



# MARCADORES PATOGENICOS ASOCIADOS A UN PROCESO DE NEURODEGENERACION CEREBELAR EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ENCEFALOPATIA HEPATICA EN RATAS

# PATHOGENIC HALLMARKS ASSOCIATED TO A CEREBELLAR NEURODEGENERATIVE PROCESS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF HEPATIC ENCEPHALOPATHY IN RATS

Mauricio Díaz Muñoz<sup>1</sup>, Andrés Quintanar Stephano<sup>2</sup>, Mayra Lizeth López Cervantes<sup>1</sup>, Sarael Alcauter Solórzano<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, UNAM, campus Juriquilla, 76230 Querétaro, Querétaro

<sup>2</sup> Departamento de Fisiología y Farmacología, Instituto de Neurobiología, UNAM, campus Juriquilla 76230 Querétaro, Querétaro.

<sup>3</sup> Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, UNAM, campus Juriquilla, 76230 Querétaro, Querétaro.\*

## Resumen

Episodios de mal funcionamiento cerebral, o encefalopatía, acompañan frecuentemente padecimientos que cursan con insuficiencia hepática. El hígado enfermo promueve alteraciones metabólicas, como el aumento de amonio circulante, que compromete la actividad neuronal. En este proyecto implementamos un modelo de encefalopatía hepática experimental al practicar una derivación terminal de la vena porta a la vena cava (anastomosis porto-cava, APC) por técnicas microquirúrgicas. Las ratas control se sometieron a una cirugía simulada. Después de 13 semanas de tratamiento, se encontró como principal hallazgo la presencia de una degeneración vacuolar/espongiforme en la capa molecular del cerebelo. Este daño cerebelar se caracterizó de forma histopatológica (por inmunohistoquímica), conductual (por prueba del Rotarod) y metabólica (espectroscopía por RMN). Los resultados mostraron 1) Alteraciones Citológicas: comprenden pérdida de células de Purkinje, alteraciones en astrocitos y glía de Bergmann, y activación microglial; 2) Edema Citotóxico: mostrado por incremento en aquaporina 4, incremento de acetil-aspartato, y disminución de taurina y osmolitos de colina; 3) Trastornos Metabólicos: evidenciados por hiperamonemia, elevación de glutamina, acetil-aspartato, y de creatina/fosfocreatina, así como por incremento en glutamina sintetasa; 4) Presencia del inflammasoma: visto por incremento de NLRP3 y por la activación de la microglía; 5) Deficiencias Motoras: las ratas APC mostraron un equilibrio muy disminuido. La integración de los resultados sugiere que la hiperamonemia causada por la APC promueve un daño cerebelar muy similar al reportado en enfermedades amiloidogénicas. En conclusión, hemos

caracterizado un modelo neurodegenerativo novedoso que podría tener implicaciones relevantes en la fisiopatología cerebelar en situaciones de insuficiencia hepática.

## Palabras clave

*Encefalopatía hepática, neurodegeneración espongiforme, hiperamonemia, edema, inflamación*

## Abstract

*Episodes of cerebral dysfunction, known as encephalopathy, are usually coincident with liver failure. The primary metabolic marker of liver diseases is the increase of blood ammonia which is the principal factor that promotes neuronal damage. In the present project, we use an experimental model of hepatic encephalopathy by implementing a portacaval anastomosis (PCA) surgery. Sham control rats had a false operation. After 13 weeks of treatment, the more distinctive finding was the presence of a vacuolar/spongiform neurodegeneration observed exclusively in the molecular layer of the cerebellum. This cerebellar damage was characterized by histopathological, behavioral and metabolic approaches. The results were: 1) Cellular alterations, observed by loss of Purkinje cells, alterations in astrocytes and Bergmann glia, and activation of microglia; 2) Cytotoxic Edema, shown by increase in aquaporin 4 and acetylaspargate, and reduction in taurine and choline-derivate osmolites; 3) Metabolic adjustments, noted by elevation of circulating ammonia, enhanced presence of glutamine synthetase, and increase of glutamine and creatine/phosphocreatine; 4) Activation of inflammasome, seen by the elevation of the marker NLRP3 as well as by the*

