short-term) hyperammonemia induces TNF α expression in Purkinje neurons. This is due to the activation of TNFR1 by TNF α produced in glia (and later also by TNF α produced in Purkinje cells), which induces nuclear translocation of NF- κ B and enhances transcription of the mRNA for TNF α .
6. TNF α is also induced in Purkinje neurons of patients who die with liver cirrhosis. This would contribute to the loss of Purkinje cells in these patients.
7. Induction of TNF α in Purkinje neurons of hyperammonemic rats is prevented in vivo by peripheral treatment with an anti-TNF α antibody (infliximab) and ex vivo by treatment with R7050, which prevents signal transduction of TNFR1, nuclear translocation of NF- κ B and induction of TNF α in Purkinje neurons. This supports that treatments that reduce peripheral inflammation or NF- κ B activation may reduce the deleterious effects of sustained hyperammonemia and hepatic encephalopathy.
8. Chronic hyperammonemia induces the activation of S1PR2 by increasing its membrane expression. This leads to increased CCL2 levels, especially in Purkinje neurons. CCL2 released by neurons activates CCR2 in microglia, leading to microglial activation and increased membrane expression of P2X4R and BDNF content, which activates TrkB in Purkinje neurons, leading to increased membrane expression of KCC2.
9. This, in turn, would alter both GABAergic and glycinergic neurotransmission, leading to motor incoordination in hyperammonemic rats.

CONCLUSIONS

10. Blocking S1PR2 with JTE-013 reduces glial activation and neuroinflammation and improves inhibitory neurotransmission in cerebellum and motor incoordination in rats with chronic hyperammonemia.

11. Blocking the S1PR2-CCL2-CCR2-BDNF-TrkB pathway at any of its steps would improve inhibitory neurotransmission and motor incoordination in hyperammonemic rats. Compounds targeting any step of the S1PR2-CCL2-CCR2-BDNF-TrkB pathway could improve motor coordination in patients with liver cirrhosis and hepatic encephalopathy.

BIBLIOGRAFÍA

- Abg Abd Wahab, D. Y., Gau, C. H., Zakaria, R., Muthu Karuppan, M. K., A-Rahbi, B. S., Abdullah, Z., Alrafiah, A., Abdullah, J. M., & Muthuraju, S. (2019). Review on Cross Talk between Neurotransmitters and Neuroinflammation in Striatum and Cerebellum in the Mediation of Motor Behaviour. *BioMed research international*, 2019, 1767203.
- Adachi, K., & Chiba, K. (2007). FTY720 story. Its discovery and the following accelerated development of sphingosine 1-phosphate receptor agonists as immunomodulators based on reverse pharmacology. *Perspectives in medicinal chemistry*, 1, 11–23.
- Adada, M., Canals, D., Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2013). Sphingosine-1-phosphate receptor 2. *The FEBS journal*, 280(24), 6354–6366.
- Aguilar, M. A., Miñarro, J., & Felipo, V. (2000). Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats. *Experimental neurology*, 161(2), 704–713.
- Agusti, A., Cauli, O., Rodrigo, R., Llansola, M., Hernández-Rabaza, V., & Felipo, V. (2011). p38 MAP kinase is a therapeutic target for hepatic encephalopathy in rats with portacaval shunts. *Gut*, 60(11), 1572–1579.
- Agusti, A., Hernández-Rabaza, V., Balzano, T., Taoro-Gonzalez, L., Ibañez-Grau, A., Cabrera-Pastor, A., Fustero, S., Llansola, M., Montoliu, C., & Felipo, V. (2017). Sildenafil reduces neuroinflammation in cerebellum, restores GABAergic tone, and improves motor in-coordination in rats with hepatic encephalopathy. *CNS neuroscience & therapeutics*, 23(5), 386–394.
- Ahmed, F., Kemp, B. A., Howell, N. L., Siragy, H. M., & Carey, R. M. (2007). Extracellular renal guanosine cyclic 3'5'-monophosphate modulates nitric oxide and pressure-induced natriuresis. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 50(5), 958–963.
- Ahn, K. S., & Aggarwal, B. B. (2005). Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1056, 218–233.
- Andric, S. A., Kostic, T. S., & Stojilkovic, S. S. (2006). Contribution of multidrug resistance protein MRP5 in control of cyclic guanosine 5'-monophosphate intracellular signaling in anterior pituitary cells. *Endocrinology*, 147(7), 3435–3445.
- Anelli, V., Gault, C. R., Snider, A. J., & Obeid, L. M. (2010). Role of sphingosine kinase-1 in paracrine/transcellular angiogenesis and lymphangiogenesis in vitro. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(8), 2727–2738.
- Arikawa, K., Takuwa, N., Yamaguchi, H., Sugimoto, N., Kitayama, J., Nagawa, H., Takehara, K., & Takuwa, Y. (2003). Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P2 G protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular RAC activity. *The Journal of biological chemistry*, 278(35), 32841–32851.
- Ashman, D. F., Lipton, R., Melicow, M. M., & Price, T. D. (1963). Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochemical and biophysical research communications*, 11, 330–334.
- Aytan, N., Choi, J. K., Carreras, I., Brinkmann, V., Kowall, N. W., Jenkins, B. G., & Dedeoglu, A. (2016). Fingolimod modulates multiple neuroinflammatory markers in a mouse model of Alzheimer's disease. *Scientific reports*, 6, 24939.

BIBLIOGRAFÍA

- Azorín, I., Miñana, M. D., Felipo, V., & Grisolia, S. (1989). A simple animal model of hyperammonemia. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 10(3), 311–314.
- Babiuch, K., Kuśnierz-Cabala, B., Kęsek, B., Okoń, K., Darczuk, D., & Chomyszyn-Gajewska, M. (2020). Evaluation of Proinflammatory, NF-kappaB Dependent Cytokines: IL-1 α , IL-6, IL-8, and TNF α in Tissue Specimens and Saliva of Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma and Oral Potentially Malignant Disorders. *Journal of clinical medicine*, 9(3), 867.
- Bajaj, J. S., Duarte-Rojo, A., Xie, J. J., Acharya, C., Wade, J. B., Robles, C., Thacker, L. R., Flud, C., Fagan, A., Garcia-Saenz-de-Sicilia, M., White, M. B., Kelly, M., Nguyen, V., Gavis, E. A., & Vargas, H. E. (2020). Minimal Hepatic Encephalopathy and Mild Cognitive Impairment Worsen Quality of Life in Elderly Patients With Cirrhosis. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 18(13), 3008–3016.e2.
- Balkwill F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 9(5), 361–371.
- Balzano, T., Forteza, J., Borreda, I., Molina, P., Giner, J., Leone, P., Urios, A., Montoliu, C., & Felipo, V. (2018a). Histological Features of Cerebellar Neuropathology in Patients With Alcoholic and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 77(9), 837–845.
- Balzano, T., Forteza, J., Molina, P., Giner, J., Monzó, A., Sancho-Jiménez, J., Urios, A., Montoliu, C., & Felipo, V. (2018b). The Cerebellum of Patients with Steatohepatitis Shows Lymphocyte Infiltration, Microglial Activation and Loss of Purkinje and Granular Neurons. *Scientific reports*, 8(1), 3004.
- Balzano, T., Dadsetan, S., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Malaguarnera, M., Gil-Perotin, S., Cubas-Nuñez, L., Casanova, B., Castro-Quintas, A., Ponce-Mora, A., Arenas, Y. M., Leone, P., Erceg, S., Llansola, M., & Felipo, V. (2020a). Chronic hyperammonemia induces peripheral inflammation that leads to cognitive impairment in rats: Reversed by anti-TNF α treatment. *Journal of hepatology*, 73(3), 582–592.
- 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. (2020b). Sustained hyperammonemia induces TNF α IN Purkinje neurons by activating the TNFR1-NF- κ B pathway. *Journal of neuroinflammation*, 17(1), 70.
- Banisadr, G., Gosselin, R. D., Mechighel, P., Kitabgi, P., Rostène, W., & Parsadaniantz, S. M. (2005a). Highly regionalized neuronal expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in rat brain: evidence for its colocalization with neurotransmitters and neuropeptides. *The Journal of comparative neurology*, 489(3), 275–292.
- Banisadr, G., Gosselin, R. D., Mechighel, P., Rostène, W., Kitabgi, P., & Mélik Parsadaniantz, S. (2005b). Constitutive neuronal expression of CCR2 chemokine receptor and its colocalization with neurotransmitters in normal rat brain: functional effect of MCP-1/CCL2 on calcium mobilization in primary cultured neurons. *The Journal of comparative neurology*, 492(2), 178–192.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., & Broadwell, R. D. (1995). Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation*, 2(4), 241–248.