*microglial activation; 5) Locomotor deficits, PCA rats showed a clear deficient performance in the Rotarod test. Integration of all these results lead us to the suggestion that metabolic disturbances associated to PCA can generate a particular cerebellar damage that is similar in several aspects to morphophysiological modifications observed in amyloidogenic disorders. In conclusion, we have characterized a novel neurodegenerative process that could be relevant in the cerebellar function in situations of liver failure.*

**Keywords:** Hepatic encephalopathy, spongiform neurodegeneration, hyperammonemia, edema, inflammation

## 1. Introducción

La encefalopatía hepática (EH) es un trastorno neuropsiquiátrico complejo y multifacético usualmente presente en la enfermedad hepática crónica, aunque también puede presentarse en situaciones de daño agudo y en pacientes con derivación portal (Leise *et al.*, 2014). Hasta un 70% de los pacientes cirróticos llega a presentar encefalopatía, que puede expresarse desde cambios de personalidad y desorientación, hasta casos más severos como pérdida de memoria, ataxia, estupor y coma (Blei & Córdova, 2001). En México, las enfermedades digestivas están entre las primeras 5 causas de mortalidad, y los casos de EH asociados a cirrosis alcohólica se han convertido en un problema prioritario para el Sector Salud por los altos costos hospitalarios, el impacto en la calidad de vida de los pacientes y la necesidad de optimizar el diagnóstico temprano y tratamiento de la enfermedad (Guía práctica, IMSS, 2013).

Los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la EH no están dilucidados. Se acepta que la enfermedad implica un manejo deficiente de metabolitos, por el hígado. Entre estos factores, el amonio juega un papel principal (Jurgens, 1997). El amonio es un catión que se encuentra en equilibrio con el amoniaco. En fluidos biológicos la proporción favorece al amonio. Esta molécula es un intermediario en varias rutas bioquímicas, y su concentración es finamente regulada, ya que el amonio elevado es una toxina celular, principalmente para el sistema nervioso por su alta permeabilidad en la barrera

hematoencefálica. El metabolismo nitrogenado en el hígado está altamente especializado. La zona pericentral del lobulillo hepático expresa la maquinaria metabólica para encausar el nitrógeno hacia la síntesis de urea. Si esta ruta de gran especificidad se ve superada, el amonio es metabolizado hacia la formación de glutamina, que es un sistema de mayor capacidad, en la zona periportal del hígado. En patologías o situaciones de mal funcionamiento hepático, el manejo nitrogenado se ve comprometido, por lo que se favorece un aumento del amonio en la sangre (hiperammonemia), que incide negativamente en el funcionamiento cerebral (Jayakumar & Norenberg, 2108).

Las células del cerebro no tienen ciclo de la urea, por lo que el manejo del amonio es por síntesis de glutamina a través de la glutamina sintetasa, enzima de localización exclusivamente glial. En situaciones de amonio elevado el cerebro sufre alteraciones que comprometen su bioenergética y neurotransmisión. Por ejemplo: a) el equilibrio de la glutamato deshidrogenasa mitocondrial y la glutamina sintetasa se desplaza hacia la formación de glutamina, favoreciendo la reducción del  $\alpha$ -cetoglutarato, un intermediario del ciclo de Krebs; b) se genera un ambiente pro-oxidante mitocondrial que compromete la fosforilación oxidativa; c) las alteraciones mitocondriales favorecen un estado pro-inflamatorio; d) el desbalance en el manejo del glutamato glial y neuronal se traduce en disfunción en la transmisión glutamatérgica y GABAérgica. Estas alteraciones bioquímicas y de comunicación celular, usualmente van acompañadas de edema celular, inflamación y muerte celular (Jindal & Jagdish, 2019).

El uso de sistemas experimentales que permitan el estudio de los mecanismos celulares relacionados a procesos patológicos es un imperativo de la investigación biomédica. En el contexto de la EH se han implementado una variedad de acercamientos experimentales que se basan en la implementación de una disfunción hepática y un incremento espontáneo/inducido de amonio (Chamuleau, 1996). El modelo experimental que utilizamos en el presente estudio es la cirugía conocida como anastomosis porto-cava (APC).