- Beattie, M. S., Hermann, G. E., Rogers, R. C., & Bresnahan, J. C. (2002). Cell death in models of spinal cord injury. *Progress in brain research*, 137, 37–47.
- Beckinghausen, J., & Sillitoe, R. V. (2019). Insights into cerebellar development and connectivity. *Neuroscience letters*, 688, 2–13.
- Bentivoglio, M., Mariotti, R., & Bertini, G. (2011). Neuroinflammation and brain infections: historical context and current perspectives. *Brain research reviews*, 66(1-2), 152–173.
- Betz, H., & Laube, B. (2006). Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *Journal of neurochemistry*, 97(6), 1600–1610.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., & Cerretti, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature*, 385(6618), 729–733.
- Blackwell, K., Zhang, L., Thomas, G. S., Sun, S., Nakano, H., & Habelhah, H. (2009). TRAF2 phosphorylation modulates tumor necrosis factor α -induced gene expression and cell resistance to apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 29(2), 303–314.
- Blankenbach, K. V., Schwalm, S., Pfeilschifter, J., & Meyer Zu Heringdorf, D. (2016). Sphingosine-1-Phosphate Receptor-2 Antagonists: Therapeutic Potential and Potential Risks. *Frontiers in pharmacology*, 7, 167.
- Bormann J. (2000). The 'ABC' of GABA receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 21(1), 16–19.
- Bose, S., & Cho, J. (2013). Role of chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in neurodegenerative diseases. *Archives of pharmacal research*, 36(9), 1039–1050.
- Brinkmann V. (2007). Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacology & therapeutics*, 115(1), 84–105.
- Brites, D., & Fernandes, A. (2015). Neuroinflammation and Depression: Microglia Activation, Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 476.
- Bukanova, J. V., Solntseva, E. I., Kondratenko, R. V., & Skrebitsky, V. G. (2014). Glycine receptor in hippocampal neurons as a target for action of extracellular cyclic nucleotides. *Neuroscience letters*, 561, 58–63.
- Bustamante, J., Rimola, A., Ventura, P. J., Navasa, M., Cirera, I., Reggiardo, V., & Rodés, J. (1999). Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Journal of hepatology*, 30(5), 890–895.
- Butts, T., Green, M. J., & Wingate, R. J. (2014). Development of the cerebellum: simple steps to make a 'little brain'. *Development (Cambridge, England)*, 141(21), 4031–4041.

BIBLIOGRAFÍA

Butz, M., Timmermann, L., Braun, M., Groiss, S. J., Wojtecki, L., Ostrowski, S., Krause, H., Pollok, B., Gross, J., Südmeyer, M., Kircheis, G., Häussinger, D., & Schnitzler, A. (2010). Motor impairment in liver cirrhosis without and with minimal hepatic encephalopathy. *Acta neurologica Scandinavica*, 122(1), 27–35.

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., Taoro, L., Llansola, M., & Felipo, V. (2015). Roles of the NMDA Receptor and EAAC1 Transporter in the Modulation of Extracellular Glutamate by Low and High Affinity AMPA Receptors in the Cerebellum in Vivo: Differential Alteration in Chronic Hyperammonemia. *ACS chemical neuroscience*, 6(12), 1913–1921.

Cabrera-Pastor, A., Malaguarnera, M., Taoro-Gonzalez, L., Llansola, M., & Felipo, V. (2016a). Extracellular cGMP Modulates Learning Biphasically by Modulating Glycine Receptors, CaMKII and Glutamate-Nitric Oxide-cGMP Pathway. *Scientific reports*, 6, 33124.

Cabrera-Pastor, A., Hernandez-Rabaza, V., Taoro-Gonzalez, L., Balzano, T., Llansola, M., & Felipo, V. (2016b). In vivo administration of extracellular cGMP normalizes TNF α and membrane expression of AMPA receptors in hippocampus and spatial reference memory but not IL-1 β , NMDA receptors in membrane and working memory in hyperammonemic rats. *Brain, behavior, and immunity*, 57, 360–370.

Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., & Felipo, V. (2016c). Hyperammonemia alters glycinergic neurotransmission and modulation of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway by extracellular glycine in cerebellum in vivo. *Journal of neurochemistry*, 137(4), 539–548.

Cabrera-Pastor, A., Taoro-González, L., Cuñat, A. N., Canet-López, D., Balzano, T., & Felipo, V. (2017). Extracellular Cyclic GMP Modulates Membrane Expression of The GluA1 and GluA2 Subunits of AMPA Receptor in Cerebellum: Molecular Mechanisms Involved. *Scientific reports*, 7(1), 17656.

Cabrera-Pastor, A., Balzano, T., Hernández-Rabaza, V., Malaguarnera, M., Llansola, M., & Felipo, V. (2018a). Increasing extracellular cGMP in cerebellum in vivo reduces neuroinflammation, GABAergic tone and motor in-coordination in hyperammonemic rats. *Brain, behavior, and immunity*, 69, 386–398.

Cabrera-Pastor, A., Taoro-González, L., López-Merino, E., Celma, F., Llansola, M., & Felipo, V. (2018b). Chronic hyperammonemia alters in opposite ways membrane expression of GluA1 and GluA2 AMPA receptor subunits in cerebellum. Molecular mechanisms involved. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1864(1), 286–295.

Cabrera-Pastor, A., Llansola, M., Montoliu, C., Malaguarnera, M., Balzano, T., Taoro-Gonzalez, L., García-García, R., Mangas-Losada, A., Izquierdo-Altarejos, P., Arenas, Y. M., Leone, P., & Felipo, V. (2019a). Peripheral inflammation induces neuroinflammation that alters neurotransmission and cognitive and motor function in hepatic encephalopathy: Underlying mechanisms and therapeutic implications. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 226(2), e13270.

Cabrera-Pastor, A., Arenas, Y. M., Taoro-Gonzalez, L., Montoliu, C., & Felipo, V. (2019b). Chronic hyperammonemia alters extracellular glutamate, glutamine and GABA and membrane

- expression of their transporters in rat cerebellum. Modulation by extracellular cGMP. *Neuropharmacology*, *161*, 107496.
- Canales, J. J., Elayadi, A., Errami, M., Llansola, M., Cauli, O., & Felipo, V. (2003). Chronic hyperammonemia alters motor and neurochemical responses to activation of group I metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens in rats in vivo. *Neurobiology of disease*, *14*(3), 380–390.
- Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Boix, J., & Felipo, V. (2007). Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *46*(2), 514–519.
- Cauli, O., Rodrigo, R., Llansola, M., Montoliu, C., Monfort, P., Piedrafita, B., El Mlili, N., Boix, J., Agustí, A., & Felipo, V. (2009). Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, *24*(1), 69–80.
- Chamma, I., Chevy, Q., Poncer, J. C., & Lévi, S. (2012). Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. *Frontiers in cellular neuroscience*, *6*, 5.
- Chen, Z. S., Lee, K., & Kruh, G. D. (2001). Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *The Journal of biological chemistry*, *276*(36), 33747–33754.
- Chen, G., & Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5573), 1634–1635.
- Chen, W., Mahadomrongkul, V., Berger, U. V., Bassan, M., DeSilva, T., Tanaka, K., Irwin, N., Aoki, C., & Rosenberg, P. A. (2004). The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *24*(5), 1136–1148.
- Cheng, Q., & Yeh, H. H. (2005). PLCgamma signaling underlies BDNF potentiation of Purkinje cell responses to GABA. *Journal of neuroscience research*, *79*(5), 616–627.
- Chen, C. J., Ou, Y. C., Chang, C. Y., Pan, H. C., Liao, S. L., Chen, S. Y., Raung, S. L., & Lai, C. Y. (2012). Glutamate released by Japanese encephalitis virus-infected microglia involves TNF α signaling and contributes to neuronal death. *Glia*, *60*(3), 487–501.
- Cheng, X., Shen, Y., & Li, R. (2014). Targeting TNF: a therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Drug discovery today*, *19*(11), 1822–1827.
- Chhor, V., Le Charpentier, T., Lebon, S., Oré, M. V., Celador, I. L., Josserand, J., Degos, V., Jacotot, E., Hagberg, H., Sävman, K., Mallard, C., Gressens, P., & Fleiss, B. (2013). Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain, behavior, and immunity*, *32*, 70–85.
- Chiu, C. S., Brickley, S., Jensen, K., Southwell, A., Mckinney, S., Cull-Candy, S., Mody, I., & Lester, H. A. (2005). GABA transporter deficiency causes tremor, ataxia, nervousness, and increased GABA-induced tonic conductance in cerebellum. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *25*(12), 3234–3245.

BIBLIOGRAFÍA

- Choi, J. W., & Chun, J. (2013). Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system. *Biochimica et biophysica acta*, 1831(1), 20–32.
- Chouard, T., & Gray, N. (2010). Glia. *Nature*, 468(7321), 213.
- Choy, E. H., & Panayi, G. S. (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*, 344(12), 907–916.
- Clark, I. A., & Vissel, B. (2016). Excess cerebral TNF causing glutamate excitotoxicity rationalizes treatment of neurodegenerative diseases and neurogenic pain by anti-TNF agents. *Journal of neuroinflammation*, 13(1), 236.
- Clemmesen, J. O., Larsen, F. S., Kondrup, J., Hansen, B. A., & Ott, P. (1999). Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 29(3), 648–653.
- Conn., HO & Lieberthal., MM. (1979). The Hepatic Coma Syndromes and Lactulose. Chapter 1: The syndrome of portal-systemic encephalopathy. *Baltimore: Williams and Wilkins*, 1–45.
- Contreras-Núñez, E., Blancas-Flores, G., Cruz, M., Almanza-Perez, J. C., Gomez-Zamudio, J. H., Ventura-Gallegos, J. L., Zentella-Dehesa, A., Roberto-Lazzarini, Roman-Ramos, R., & Alarcon-Aguilar, F. J. (2018). Participation of the IKK- α/β complex in the inhibition of the TNF α /NF- κ B pathway by glycine: Possible involvement of a membrane receptor specific to adipocytes. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 102, 120–131.
- Crepel, F., Mariani, J., & Delhaye-Bouchaud, N. (1976). Evidence for a multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the immature rat cerebellum. *Journal of neurobiology*, 7(6), 567–578.
- Crews, F. T., & Vetreno, R. P. (2016). Mechanisms of neuroimmune gene induction in alcoholism. *Psychopharmacology*, 233(9), 1543–1557.
- da Cruz-Höfling, M. A., Rapôso, C., Verinaud, L., & Zago, G. M. (2009). Neuroinflammation and astrocytic reaction in the course of Phneutria nigriventer (armed-spider) blood-brain barrier (BBB) opening. *Neurotoxicology*, 30(4), 636–646.
- da Matta, S. M., Janaina Matos, M., Kummer, A. M., Barbosa, I. G., Teixeira, A. L., & Silva, A. C. (2014). Cognitive alterations in chronic kidney disease: an update. *Jornal brasileiro de nefrologia: 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia*, 36(2), 241–245.
- Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Agusti, A., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernandez-Rabaza, V., Gomez-Gimenez, B., EIMlili, N., Llansola, M., & Felipo, V. (2016a). Infliximab reduces peripheral inflammation, neuroinflammation, and extracellular GABA in the cerebellum and improves learning and motor coordination in rats with hepatic encephalopathy. *Journal of neuroinflammation*, 13(1), 245.
- Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernandez-Rabaza, V., Gil-Perotín, S., Cubas-Núñez, L., García-Verdugo, J. M., Agusti, A., Llansola, M., & Felipo, V. (2016b). Reducing Peripheral Inflammation with Infliximab Reduces Neuroinflammation and Improves Cognition in Rats with Hepatic Encephalopathy. *Frontiers in molecular neuroscience*, 9, 106.

- Daum, G., Grabski, A., & Reidy, M. A. (2009). Sphingosine 1-phosphate: a regulator of arterial lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(10), 1439–1443.
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 29(6), 313–326.
- Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M., & Liu, Z. (2000). The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*, 12(4), 419–429.
- 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, behavior, and immunity*, 70, 214–232.
- Díaz-Gerevini, G. T., Repossi, G., Dain, A., Tarres, M. C., Das, U. N., & Eynard, A. R. (2014). Cognitive and motor perturbations in elderly with longstanding diabetes mellitus. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 30(6), 628–635.
- D'Mello, C., Le, T., & Swain, M. G. (2009). Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor- α signaling during peripheral organ inflammation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(7), 2089–2102.
- Doedens, J. R., & Black, R. A. (2000). Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor- α converting enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 275(19), 14598–14607.
- Domek-Łopacińska, K., & Strosznajder, J. B. (2005). Cyclic GMP metabolism and its role in brain physiology. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 56 Suppl 2, 15–34.
- Dong, W., Todd, A. C., Bröer, A., Hulme, S. R., Bröer, S., & Billups, B. (2018). PKC-Mediated Modulation of Astrocyte SNAT3 Glutamine Transporter Function at Synapses in Situ. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 924.
- Drake-Baumann R. (2005). Rapid modulation of inhibitory synaptic currents in cerebellar Purkinje cells by BDNF. *Synapse (New York, N.Y.)*, 57(4), 183–190.
- Elfferich, M. D., Nelemans, P. J., Ponds, R. W., De Vries, J., Wijnen, P. A., & Drent, M. (2010). Everyday cognitive failure in sarcoidosis: the prevalence and the effect of anti-TNF α treatment. *Respiration; international review of thoracic diseases*, 80(3), 212–219.
- El-Marasy, S. A., El Awdan, S. A., & Abd-Elsalam, R. M. (2019). Protective role of chrysin on thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in rats. *Chemico-biological interactions*, 299, 111–119.
- ElMlili, N., Rodrigo, R., Naghizadeh, B., Cauli, O., & Felipo, V. (2008). Chronic hyperammonemia reduces the activity of neuronal nitric oxide synthase in cerebellum by altering its localization and increasing its phosphorylation by calcium-calmodulin kinase II. *Journal of neurochemistry*, 106(3), 1440–1449.

BIBLIOGRAFÍA

Erceg, S., Monfort, P., Hernández-Viadel, M., Rodrigo, R., Montoliu, C., & Felipo, V. (2005a). Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *41*(2), 299–306.

Erceg, S., Monfort, P., Hernandez-Viadel, M., Llansola, M., Montoliu, C., & Felipo, V. (2005b). Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain research*, *1036*(1-2), 115–121.

Fantuzzi, L., Tagliamonte, M., Gauzzi, M. C., & Lopalco, L. (2019). Dual CCR5/CCR2 targeting: opportunities for the cure of complex disorders. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, *76*(24), 4869–4886.

Fassio, A., Bonanno, G., Fontana, G., Usai, C., Marchi, M., & Raiteri, M. (1996). Role of external and internal calcium on heterocarrier-mediated transmitter release. *Journal of neurochemistry*, *66*(4), 1468–1474.

Felipo, V., Grau, E., Miñana, M. D., & Grisolia, S. (1993). Ammonium injection induces an N-methyl-D-aspartate receptor-mediated proteolysis of the microtubule-associated protein MAP-2. *Journal of neurochemistry*, *60*(5), 1626–1630.

Felipo, V., Miñana, M. D., & Grisolia, S. (1988). Long-term ingestion of ammonium increases acetylglutamate and urea levels without affecting the amount of carbamoyl-phosphate synthase. *European journal of biochemistry*, *176*(3), 567–571.

Felipo, V., & Butterworth, R. F. (2002). Neurobiology of ammonia. *Progress in neurobiology*, *67*(4), 259–279.

Felipo, V., Ordoño, J. F., Urios, A., El Mili, 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 (Baltimore, Md.)*, *55*(2), 530–539.

Felipo, V., Urios, A., Montesinos, E., Molina, I., Garcia-Torres, M. L., Civera, M., Olmo, J. A., Ortega, J., Martinez-Valls, J., Serra, M. A., Cassinello, N., Wassel, A., Jordá, E., & Montoliu, C. (2012b). Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, *27*(1), 51–58.

Felipo V. (2013). Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nature reviews. Neuroscience*, *14*(12), 851–858.

Felipo, V., Urios, A., Giménez-Garzó, C., Cauli, O., Andrés-Costa, M. J., González, O., Serra, M. A., Sánchez-González, J., Aliaga, R., Giner-Durán, R., Belloch, V., & Montoliu, C. (2014). Non invasive blood flow measurement in cerebellum detects minimal hepatic encephalopathy earlier than psychometric tests. *World journal of gastroenterology*, *20*(33), 11815–11825.

Ferguson, A. R., Christensen, R. N., Gensel, J. C., Miller, B. A., Sun, F., Beattie, E. C., Bresnahan, J. C., & Beattie, M. S. (2008). Cell death after spinal cord injury is exacerbated by rapid TNF alpha-induced trafficking of GluR2-lacking AMPARs to the plasma membrane. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *28*(44), 11391–11400.

- Ferrini, F., & De Koninck, Y. (2013). Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling. *Neural plasticity*, 2013, 429815.
- Figiel I. (2008). Pro-inflammatory cytokine TNF α as a neuroprotective agent in the brain. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 68(4), 526–534.
- Furness, D. N., Dehnes, Y., Akhtar, A. Q., Rossi, D. J., Hamann, M., Grutle, N. J., Gundersen, V., Holmseth, S., Lehre, K. P., Ullensvang, K., Wojewodzic, M., Zhou, Y., Attwell, D., & Danbolt, N. C. (2008). A quantitative assessment of glutamate uptake into hippocampal synaptic terminals and astrocytes: new insights into a neuronal role for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Neuroscience*, 157(1), 80–94.
- Galimberti, D., Fenoglio, C., Lovati, C., Venturelli, E., Guidi, I., Corrà, B., Scalabrini, D., Clerici, F., Mariani, C., Bresolin, N., & Scarpini, E. (2006). Serum MCP-1 levels are increased in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 27(12), 1763–1768.
- Gangoiti, P., Camacho, L., Arana, L., Ouro, A., Granado, M. H., Brizuela, L., Casas, J., Fabriás, G., Abad, J. L., Delgado, A., & Gómez-Muñoz, A. (2010). Control of metabolism and signaling of simple bioactive sphingolipids: Implications in disease. *Progress in lipid research*, 49(4), 316–334.
- Gao, Y. J., Zhang, L., Samad, O. A., Suter, M. R., Yasuhiko, K., Xu, Z. Z., Park, J. Y., Lind, A. L., Ma, Q., & Ji, R. R. (2009). JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(13), 4096–4108.
- Gautron, L., Lafon, P., Chaigniau, M., Tramu, G., & Layé, S. (2002). Spatiotemporal analysis of signal transducer and activator of transcription 3 activation in rat brain astrocytes and pituitary following peripheral immune challenge. *Neuroscience*, 112(3), 717–729.
- Gerok, W., & Häussinger, D. (1984). Ammoniumentgiftung und pH-Regulation durch die Leber [Ammonium detoxication and pH regulation by the liver]. *Die Medizinische Welt*, 35(1-2), 28–34.
- Ghosh, A., Roy, A., Liu, X., Kordower, J. H., Mufson, E. J., Hartley, D. M., Ghosh, S., Mosley, R. L., Gendelman, H. E., & Pahan, K. (2007). Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47), 18754–18759.
- Giménez-Garzó, C., Garcés, J. J., Urios, A., Mangas-Losada, A., García-García, R., González-López, O., Giner-Durán, R., Escudero-García, D., Serra, M. A., Soria, E., Felipo, V., & Montoliu, C. (2017). The PHES battery does not detect all cirrhotic patients with early neurological deficits, which are different in different patients. *PloS one*, 12(2), e0171211.
- Gomes, J. R., Costa, J. T., Melo, C. V., Felizzi, F., Monteiro, P., Pinto, M. J., Inácio, A. R., Wieloch, T., Almeida, R. D., Grãos, M., & Duarte, C. B. (2012). Excitotoxicity downregulates TrkB.FL signaling and upregulates the neuroprotective truncated TrkB receptors in cultured hippocampal and striatal neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(13), 4610–4622.