La APC en roedores implica derivar la vena porta, que comunica al duodeno con el hígado, hacia la vena cava inferior. Conlleva que los nutrientes ingeridos en la dieta transiten de forma directa a la circulación sistémica,

sin pasar directamente por el órgano hepático. La APC es un procedimiento aceptado desde hace varias décadas para reproducir un modelo de hipofuncionamiento hepático, que se acompaña de hiperamonemia y de muchas de las manifestaciones de la EH (Lee & Fisher, 1961). Nuestro grupo de trabajo ha sido exitoso utilizando este modelo experimental al publicar un estudio reciente en donde se demostró una reducción en respuestas pro-oxidantes de fracciones subcelulares del hígado, así como un estado hipometabólico asociado a la APC (Vázquez-Martínez *et al.*, 2019).

Un gran porcentaje de la investigación biomédica relacionada con la APC experimental ha estado enfocado en la caracterización de anomalías en la neurotransmisión asociados a las etapas progresivas de la EH, así como la patogenia de alteraciones en las funciones cognitivas, espaciales y motoras (Butterworth, 2016; Malaguarnera *et al.*, 2019). Un aspecto menos explorado son las alteraciones que se manifiestan en zonas cerebrales sensibles cuando la EH se instala por más de 6 semanas.

En este contexto, el objetivo del presente proyecto fue caracterizar marcadores histopatológicos, conductuales y metabólicos del proceso neurodegenerativo espongiiforme que fue detectado en la zona molecular del cerebelo de ratas con APC después de 13 semanas postcirugía. Los hallazgos experimentales indican la existencia de un evento novedoso de daño cerebral que impacta selectivamente la estructura y función del cerebelo, y que se sustenta en alteraciones del metabolismo nitrogenado.

## 2. Procedimiento experimental

### 2.1. Animales

Los experimentos se realizaron en ratas Wistar macho, de ~280 g (~8 semanas de edad) al comienzo del experimento. Los animales se separaron y colocaron en jaulas individuales (17x41x20 cm) a temperatura ambiente (~22 °C), y se mantuvieron en un ciclo luz-oscuridad de 12h:12 h (luz encendida a las 08:00 h), acceso a comida y agua *ad libitum*.

### 2.2. Anastomosis Porto-cava

La APC porta-cava se practicó en ratas Wistar siguiendo el procedimiento descrito por Lee y Fischer (1961). Brevemente, las ratas se sometieron a anestesia

ketamina/xilacina (70 y 8 mg/kg) a una dosis final 10 mL/kg (i.p.), y se realizó una laparotomía para tener acceso a los órganos abdominales. La vena porta se diseccionó y ocluyó, el extremo de la vena porta se conectó a una ventana en la vena cava que previamente se obstruyó con clips quirúrgicos. La APC se finalizó en menos de 20 min para asegurar la sobrevivencia de los sujetos. Las ratas con operación simulada (Sham) fueron sometidas al mismo procedimiento (hasta el uso de los clips quirúrgicos), pero sin cortar ningún vaso sanguíneo. Los animales se mantuvieron en recuperación en cajas con comida y agua *ad-libitum* (2-3 ratas en cada una). La validación por nuestro grupo del modelo de hiperamonemia por APC fue publicada por Vázquez-Martínez *et al.* (2019).

### 2.3. Histología

Después de 13 semanas de la cirugía, los cerebelos se fijaron en PFA 4% durante 24 h y crio-protegieron en un tren de sacarosa 10 al 30 %. Posteriormente fueron embebidos en Tissue Teck® Leica. El tejido se cortó en un criostato modelo 3050S Leica a 30 µm de grosor y fue montado en portaobjetos electrocargados. Las laminillas fueron destinadas a las diferentes tinciones e inmunomarcas.

### 2.4. Hematoxilina y Eosina

El tejido fue deshidratado e incrustado en parafina. Se hicieron rebanadas a 6 µm y se tiñeron de acuerdo con el protocolo H&E. Brevemente, se disolvió 1g de hematoxilina en alcohol etílico al 95%, 20 g de sulfato de aluminio y potasio, y luego se hirvió. La hematoxilina es selectiva para material nuclear. La eosina se disolvió en alcohol etílico al 80% y 0.5 mL de ácido acético. La eosina es selectiva para el material citoplasmático. Los portaobjetos se sellaron con solución Entellan® y se analizaron en un microscopio Olympus CX30. Las imágenes fueron evaluadas por un patólogo experto.