BIBLIOGRAFÍA

- Gomez-Muñoz, A., Presa, N., Gomez-Larrauri, A., Rivera, I. G., Trueba, M., & Ordoñez, M. (2016). Control of inflammatory responses by ceramide, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. *Progress in lipid research*, *61*, 51–62.
- González-Fernández, B., Sánchez, D. I., González-Gallego, J., & Tuñón, M. J. (2017). Sphingosine 1-Phosphate Signaling as a Target in Hepatic Fibrosis Therapy. *Frontiers in pharmacology*, *8*, 579.
- Gonzalez-Usano, A., Cauli, O., Agusti, A., & Felipo, V. (2014). Pregnenolone sulfate restores the glutamate-nitric-oxide-cGMP pathway and extracellular GABA in cerebellum and learning and motor coordination in hyperammonemic rats. *ACS chemical neuroscience*, *5*(2), 100–105.
- Gou, L. B., Zhang, W., Guo, D. J., Zhong, W. J., Wu, X. J., & Zhou, Z. M. (2020). Aberrant brain structural network and altered topological organization in minimal hepatic encephalopathy. *Diagnostic and interventional radiology (Ankara, Turkey)*, *26*(3), 255–261.
- Granados-Rojas, L., Jerónimo-Cruz, K., Juárez-Zepeda, T. E., Tapia-Rodríguez, M., Tovar, A. R., Rodríguez-Jurado, R., Carmona-Aparicio, L., Cárdenas-Rodríguez, N., Coballase-Urrutia, E., Ruíz-García, M., & Durán, P. (2020). Ketogenic Diet Provided During Three Months Increases KCC2 Expression but Not NKCC1 in the Rat Dentate Gyrus. *Frontiers in neuroscience*, *14*, 673.
- Graupner, M., & Brunel, N. (2007). STDP in a bistable synapse model based on CaMKII and associated signaling pathways. *PLoS computational biology*, *3*(11), e221.
- Groth, E., Pruessmeyer, J., Babendreyer, A., Schumacher, J., Pasqualon, T., Dreymueller, D., Higashiyama, S., Lorenzen, I., Grötzinger, J., Cataldo, D., & Ludwig, A. (2016). Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes. *Biochimica et biophysica acta*, *1863*(11), 2795–2808.
- Groves, A., Kihara, Y., & Chun, J. (2013). Fingolimod: direct CNS effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor modulation and implications in multiple sclerosis therapy. *Journal of the neurological sciences*, *328*(1-2), 9–18.
- Guo, Y., Kotova, E., Chen, Z. S., Lee, K., Hopper-Borge, E., Belinsky, M. G., & Kruh, G. D. (2003). MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl) adenine. *The Journal of biological chemistry*, *278*(32), 29509–29514.
- Hanchar, H. J., Dodson, P. D., Olsen, R. W., Otis, T. S., & Wallner, M. (2005). Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABA(A) receptor activity. *Nature neuroscience*, *8*(3), 339–345.
- Hanisch, U. K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience*, *10*(11), 1387–1394.
- Harvey, R. J., & Yee, B. K. (2013). Glycine transporters as novel therapeutic targets in schizophrenia, alcohol dependence and pain. *Nature reviews. Drug discovery*, *12*(11), 866–885.
- Has, A., & Chebib, M. (2018). GABA_A receptors: Various stoichiometries of subunit arrangement in $\alpha 1\beta 3$ and $\alpha 1\beta 3\epsilon$ receptors. *Current pharmaceutical design*, *24*(17), 1839–1844.

- Hayashi M. K. (2018). Structure-Function Relationship of Transporters in the Glutamate-Glutamine Cycle of the Central Nervous System. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1177.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2012). NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development*, 26(3), 203–234.
- He, M., Dong, H., Huang, Y., Lu, S., Zhang, S., Qian, Y., & Jin, W. (2016). Astrocyte-Derived CCL2 is Associated with M1 Activation and Recruitment of Cultured Microglial Cells. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 38(3), 859–870.
- Héja, L., Barabás, P., Nyitrai, G., Kékesi, K. A., Lasztóczy, B., Toke, O., Tárkányi, G., Madsen, K., Schousboe, A., Dobolyi, A., Palkovits, M., & Kardos, J. (2009). Glutamate uptake triggers transporter-mediated GABA release from astrocytes. *PloS one*, 4(9), e7153.
- Hendrickx, D., van Eden, C. G., Schuurman, K. G., Hamann, J., & Huitinga, I. (2017). Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *Journal of neuroimmunology*, 309, 12–22.
- Hermenegildo, C., Montoliu, C., Llansola, M., Muñoz, M. D., Gaztelu, J. M., Miñana, M. D., & Felipo, V. (1998). Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo. *The European journal of neuroscience*, 10(10), 3201–3209.
- Hernandez-Rabaza, V., Agusti, A., Cabrera-Pastor, A., Fustero, S., Delgado, O., Taoro-Gonzalez, L., Montoliu, C., Llansola, M., & Felipo, V. (2015). Sildenafil reduces neuroinflammation and restores spatial learning in rats with hepatic encephalopathy: underlying mechanisms. *Journal of neuroinflammation*, 12, 195.
- Hernandez-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Gonzalez-Usano, A., Agusti, A., Balzano, T., Llansola, M., & Felipo, V. (2016a). Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarization of microglia. *Journal of neuroinflammation*, 13(1), 83.
- Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-González, L., Malaguarnera, M., Agustí, A., Llansola, M., & Felipo, V. (2016b). Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by sulforaphane. *Journal of neuroinflammation*, 13, 41.
- Hirano T. (2018). Purkinje Neurons: Development, Morphology, and Function. *Cerebellum (London, England)*, 17(6), 699–700.
- Hosoi, T., Okuma, Y., & Nomura, Y. (2002). The mechanisms of immune-to-brain communication in inflammation as a drug target. *Current drug targets. Inflammation and allergy*, 1(3), 257–262.
- Howells, D. W., Porritt, M. J., Wong, J. Y., Batchelor, P. E., Kalnins, R., Hughes, A. J., & Donnan, G. A. (2000). Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Experimental neurology*, 166(1), 127–135.

BIBLIOGRAFÍA

- Huang, Y., Ko, H., Cheung, Z. H., Yung, K. K., Yao, T., Wang, J. J., Morozov, A., Ke, Y., Ip, N. Y., & Yung, W. H. (2012). Dual actions of brain-derived neurotrophic factor on GABAergic transmission in cerebellar Purkinje neurons. *Experimental neurology*, 233(2), 791–798.
- Hunter, S. F., Bowen, J. D., & Reder, A. T. (2016). The Direct Effects of Fingolimod in the Central Nervous System: Implications for Relapsing Multiple Sclerosis. *CNS drugs*, 30(2), 135–147.
- Hurtado, E., Cilleros, V., Nadal, L., Simó, A., Obis, T., Garcia, N., Santafé, M. M., Tomàs, M., Halievski, K., Jordan, C. L., Lanuza, M. A., & Tomàs, J. (2017). Muscle Contraction Regulates BDNF/TrkB Signaling to Modulate Synaptic Function through Presynaptic cPKC α and cPKC β I. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 147.
- Illes, P., Rubini, P., Ulrich, H., Zhao, Y., & Tang, Y. (2020). Regulation of Microglial Functions by Purinergic Mechanisms in the Healthy and Diseased CNS. *Cells*, 9(5), 1108.
- Imlach W. L. (2017). New approaches to target glycinergic neurotransmission for the treatment of chronic pain. *Pharmacological research*, 116, 93–99.
- Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X., & Chun, J. (2004). Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annual review of biochemistry*, 73, 321–354.
- Izadpanah, K., Freyer, D., Weber, J. R., & Braun, J. S. (2014). Brain parenchymal TNF α and IL-1 β induction in experimental pneumococcal meningitis. *Journal of neuroimmunology*, 276(1-2), 104–111.
- 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.
- Jedlitschky, G., Burchell, B., & Keppler, D. (2000). The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *The Journal of biological chemistry*, 275(39), 30069–30074.
- Ji, J., Wang, J., Yang, J., Wang, X. P., Huang, J. J., Xue, T. F., & Sun, X. L. (2019). The Intra-nuclear SphK2-S1P Axis Facilitates M1-to-M2 Shift of Microglia via Suppressing HDAC1-Mediated KLF4 Deacetylation. *Frontiers in immunology*, 10, 1241.
- Jin, X. H., Siragy, H. M., & Carey, R. M. (2001). Renal interstitial cGMP mediates natriuresis by direct tubule mechanism. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 38(3), 309–316.
- Jin, X. H., McGrath, H. E., Gildea, J. J., Siragy, H. M., Felder, R. A., & Carey, R. M. (2004). Renal interstitial guanosine cyclic 3', 5'-monophosphate mediates pressure-natriuresis via protein kinase G. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 43(5), 1133–1139.
- Jin, X., & Yamashita, T. (2016). Microglia in central nervous system repair after injury. *Journal of biochemistry*, 159(5), 491–496.
- Jin W. (2020). Regulation of BDNF-TrkB Signaling and Potential Therapeutic Strategies for Parkinson's Disease. *Journal of clinical medicine*, 9(1), 257.
- Johansson, M., Agusti, A., Llansola, M., Montoliu, C., Strömberg, J., Malinina, E., Ragagnin, G., Doverskog, M., Bäckström, T., & Felipo, V. (2015). GR3027 antagonizes GABAA receptor-

potentiating neurosteroids and restores spatial learning and motor coordination in rats with chronic hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 309(5), G400–G409.

Johnston G. A. (2013). Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. *British journal of pharmacology*, 169(2), 328–336.

Joly-Amado, A., Hunter, J., Quadri, Z., Zamudio, F., Rocha-Rangel, P. V., Chan, D., Kesarwani, A., Nash, K., Lee, D. C., Morgan, D., Gordon, M. N., & Selenica, M. B. (2020). CCL2 Overexpression in the Brain Promotes Glial Activation and Accelerates Tau Pathology in a Mouse Model of Tauopathy. *Frontiers in immunology*, 11, 997.

Jones, S. V., & Kounatidis, I. (2017). Nuclear Factor-Kappa B and Alzheimer Disease, Unifying Genetic and Environmental Risk Factors from Cell to Humans. *Frontiers in immunology*, 8, 1805.

Jover, R., Rodrigo, R., Felipe, V., Insausti, R., Sáez-Valero, J., García-Ayllón, M. S., Suárez, I., Candela, A., Compañ, A., Esteban, A., Cauli, O., Ausó, E., Rodríguez, E., Gutiérrez, A., Girona, E., Erceg, S., Berbel, P., & Pérez-Mateo, M. (2006). Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(6), 1257–1266.

Kaindl, A. M., Degos, V., Peineau, S., Gouadon, E., Chhor, V., Loron, G., Le Charpentier, T., Jossierand, J., Ali, C., Vivien, D., Collingridge, G. L., Lombet, A., Issa, L., Rene, F., Loeffler, J. P., Kavelaars, A., Verney, C., Mantz, J., & Gressens, P. (2012). Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Annals of neurology*, 72(4), 536–549.

Karson, A., Demirtaş, T., Bayramgürler, D., Balci, F., & Utkan, T. (2013). Chronic administration of infliximab (TNF α inhibitor) decreases depression and anxiety-like behaviour in rat model of chronic mild stress. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 112(5), 335–340.

Kato, M., Sugiyama, T., Sakai, K., Yamashita, T., Fujita, H., Sato, K., Tomonari, S., Shichida, Y., & Ohuchi, H. (2016). Two Opsin 3-Related Proteins in the Chicken Retina and Brain: A TMT-Type Opsin 3 Is a Blue-Light Sensor in Retinal Horizontal Cells, Hypothalamus, and Cerebellum. *PloS one*, 11(11), e0163925.

Kaur, C., Sivakumar, V., Zou, Z., & Ling, E. A. (2014). Microglia-derived proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta induce Purkinje neuronal apoptosis via their receptors in hypoxic neonatal rat brain. *Brain structure & function*, 219(1), 151–170.

Kempf, A., Tews, B., Arzt, M. E., Weinmann, O., Obermair, F. J., Pernet, V., Zagrebelsky, M., Delekate, A., Iobbi, C., Zemmar, A., Ristic, Z., Gullo, M., Spies, P., Dodd, D., Gyax, D., Korte, M., & Schwab, M. E. (2014). The sphingolipid receptor S1PR2 is a receptor for Nogo-a repressing synaptic plasticity. *PLoS biology*, 12(1), e1001763.

Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological reviews*, 91(2), 461–553.

Kim, J. B., Sig Choi, J., Yu, Y. M., Nam, K., Piao, C. S., Kim, S. W., Lee, M. H., Han, P. L., Park, J. S., & Lee, J. K. (2006). HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal

BIBLIOGRAFÍA

- death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(24), 6413–6421.
- Kim, G. S., Yang, L., Zhang, G., Zhao, H., Selim, M., McCullough, L. D., Kluk, M. J., & Sanchez, T. (2015). Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor-2 in the disruption of cerebrovascular integrity in experimental stroke. *Nature communications*, 6, 7893.
- Kim, J., Lee, S., Kang, S., Kim, S. H., Kim, J. C., Yang, M., & Moon, C. (2017). Brain-derived neurotropic factor and GABAergic transmission in neurodegeneration and neuroregeneration. *Neural regeneration research*, 12(10), 1733–1741.
- Kimura, A., Ohmori, T., Kashiwakura, Y., Ohkawa, R., Madoiwa, S., Mimuro, J., Shimazaki, K., Hoshino, Y., Yatomi, Y., & Sakata, Y. (2008). Antagonism of sphingosine 1-phosphate receptor-2 enhances migration of neural progenitor cells toward an area of brain. *Stroke*, 39(12), 3411–3417.
- King, M. D., Alleyne, C. H., Jr, & Dhandapani, K. M. (2013). TNF α receptor antagonist, R-7050, improves neurological outcomes following intracerebral hemorrhage in mice. *Neuroscience letters*, 542, 92–96.
- Kono, M., Allende, M. L., & Proia, R. L. (2008). Sphingosine-1-phosphate regulation of mammalian development. *Biochimica et biophysica acta*, 1781(9), 435–441.
- Kroening, K. D., Zimmerman, N. P., Bass, P., & Oaks, J. A. (2003). Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate: a tapeworm-secreted signal molecule communicating with the rat host's small intestine. *The Journal of parasitology*, 89(6), 1136–1141.
- Law, R. M., Stafford, A., & Quick, M. W. (2000). Functional regulation of gamma-aminobutyric acid transporters by direct tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 275(31), 23986–23991.
- Lawrence T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6), a001651.
- Lee, J. Y., Jin, H. K., & Bae, J. S. (2020). Sphingolipids in neuroinflammation: a potential target for diagnosis and therapy. *BMB reports*, 53(1), 28–34.
- Lee-Hotta, S., Uchiyama, Y., & Kametaka, S. (2019). Role of the BDNF-TrkB pathway in KCC2 regulation and rehabilitation following neuronal injury: A mini review. *Neurochemistry international*, 128, 32–38.
- Legendre P. (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 58(5-6), 760–793.
- Lehmann, C., Bette, S., & Engele, J. (2009). High extracellular glutamate modulates expression of glutamate transporters and glutamine synthetase in cultured astrocytes. *Brain research*, 1297, 1–8.
- Lehre, K. P., Levy, L. M., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J., & Danbolt, N. C. (1995). Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(3 Pt 1), 1835–1853.

- Leibowitz, S. M., & Yan, J. (2016). NF- κ B Pathways in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis and the Therapeutic Implications. *Frontiers in molecular neuroscience*, 9, 84.
- Libby P. (2007). Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutrition reviews*, 65(12 Pt 2), S140–S146.
- Lichtenstein, L., Ron, Y., Kivity, S., Ben-Horin, S., Israeli, E., Fraser, G. M., Dotan, I., Chowers, Y., Confino-Cohen, R., & Weiss, B. (2015). Infliximab-Related Infusion Reactions: Systematic Review. *Journal of Crohn's & colitis*, 9(9), 806–815.
- 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. *Molecular neurobiology*, 56(5), 3295–3312.
- Lin, W. W., & Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1175–1183.
- Lin, S. Y., Hsieh, S. Y., Fan, Y. T., Wei, W. C., Hsiao, P. W., Tsai, D. H., Wu, T. S., & Yang, N. S. (2018a). Necroptosis promotes autophagy-dependent upregulation of DAMP and results in immunosurveillance. *Autophagy*, 14(5), 778–795.
- Lin, Y. H., Liang, H. Y., Xu, K., Ni, H. Y., Dong, J., Xiao, H., Chang, L., Wu, H. Y., Li, F., Zhu, D. Y., & Luo, C. X. (2018b). Dissociation of nNOS from PSD-95 promotes functional recovery after cerebral ischaemia in mice through reducing excessive tonic GABA release from reactive astrocytes. *The Journal of pathology*, 244(2), 176–188.
- Liu, T., Clark, R. K., McDonnell, P. C., Young, P. R., White, R. F., Barone, F. C., & Feuerstein, G. Z. (1994). Tumor necrosis factor- α expression in ischemic neurons. *Stroke*, 25(7), 1481–1488.
- Liu, C., Zhang, Y., Liu, Q., Jiang, L., Li, M., Wang, S., Long, T., He, W., Kong, X., Qin, G., Chen, L., Zhang, Y., & Zhou, J. (2018). P2X4-receptor participates in EAAT3 regulation via BDNF-TrkB signaling in a model of trigeminal allodynia. *Molecular pain*, 14, 1744806918795930.
- 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. *Metabolic brain disease*, 22(3-4), 321–335.
- Llansola, M., Hernandez-Viadel, M., Erceg, S., Montoliu, C., & Felipo, V. (2009). Increasing the function of the glutamate-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway increases the ability to learn a Y-maze task. *Journal of neuroscience research*, 87(10), 2351–2355.
- Llansola, M., Montoliu, C., Cauli, O., Hernández-Rabaza, V., Agustí, A., Cabrera-Pastor, A., Giménez-Garzó, C., González-Usano, A., & Felipo, V. (2013). Chronic hyperammonemia, glutamatergic neurotransmission and neurological alterations. *Metabolic brain disease*, 28(2), 151–154.
- Llansola, M., Montoliu, C., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Gomez-Gimenez, B., Malaguarnera, M., Dadsetan, S., Belghiti, M., Garcia-Garcia, R., Balzano, T., Taoro, L., & Felipo, V. (2015). Interplay between glutamatergic and GABAergic

BIBLIOGRAFÍA

neurotransmission alterations in cognitive and motor impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Neurochemistry international*, 88, 15–19.

Long, T., He, W., Pan, Q., Zhang, S., Zhang, D., Qin, G., Chen, L., & Zhou, J. (2020). Microglia P2X4R-BDNF signalling contributes to central sensitization in a recurrent nitroglycerin-induced chronic migraine model. *The journal of headache and pain*, 21(1), 4.

Luscher, B., Fuchs, T., & Kilpatrick, C. L. (2011). GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron*, 70(3), 385–409.

Lynch J. W. (2004). Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiological reviews*, 84(4), 1051–1095.

Maceyka, M., Harikumar, K. B., Milstien, S., et al. (2012). Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends in cell biology*, 22(1), 50–60.

MacLennan, A. J., Carney, P. R., Zhu, W. J., Chaves, A. H., Garcia, J., Grimes, J. R., Anderson, K. J., Roper, S. N., & Lee, N. (2001). An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *The European journal of neuroscience*, 14(2), 203–209.

Madrigal, J. L., & Caso, J. R. (2014). The chemokine (C-C motif) ligand 2 in neuroinflammation and neurodegeneration. *Advances in experimental medicine and biology*, 824, 209–219.

Magni, G., & Ceruti, S. (2014). The purinergic system and glial cells: emerging costars in nociception. *BioMed research international*, 2014, 495789.