### 2.5. Cuantificación de células de Purkinje

Las imágenes se adquirieron con Imagenscope Leica, Zoom óptico 8x, 10 imágenes representativas por folia cerebelosa (n=5). Se cuantificaron los cuerpos celulares en 3 secciones estándares de 300 µm, trazando una línea a mano alzada, evitando los surcos y giros, siguiendo lo reportado por Louis *et al.*, 2013. Los datos se represen-

taron en densidad lineal (número de células de Purkinje por mm).

### 2.6. Cuantificación de células de la microglía

Se evaluó el estado de reposo y/o reactivo de la microglía en el cerebelo (IBA-1) mediante el software Image J para Fiji (NIH, USA). El procesamiento de las imágenes implicó convertir las imágenes a binarias y completar el análisis con la función "Skeleton". Los parámetros de número de nodos (número de procesos, puntos de ramificación, se determinaron mediante la prueba de k-mean (2 clusters), tal y como se describe (Davis et al., 2017). Los parámetros celulares se procesaron en MatLab (Versión 7.9.0.529, Mathworks, Inc). Análisis individual (50 células por grupo).

### 2.7. Inmunofluorescencia

En secciones sagitales de 30  $\mu\text{m}$ , se hicieron 3 lavados de 10 min con PBS 1x, pH 7.4. Se bloquearon con PBS1x, 0.3% de Tritón 100x, 5% de Suero Normal de Cabra). Se utilizó el marcador de glía anti-GFAP (conejo 1:1000; Abcam, ab7260) y para microglía, anti-IBA-1 (conejo 1:1000, Abcam; ab 5076). Las muestras se lavaron con PBS 3 veces 5 min y se revelaron con anti-Alexa 488 (conejo). Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio, dilución 1:1000 + RNasa A 1:1000 por 15 min. El montaje se realizó con la solución vectashield. La inflamación y el edema cerebral se evaluaron por inmunofluorescencia. Se utilizó el marcador contra inflamación anti-NLRP3 (conejo 1:50; NOVUS, NBP1-77080), y para Aquaporina 4, el anti-AQP4 (conejo 1:200; Alomone Labs, 249-323). Metabolismo del amonio con anticuerpo para glutamina sintetasa (ratón1:300; Milipore, MAB302). Los datos se representan en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). Se tomaron 10 imágenes representativas por laminillas. Todas las imágenes fueron tomadas con microscopía confocal Zeiss LSM 780 DUO; en GFP ( $\lambda= 488$ ) y RGP ( $\lambda= 561$ ).

### 2.8. Rotarod

Se evaluó la coordinación motora mediante la prueba de rodillo rotatorio "rotarod". Las ratas control y experimentales (n=8) cumplieron con un protocolo de habituación colocándolas en el cilindro a una velocidad constante de 10 rpm durante 60 s (4 ensayos por día/4 días). El protocolo de prueba consistió en colocar a las ratas en el cilindro, en aceleración (4 a 40 rpm), durante

60 s (4 ensayos por día/4 días) y registrar el tiempo de caída. Rotarod serie 8, IITC Life Science Inc. 23924 Victory Blvd Woodland Hills, CA 91367.

### 2.9. Espectroscopía por Resonancia Magnética

Se utilizó un equipo de resonancia magnética Bruker Pharmascan 70/16US de 7 Teslas (Bruker Biospin MRI GmbH, Alemania. Se adquirieron imágenes en tres proyecciones para identificar la posición del cerebelo dentro del equipo. Posterior a un procedimiento de homogenización del campo magnético, se utilizó una secuencia PRESS (Point-RESolved Spectroscopy) para  $^1\text{H}$ , con tiempo de repetición de 2500 ms, tiempo de eco de 16 ms, y 256 adquisiciones en total para disminuir el efecto del ruido. Los datos de espectroscopía se obtuvieron de un voxel de dimensiones  $7 \times 3 \times 3.3 \text{ mm}^3$ , ubicado en el cerebelo dorsal, el tiempo de adquisición de espectroscopía fue de 10.44 min. Los datos de espectroscopía se analizaron en el espacio de las frecuencias utilizando el software "Linear Combination of Model spectra" (LCModel) (Provencher, 2001). Se utilizó una base de modelos de señal para cada metabolito y la concentración final se estimó tomando como referencia la señal del agua obtenida del mismo volumen de interés. Se analizaron las concentraciones de los metabolitos cuya cota inferior de Cramer-Rao para la varianza del ajuste no sobrepasó un valor del 20%.