Mahad, D. J., & Ransohoff, R. M. (2003). The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Seminars in immunology*, 15(1), 23–32.

Malinow, R., & Malenka, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience*, 25, 103–126.

Mangas-Losada, A., García-García, R., Urios, A., Escudero-García, D., Tosca, J., Giner-Durán, R., Serra, M. A., Montoliu, C., & Felipo, V. (2017). Minimal hepatic encephalopathy is associated with expansion and activation of CD⁴⁺CD28⁻, Th22 and Tfh and B lymphocytes. *Scientific reports*, 7(1), 6683.

Mangas-Losada, A., García-García, R., Leone, P., Ballester, M. P., Cabrera-Pastor, A., Urios, A., Gallego, J. J., Martínez-Pretel, J. J., Giménez-Garzó, C., Revert, F., Escudero-García, D., Tosca, J., Ríos, M. P., Montón, C., Durbán, L., Aparicio, L., Montoliu, C., & Felipo, V. (2019). Selective improvement by rifaximin of changes in the immunophenotype in patients who improve minimal hepatic encephalopathy. *Journal of translational medicine*, 17(1), 293.

Matsumoto, N., Yamashita, T., Shang, J., Feng, T., Osakada, Y., Sasaki, R., Tadokoro, K., Nomura, E., Tsunoda, K., Omote, Y., Takemoto, M., Hishikawa, N., Ohta, Y., & Abe, K. (2020). Up-regulation of sphingosine-1-phosphate receptors and sphingosine kinase 1 in the peri-ischemic area after transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain research*, 1739, 146831.

- Matyash, V., & Kettenmann, H. (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain research reviews*, *63*(1-2), 2–10.
- 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. *Journal of neuroinflammation*, *11*, 121.
- McMillin, M., Frampton, G., Tobin, R., Dusio, G., Smith, J., Shin, H., Newell-Rogers, K., Grant, S., & DeMorrow, S. (2015). TGR5 signaling reduces neuroinflammation during hepatic encephalopathy. *Journal of neurochemistry*, *135*(3), 565–576.
- McMillin, M., Frampton, G., Grant, S., Khan, S., Diocares, J., Petrescu, A., Wyatt, A., Kain, J., Jefferson, B., & DeMorrow, S. (2017). Bile Acid-Mediated Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2 Signaling Promotes Neuroinflammation during Hepatic Encephalopathy in Mice. *Frontiers in cellular neuroscience*, *11*, 191.
- McMillin, M., Grant, S., Frampton, G., Petrescu, A. D., Williams, E., Jefferson, B., Thomas, A., Brahmaroutu, A., & DeMorrow, S. (2019). Elevated circulating TGFβ1 during acute liver failure activates TGFβR2 on cortical neurons and exacerbates neuroinflammation and hepatic encephalopathy in mice. *Journal of neuroinflammation*, *16*(1), 69.
- Mendoza J.E., Foundas A.L. (2008). The cerebellum. *Clinical Neuroanatomy: a Neurobehavioral Approach*. Springer Nature, New York, NY. ISBN 978-0-387-36600-5.
- Micheau, O., & Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, *114*(2), 181–190.
- Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in neurobiology*, *93*(3), 421–443.
- Minami, M., & Satoh, M. (2003). Chemokines and their receptors in the brain: pathophysiological roles in ischemic brain injury. *Life sciences*, *74*(2-3), 321–327.
- 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 (Baltimore, Md.)*, *43*(4), 707–714.
- Mo, X. J., Ye, X. Z., & Li, Y. P. (2019). Effects of euphorbia kansui on the serum levels of IL-6, TNFα, NF-κB, sTNFR and IL-8 in patients with severe acute pancreatitis. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, *33*(2), 469–475.
- Monfort, P., Corbalán, R., Martínez, L., López-Talavera, J., Córdoba, J., & Felipo, V. (2001). Altered content and modulation of soluble guanylate cyclase in the cerebellum of rats with portacaval anastomosis. *Neuroscience*, *104*(4), 1119–1125.
- Montoliu, C., Llansola, M., Kosenko, E., Corbalán, R., & Felipo, V. (1999). Role of cyclic GMP in glutamate neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *Neuropharmacology*, *38*(12), 1883–1891.

BIBLIOGRAFÍA

- Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M. A., del Olmo, J. A., Urios, A., Rodrigo, J. M., & Felipo, V. (2009). IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *Journal of clinical gastroenterology*, *43*(3), 272–279.
- Montoliu, C., Llansola, M., & Felipo, V. (2015). Neuroinflammation and neurological alterations in chronic liver diseases. *Neuroimmunol Neuroinflamm*, *2*:138–44.
- Moretti, R., Leger, P. L., Besson, V. C., Csaba, Z., Pansiot, J., Di Criscio, L., Gentili, A., Titomanlio, L., Bonnin, P., Baud, O., & Charriaut-Marlangue, C. (2016). Sildenafil, a cyclic GMP phosphodiesterase inhibitor, induces microglial modulation after focal ischemia in the neonatal mouse brain. *Journal of neuroinflammation*, *13*(1), 95.
- Moss, M. L., Jin, S. L., Milla, M. E., Bickett, D. M., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., Hoffman, C. R., Kost, T. A., Lambert, M. H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., ... Becherer, J. D. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature*, *385*(6618), 733–736.
- Msall, M., Batshaw, M. L., Suss, R., Brusilow, S. W., & Mellits, E. D. (1984). Neurologic outcome in children with inborn errors of urea synthesis. Outcome of urea-cycle enzymopathies. *The New England journal of medicine*, *310*(23), 1500–1505.
- Mulet, M., Blasco-Ibáñez, J. M., Kirstein, M., Crespo, C., Nacher, J., & Varea, E. (2020). Phenotypic characterization of MCP-1 expressing neurons in the rat cerebral cortex. *Journal of chemical neuroanatomy*, *106*, 101785.
- Nave K. A. (2010). Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature*, *468*(7321), 244–252.
- Nguyen, J. C., Killcross, A. S., & Jenkins, T. A. (2014). Obesity and cognitive decline: role of inflammation and vascular changes. *Frontiers in neuroscience*, *8*, 375.
- Obinata, H., & Hla, T. (2019). Sphingosine 1-phosphate and inflammation. *International immunology*, *31*(9), 617–625.
- Ohtori, S., Takahashi, K., Moriya, H., & Myers, R. R. (2004). TNFalpha and TNFalpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. *Spine*, *29*(10), 1082–1088.
- Olmos, G., & Lladó, J. (2014). Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of inflammation*, *2014*, 861231.
- Olsen R. W. (2018). GABA_A receptor: Positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology*, *136*(Pt A), 10–22.
- Oskeritzian, C. A., Hait, N. C., Wedman, P., Chumanevich, A., Kolawole, E. M., Price, M. M., Falanga, Y. T., Harikumar, K. B., Ryan, J. J., Milstien, S., Sabbadini, R., & Spiegel, S. (2015). The sphingosine-1-phosphate/sphingosine-1-phosphate receptor 2 axis regulates early airway T-cell infiltration in murine mast cell-dependent acute allergic responses. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *135*(4), 1008–1018.e1.

- Pais, T. F., Figueiredo, C., Peixoto, R., Braz, M. H., & Chatterjee, S. (2008). Necrotic neurons enhance microglial neurotoxicity through induction of glutaminase by a MyD88-dependent pathway. *Journal of neuroinflammation*, 5, 43.
- Palasz, E., Wysocka, A., Gasiorowska, A., Chalimoniuk, M., Niewiadomski, W., & Niewiadomska, G. (2020). BDNF as a Promising Therapeutic Agent in Parkinson's Disease. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 1170.
- Paul, M. S., & Limaiem, F. (2020). Histology, Purkinje Cells. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Paxinos, G. & Watson, C. (2007) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 6th Edition, *Academic Press*, San Diego, 9780080475158.
- Pegoretti, V., Baron, W., Laman, J. D., & Eisel, U. (2018). Selective Modulation of TNF-TNFRs Signaling: Insights for Multiple Sclerosis Treatment. *Frontiers in immunology*, 9, 925.
- Peixoto, C. A., Nunes, A. K., & Garcia-Osta, A. (2015). Phosphodiesterase-5 Inhibitors: Action on the Signaling Pathways of Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Cognition. *Mediators of inflammation*, 2015, 940207.
- Petr, G. T., Sun, Y., Frederick, N. M., Zhou, Y., Dhamne, S. C., Hameed, M. Q., Miranda, C., Bedoya, E. A., Fischer, K. D., Armsen, W., Wang, J., Danbolt, N. C., Rotenberg, A., Aoki, C. J., & Rosenberg, P. A. (2015). Conditional deletion of the glutamate transporter GLT-1 reveals that astrocytic GLT-1 protects against fatal epilepsy while neuronal GLT-1 contributes significantly to glutamate uptake into synaptosomes. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(13), 5187–5201.
- Pifarre, P., Prado, J., Baltrons, M. A., Giralt, M., Gabarro, P., Feinstein, D. L., Hidalgo, J., & Garcia, A. (2011). Sildenafil (Viagra) ameliorates clinical symptoms and neuropathology in a mouse model of multiple sclerosis. *Acta neuropathologica*, 121(4), 499–508.
- Poulopoulou, C., & Nowak, L. M. (1998). Extracellular 3',5' cyclic guanosine monophosphate inhibits kainate-activated responses in cultured mouse cerebellar neurons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 286(1), 99–109.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., et al. (2014). *Neuroscience*, 2008. De Boeck, Sinauer, Sunderland, Mass.
- 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.
- Raghunatha, P., Vosoughi, A., Kauppinen, T. M., & Jackson, M. F. (2020). Microglial NMDA receptors drive pro-inflammatory responses via PARP-1/TRMP2 signaling. *Glia*, 68(7), 1421–1434.
- Ransohoff, R. M., Kivisäkk, P., & Kidd, G. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nature reviews. Immunology*, 3(7), 569–581.
- Ransohoff R. M. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist?. *Nature neuroscience*, 19(8), 987–991.