### 2.10. Análisis Estadístico

La cuantificación de fluorescencia se realizó mediante el software Image J versión fiji. Los datos se analizaron mediante una prueba t de Student y se presentan como media  $\pm$  error estándar. Se consideró el resultado estadísticamente significativo con un umbral de significancia establecido en  $p < 0.05$ . Para la prueba del Rotarod se utilizó una prueba ANOVA de comparación múltiple utilizando la prueba Tukey (16 familias, 10 comparaciones por familia), con intervalos de confianza del 95%. Software: los análisis estadísticos se hicieron con GraphPad Prism 5; los gráficos se realizaron con SigmaPlot 5.0 y 10.0 para Windows.

## 3. Resultados

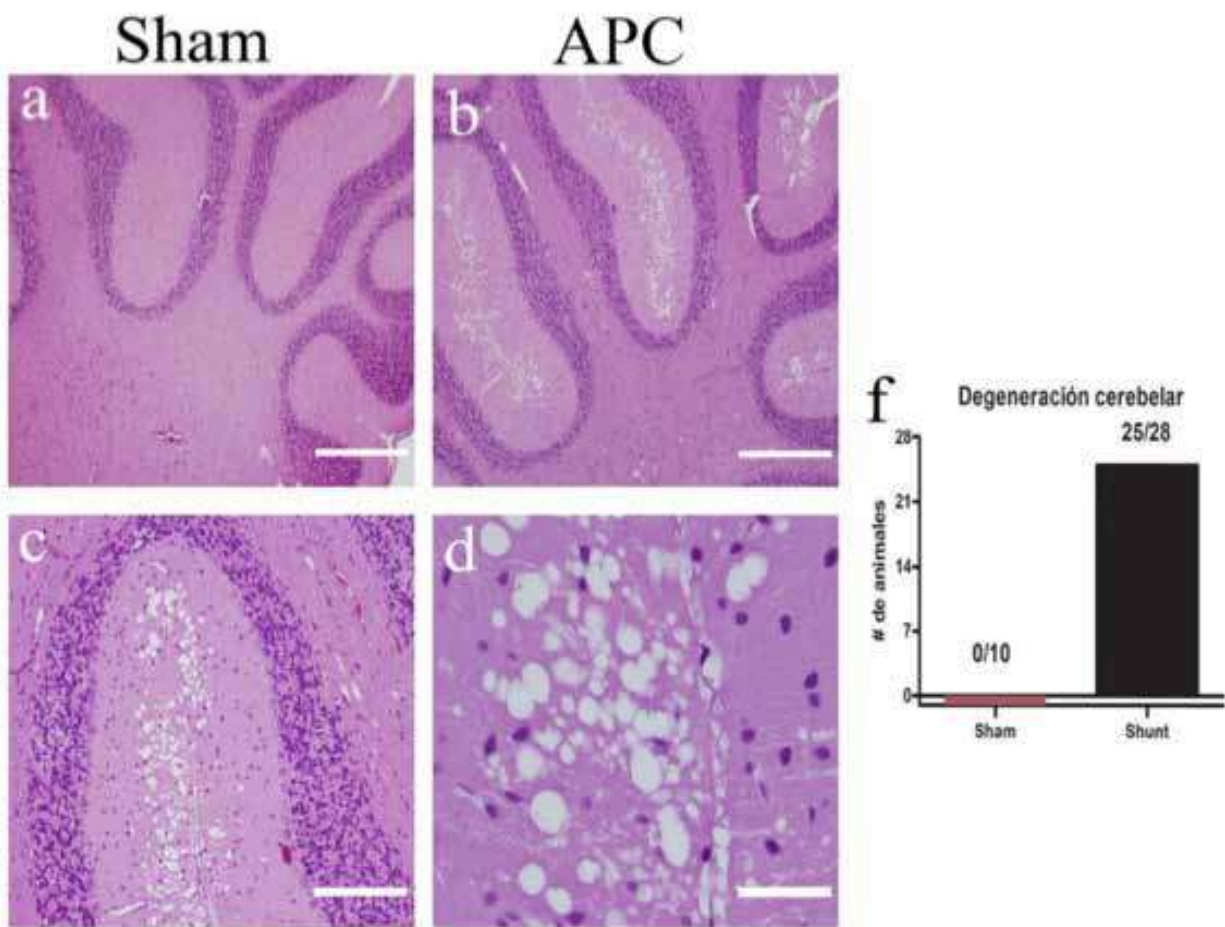
El grupo APC presentó después de 13 semanas de la cirugía una disminución significativa (35%) en la relación entre el tamaño del hígado y el peso corporal, así como niveles incrementados (95%) de amonio circulante

[Vázquez-Martínez *et al.*, 2019]. Ambas condiciones validan la correcta implementación y la efectividad del modelo experimental.

### 3.1. Degeneración espongiiforme

Análisis histológico del tejido cerebral mostró que en el ~90% de los sujetos examinados se presentó una degeneración

vacuolar en la zona molecular del cerebelo, con un aspecto espongiiforme característico (Figura 1). Estas vacuolas se extendieron por el eje longitudinal presentando diversos tamaños, sugiriendo estados variables de agregación. Además de las vacuolas en el cerebelo, se observaron astrocitos Alzheimer tipo II, ya reportados en modelos hiperamonémicos (resultados no mostrados).

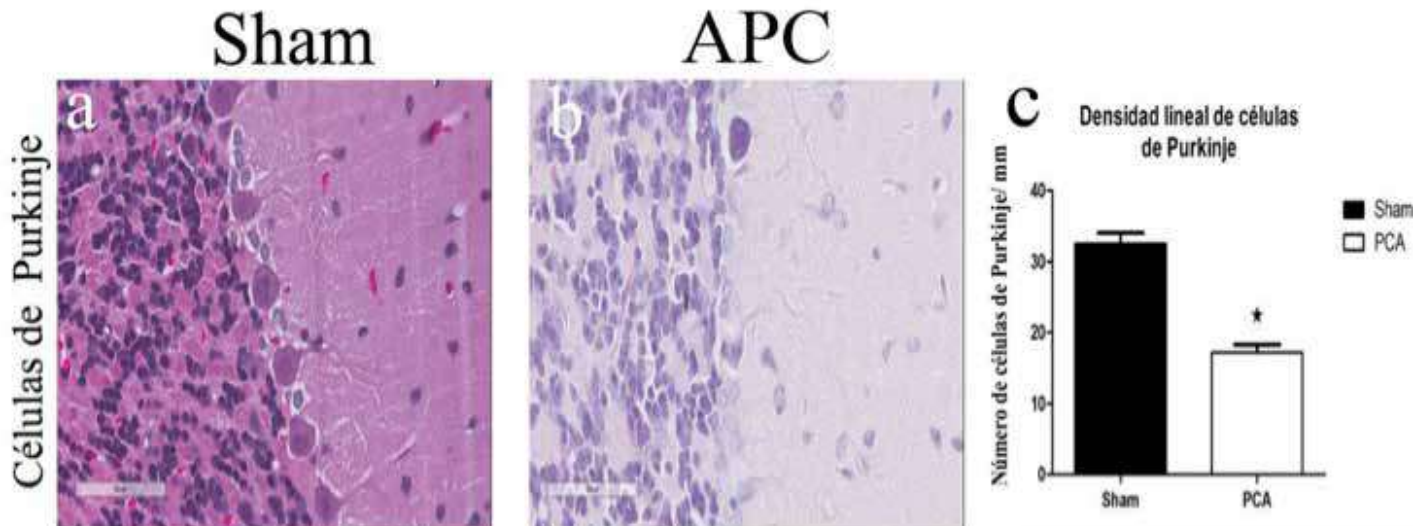


**Figura 1.** Degeneración en cerebelo, ratas PCA 13 semanas post cirugía. Tinción de Hematoxilina  $\xi$  Eosina [H&E]. Panel a) corte sagital de cerebelo de una rata sham, objetivo 10x. b) corte sagital de una rata PCA, objetivo 10x. c) vacuolas en la capa molecular del cerebelo, objetivo 25x. d) imagen representativa del daño en la capa molecular de una rata PCA, objetivo 40 x. f) cuantificación de la presencia del daño en cerebelos de ratas PCA. Escala [barra= 100  $\mu$ m].