BIBLIOGRAFÍA

- Rivera, C., Voipio, J., & Kaila, K. (2005). Two developmental switches in GABAergic signalling: the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CA VII. *The Journal of physiology*, 562(Pt 1), 27–36.
- 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. *The Journal of biological chemistry*, 281(40), 29431–29435.
- Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez-Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Garcia-Verdugo, J. M., & Felipe, V. (2010). Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, 139(2), 675–684.
- Rohrbach, T., Maceyka, M., & Spiegel, S. (2017). Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate in liver pathobiology. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 52(5), 543–553.
- Rubio, M. E., & Soto, F. (2001). Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(2), 641–653.
- Rummel, C., Sachot, C., Poole, S., & Luheshi, G. N. (2006). Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 291(5), R1316–R1326.
- Saavedra, A., Giralt, A., Arumí, H., Alberch, J., & Pérez-Navarro, E. (2013). Regulation of hippocampal cGMP levels as a candidate to treat cognitive deficits in Huntington's disease. *PLoS one*, 8(9), e73664.
- Salvi, V., Sozio, F., Sozzani, S., & Del Prete, A. (2017). Role of Atypical Chemokine Receptors in Microglial Activation and Polarization. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, 148.
- 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. *Scientific reports*, 9(1), 12106.
- Schäfers, M., Geis, C., Svensson, C. I., Luo, Z. D., & Sommer, C. (2003). Selective increase of tumour necrosis factor-alpha in injured and spared myelinated primary afferents after chronic constrictive injury of rat sciatic nerve. *The European journal of neuroscience*, 17(4), 791–804.
- Schmahmann J. D. (1991). An emerging concept. The cerebellar contribution to higher function. *Archives of neurology*, 48(11), 1178–1187.
- Scimemi A. (2014). Plasticity of GABA transporters: an unconventional route to shape inhibitory synaptic transmission. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 128.
- Seyedsadr, M. S., Weinmann, O., Amorim, A., Ineichen, B. V., Egger, M., Mirnajafi-Zadeh, J., Becher, B., Javan, M., & Schwab, M. E. (2019). Inactivation of sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) decreases demyelination and enhances remyelination in animal models of multiple sclerosis. *Neurobiology of disease*, 124, 189–201.

- Sharma, P., Sharma, B. C., Puri, V., & Sarin, S. K. (2008). Minimal hepatic encephalopathy in patients with extrahepatic portal vein obstruction. *The American journal of gastroenterology*, *103*(6), 1406–1412.
- Shawcross, D. L., Davies, N. A., Williams, R., & Jalan, R. (2004). Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *Journal of hepatology*, *40*(2), 247–254.
- Shawcross, D. L., Wright, G., Olde Damink, S. W., & Jalan, R. (2007). Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, *22*(1), 125–138.
- Shin, S. Y., Julian, L., & Katz, P. (2013). The relationship between cognitive function and physical function in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, *40*(3), 236–243.
- Słowik, A., Ciećko-Michalska, I., Bogdał, J., & Szczudlik, A. (2001). The diagnosis of subclinical hepatic encephalopathy. *Przegląd lekarski*, *58*(12), 1059–1062.
- Smith K. (2010). Neuroscience: Settling the great glia debate. *Nature*, *468*(7321), 160–162.
- Snider, R. S., Maiti, A., & Snider, S. R. (1976). Cerebellar pathways to ventral midbrain and nigra. *Experimental neurology*, *53*(3), 714–728.
- Soond, S. M., Everson, B., Riches, D. W., & Murphy, G. (2005). ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF α -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *Journal of cell science*, *118*(Pt 11), 2371–2380.
- Stokes, L., Layhadi, J. A., Bibic, L., Dhuna, K., & Fountain, S. J. (2017). P2X4 Receptor Function in the Nervous System and Current Breakthroughs in Pharmacology. *Frontiers in pharmacology*, *8*, 291.
- Stone, M. J., Hayward, J. A., Huang, C., E Huma, Z., & Sanchez, J. (2017). Mechanisms of Regulation of the Chemokine-Receptor Network. *International journal of molecular sciences*, *18*(2), 342.
- Tajbakhsh, A., Mokhtari-Zaer, A., Rezaee, M., Afzaljavan, F., Rivandi, M., Hassanian, S. M., Ferns, G. A., Pasdar, A., & Avan, A. (2017). Therapeutic Potentials of BDNF/TrkB in Breast Cancer; Current Status and Perspectives. *Journal of cellular biochemistry*, *118*(9), 2502–2515.
- Takaki, J., Fujimori, K., Miura, M., Suzuki, T., Sekino, Y., & Sato, K. (2012). L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the 'collusion' hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation*, *9*, 275.
- Takazawa, T., Choudhury, P., Tong, C. K., Conway, C. M., Scherrer, G., Flood, P. D., Mukai, J., & MacDermott, A. B. (2017). Inhibition Mediated by Glycinergic and GABAergic Receptors on Excitatory Neurons in Mouse Superficial Dorsal Horn Is Location-Specific but Modified by Inflammation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *37*(9), 2336–2348.
- Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., Sonobe, Y., Mizuno, T., & Suzumura, A. (2006). Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release

BIBLIOGRAFÍA

from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *The Journal of biological chemistry*, 281(30), 21362–21368.

Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805–820.

Tanaka, J., Murate, M., Wang, C. Z., Seino, S., & Iwanaga, T. (1996). Cellular distribution of the P2X4 ATP receptor mRNA in the brain and non-neuronal organs of rats. *Archives of histology and cytology*, 59(5), 485–490.

Tang, Y., & Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular neurobiology*, 53(2), 1181–1194.

Tanila H. (2017). The role of BDNF in Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*, 97(Pt B), 114–118.

Taoro-Gonzalez, L., Arenas, Y. M., Cabrera-Pastor, A., & Felipo, V. (2018). Hyperammonemia alters membrane expression of GluA1 and GluA2 subunits of AMPA receptors in hippocampus by enhancing activation of the IL-1 receptor: underlying mechanisms. *Journal of neuroinflammation*, 15(1), 36.

Taoro-Gonzalez, L., Arenas, Y. M., Cabrera-Pastor, A., & Felipo, V. (2019). Extracellular cGMP Reverses Altered Membrane Expression of AMPA Receptors in Hippocampus of Hyperammonemic Rats: Underlying Mechanisms. *Molecular neurobiology*, 56(6), 4428–4439. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1387-z>

Tchélingérian, J. L., Le Saux, F., & Jacque, C. (1996). Identification and topography of neuronal cell populations expressing TNF alpha and IL-1 alpha in response to hippocampal lesion. *Journal of neuroscience research*, 43(1), 99–106.

Tejeda, G. S., Ayuso-Dolado, S., Arbeteta, R., Esteban-Ortega, G. M., Vidaurre, O. G., & Díaz-Guerra, M. (2016). Brain ischaemia induces shedding of a BDNF-scavenger ectodomain from TrkB receptors by excitotoxicity activation of metalloproteinases and γ -secretases. *The Journal of pathology*, 238(5), 627–640.

Tejeda, G. S., Esteban-Ortega, G. M., San Antonio, E., Vidaurre, Ó. G., & Díaz-Guerra, M. (2019). Prevention of excitotoxicity-induced processing of BDNF receptor TrkB-FL leads to stroke neuroprotection. *EMBO molecular medicine*, 11(7), e9950.

Terada, N., Banno, Y., Ohno, N., Fujii, Y., Murate, T., Sarna, J. R., Hawkes, R., Zea, Z., Baba, T., & Ohno, S. (2004). Compartmentation of the mouse cerebellar cortex by sphingosine kinase. *The Journal of comparative neurology*, 469(1), 119–127.

Terashita, T., Kobayashi, K., Nagano, T., Kawa, Y., Tamura, D., Nakata, K., Yamamoto, M., Tachihara, M., Kamiryo, H., & Nishimura, Y. (2016). Administration of JTE-013 abrogates experimental asthma by regulating proinflammatory cytokine production from bronchial epithelial cells. *Respiratory research*, 17(1), 146.

Tilleux, S., & Hermans, E. (2008). Down-regulation of astrocytic GLAST by microglia-related inflammation is abrogated in dibutyryl cAMP-differentiated cultures. *Journal of neurochemistry*, 105(6), 2224–2236.

- Tillman, L., & Zhang, J. (2019). Crossing the Chloride Channel: The Current and Potential Therapeutic Value of the Neuronal K⁺-Cl⁻ Cotransporter KCC2. *BioMed research international*, 2019, 8941046.
- Timmann, D., Drepper, J., Frings, M., Maschke, M., Richter, S., Gerwig, M., & Kolb, F. P. (2010). The human cerebellum contributes to motor, emotional and cognitive associative learning. A review. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*, 46(7), 845–857.
- Toman, R. E., Payne, S. G., Watterson, K. R., Maceyka, M., Lee, N. H., Milstien, S., Bigbee, J. W., & Spiegel, S. (2004). Differential transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors modulates NGF-induced neurite extension. *The Journal of cell biology*, 166(3), 381–392.
- 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. *Journal of neurochemistry*, 68(4), 1451–1461.
- 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 signalling*, 8(2), 301–310.
- Trang, T., Beggs, S., Wan, X., & Salter, M. W. (2009). P2X4-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(11), 3518–3528.
- Ulmann, L., Hatcher, J. P., Hughes, J. P., Chaumont, S., Green, P. J., Conquet, F., Buell, G. N., Reeve, A. J., Chessell, I. P., & Rassendren, F. (2008). Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(44), 11263–11268.
- van Gassen, K. L., Netzeband, J. G., de Graan, P. N., & Gruol, D. L. (2005). The chemokine CCL2 modulates Ca²⁺ dynamics and electrophysiological properties of cultured cerebellar Purkinje neurons. *The European journal of neuroscience*, 21(11), 2949–2957.
- Van Hauwermeiren, F., Vandenbroucke, R. E., & Libert, C. (2011). Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(5-6), 311–319.
- 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. *The Journal of biological chemistry*, 286(47), 40464–40476.
- Verkhratsky, A. & Butt, A. (2007) Glial neurobiology. Wiley, West Sussex.
- Vilstrup, H., Amodio, P., Bajaj, J., Cordoba, J., Ferenci, P., Mullen, K. D., Weissenborn, K., & Wong, P. (2014). Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 60(2), 715–735.