### 3.2. Alteraciones citológicas

Para caracterizar de manera histopatológica los cambios celulares que acompañaban el proceso espongiiforme del cerebelo, se procedió a cuantificar las células de Purkinje, y a través de marcadores específicos, el estado de las células gliales (astrocitos y glía de Bergmann) y de la microglía. La cuantificación en cortes histológicos de cerebelo de densidad lineal en la capa Purkinje de ratas Sham reveló una continuidad celular delimitando la capa

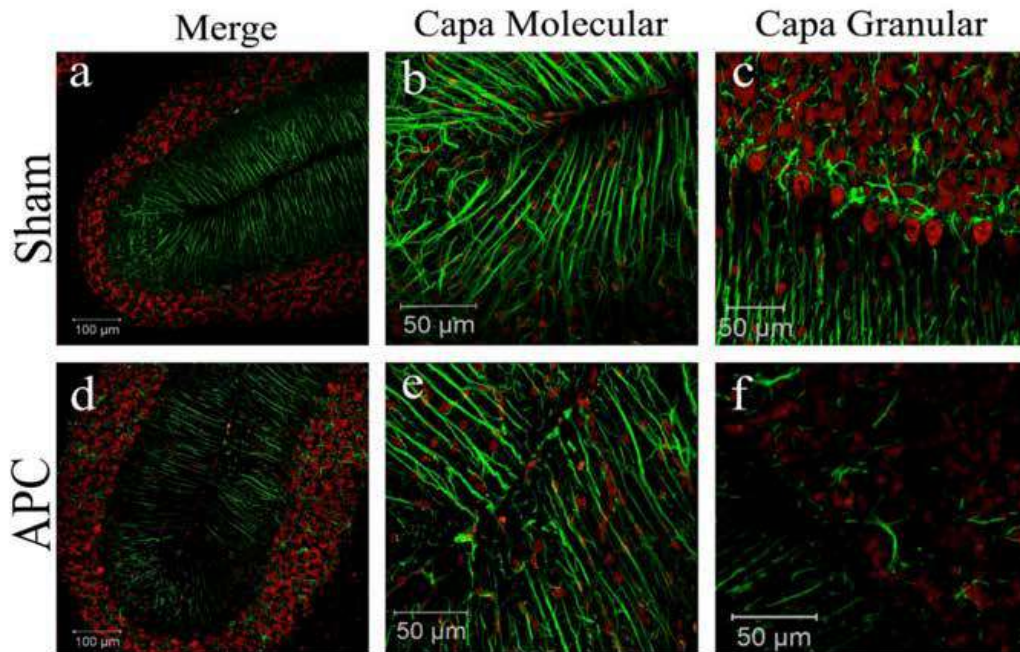
molecular y la capa granular del cerebelo. La morfología de las células de Purkinje mostró un contorno normal, sin percibirse alteraciones en la forma de los núcleos y organelos. En contraste, las ratas APC evidenciaron una disminución significativa de estas neuronas (~46%); una inspección detallada de las células de Purkinje presentes reveló daños estructurales principalmente por pleomorfismo celular, hinchamiento nuclear y vacuolización intracelular (Figura 2).



**Figura 2.** Pérdida de neuronas Purkinje en cerebelo, ratas PCA 13 semanas post cirugía. Panel a) sección de un corte sagital de cerebelo de una rata sham, representación de la capa Purkinje. b) sección de un corte sagital de una rata PCA. [Barras paralelas representan la capa Purkinje]. c) cuantificación de densidad lineal de neuronas Purkinje. Significancia representada (\*), prueba t;  $P < 0.005$ . Tinción H & E. Zoom óptico de 8x, escala [barra= 60  $\mu$ m].