BIBLIOGRAFÍA

- Vithlani, M., Terunuma, M., & Moss, S. J. (2011). The dynamic modulation of GABA(A) receptor trafficking and its role in regulating the plasticity of inhibitory synapses. *Physiological reviews*, *91*(3), 1009–1022.
- Voogd, J., & Glickstein, M. (1998). The anatomy of the cerebellum. *Trends in neurosciences*, *21*(9), 370–375.
- Wake, H., Watanabe, M., Moorhouse, A. J., Kanematsu, T., Horibe, S., Matsukawa, N., Asai, K., Ojika, K., Hirata, M., & Nabekura, J. (2007). Early changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress result in functional downregulation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *27*(7), 1642–1650.
- Wallach, D., Varfolomeev, E. E., Malinin, N. L., Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V., & Boldin, M. P. (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annual review of immunology*, *17*, 331–367.
- Wang, L., Du, F., & Wang, X. (2008). TNF α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*, *133*(4), 693–703.
- Wang, D., Liu, K., Fukuyasu, Y., Teshigawara, K., Fu, L., Wake, H., Ohtsuka, A., & Nishibori, M. (2020). HMGB1 Translocation in Neurons after Ischemic Insult: Subcellular Localization in Mitochondria and Peroxisomes. *Cells*, *9*(3), 643.
- Wardle, R. A., & Poo, M. M. (2003). Brain-derived neurotrophic factor modulation of GABAergic synapses by postsynaptic regulation of chloride transport. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *23*(25), 8722–8732.
- Watanabe, M., Wake, H., Moorhouse, A. J., & Nabekura, J. (2009). Clustering of neuronal K⁺-Cl⁻ cotransporters in lipid rafts by tyrosine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, *284*(41), 27980–27988.
- Weaver-Mikaere, L., Gunn, A. J., Mitchell, M. D., Bennet, L., & Fraser, M. (2013). LPS and TNF α modulate AMPA/NMDA receptor subunit expression and induce PGE₂ and glutamate release in preterm fetal ovine mixed glial cultures. *Journal of neuroinflammation*, *10*, 153.
- Wei, P., Zheng, Q., Liu, H., Wan, T., Zhou, J., Li, D., Zhou, H., Li, J., Ji, F., Tang, W., & Li, J. (2018). Nicotine-Induced Neuroprotection against Cognitive Dysfunction after Partial Hepatectomy Involves Activation of BDNF/TrkB Signaling Pathway and Inhibition of NF- κ B Signaling Pathway in Aged Rats. *Nicotine & tobacco research: official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, *20*(4), 515–522.
- Weiner I. D. (2004). The Rh gene family and renal ammonium transport. *Current opinion in nephrology and hypertension*, *13*(5), 533–540.
- Weissenborn, K., Ennen, J. C., Schomerus, H., Rückert, N., & Hecker, H. (2001). Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *Journal of hepatology*, *34*(5), 768–773.
- Weissenborn, K., Bokemeyer, M., Krause, J., Ennen, J., & Ahl, B. (2005a). Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease. *AIDS (London, England)*, *19* Suppl 3, S93–S98.

- Weissenborn, K., Giewekemeyer, K., Heidenreich, S., Bokemeyer, M., Berding, G., & Ahl, B. (2005b). Attention, memory, and cognitive function in hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*, 20(4), 359–367.
- Wheeler, D., Knapp, E., Bandaru, V. V., Wang, Y., Knorr, D., Poirier, C., Mattson, M. P., Geiger, J. D., & Haughey, N. J. (2009). Tumor necrosis factor- α -induced neutral sphingomyelinase-2 modulates synaptic plasticity by controlling the membrane insertion of NMDA receptors. *Journal of neurochemistry*, 109(5), 1237–1249.
- Wu, Z., Guo, Z., Gearing, M., & Chen, G. (2014). Tonic inhibition in dentate gyrus impairs long-term potentiation and memory in an Alzheimer's disease model. *Nature communications*, 5, 4159.
- Wu, C. H., Chen, C. C., Hung, T. H., Chuang, Y. C., Chao, M., Shyue, S. K., & Chen, S. F. (2019). Activation of TrkB/Akt signaling by a TrkB receptor agonist improves long-term histological and functional outcomes in experimental intracerebral hemorrhage. *Journal of biomedical science*, 26(1), 53.
- Xu, P., & Derynck, R. (2010). Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Molecular cell*, 37(4), 551–566.
- Xu, T. L., & Gong, N. (2010). Glycine and glycine receptor signaling in hippocampal neurons: diversity, function and regulation. *Progress in neurobiology*, 91(4), 349–361.
- Xu, J., Dong, H., Qian, Q., Zhang, X., Wang, Y., Jin, W., & Qian, Y. (2017). Astrocyte-derived CCL2 participates in surgery-induced cognitive dysfunction and neuroinflammation via evoking microglia activation. *Behavioural brain research*, 332, 145–153.
- Xu, S., Lu, J., Shao, A., Zhang, J. H., & Zhang, J. (2020). Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. *Frontiers in immunology*, 11, 294.
- Ye, L., Huang, Y., Zhao, L., Li, Y., Sun, L., Zhou, Y., Qian, G., & Zheng, J. C. (2013). IL-1 β and TNF α induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *Journal of neurochemistry*, 125(6), 897–908.
- Yosefifard, M., Vaezi, G., Malekirad, A. A., Faraji, F., & Hojati, V. (2019). A Randomized Control Trial Study to Determine the Effect of Melatonin on Serum Levels of IL-1 β and TNF α in Patients with Multiple Sclerosis. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*, 18(6), 649–654.
- Yu, Z., Cheng, G., Wen, X., Wu, G. D., Lee, W. T., & Pleasure, D. (2002). Tumor necrosis factor α increases neuronal vulnerability to excitotoxic necrosis by inducing expression of the AMPA-glutamate receptor subunit GluR1 via an acid sphingomyelinase- and NF- κ B-dependent mechanism. *Neurobiology of disease*, 11(1), 199–213.
- Zabala, A., Vazquez-Villoldo, N., Rissiek, B., Gejo, J., Martin, A., Palomino, A., Perez-Samartín, A., Pulagam, K. R., Lukowiak, M., Capetillo-Zarate, E., Llop, J., Magnus, T., Koch-Nolte, F., Rassendren, F., Matute, C., & Domercq, M. (2018). P2X4 receptor controls microglia activation and favors remyelination in autoimmune encephalitis. *EMBO molecular medicine*, 10(8), e8743.
- Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics*, 45(2), 27–37.

BIBLIOGRAFÍA

- Zhang, J., Guo, J., Zhao, X., Chen, Z., Wang, G., Liu, A., Wang, Q., Zhou, W., Xu, Y., & Wang, C. (2013a). Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil prevents neuroinflammation, lowers beta-amyloid levels and improves cognitive performance in APP/PS1 transgenic mice. *Behavioural brain research*, 250, 230–237.
- Zhang, W., An, J., Jawadi, H., Siow, D. L., Lee, J. F., Zhao, J., Gartung, A., Maddipati, K. R., Honn, K. V., Wattenberg, B. W., & Lee, M. J. (2013b). Sphingosine-1-phosphate receptor-2 mediated NF- κ B activation contributes to tumor necrosis factor- α induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in endothelial cells. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 106, 62–71
- 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. *Biological research*, 50(1), 26.
- Zhang, K., Wang, H., Xu, M., Frank, J. A., & Luo, J. (2018). Role of MCP-1 and CCR2 in ethanol-induced neuroinflammation and neurodegeneration in the developing brain. *Journal of neuroinflammation*, 15(1), 197.
- Zhang, K., & Luo, J. (2019). Role of MCP-1 and CCR2 in alcohol neurotoxicity. *Pharmacological research*, 139, 360–366.
- Zhang, X. W., Wu, Y., Wang, D. K., Jin, X., & Li, C. H. (2019). Expression changes of inflammatory cytokines TNF α , IL-1 β and HO-1 in hematoma surrounding brain areas after intracerebral hemorrhage. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 33(5), 1359–1367.
- Zhang, X., Wang, D., Zhang, B., Zhu, J., Zhou, Z., & Cui, L. (2020). Regulation of microglia by glutamate and its signal pathway in neurodegenerative diseases. *Drug discovery today*, 25(6), 1074–1085.
- Zhou, L., Zhou, W., Zhang, S., Liu, B., Liang, P., Zhou, Y., Zhou, T., Zhang, K., Leng, Y., & Kong, W. (2015). BDNF signaling in the rat cerebello-vestibular pathway during vestibular compensation: BDNF signaling in vestibular compensation. *The FEBS journal*, 282(18), 3579–3591.
- Zhou, Y., Hassel, B., Eid, T., & Danbolt, N. C. (2019). Axon-terminals expressing EAAT2 (GLT-1; Slc1a2) are common in the forebrain and not limited to the hippocampus. *Neurochemistry international*, 123, 101–113.
- Zou, J. Y., & Crews, F. T. (2014). Release of neuronal HMGB1 by ethanol through decreased HDAC activity activates brain neuroimmune signaling. *PloS one*, 9(2), e87915.