Utilizando un anticuerpo contra GFAP (glial fibrillary acidic protein) se marcó de manera específica astrocitos y glía de Bergmann de las capas molecular y granular del cerebelo. Aunque no se observó cambios en la inmunoreactividad contra GFAP al comparar las ratas Sham y APC, se

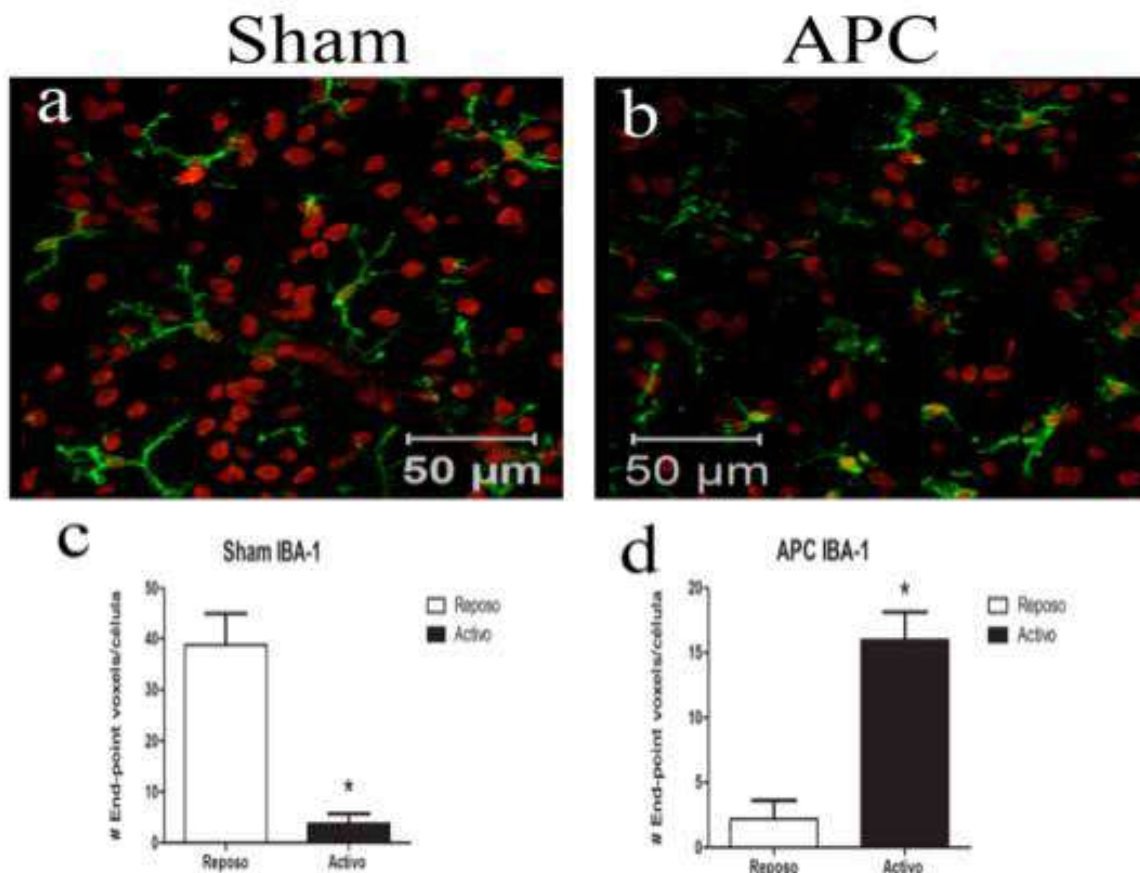
detectó en los animales hiperamonémicos un evidente desarreglo en los procesos de la glía de Bergman además del hinchamiento de los pies perivascuales de los astrocitos que están en contacto con las células endimarias en la capa molecular del cerebelo (Figura 3)



**Figura 3.** Inmunofluorescencia del marcador GFAP en la capa molecular y granular en cerebelo, ratas APC 13 semanas post cirugía. Arriba cerebelo ratas Sham. Panel a) Corteza de cerebelo, b) capa molecular, c) capa granular. Abajo ratas APC. d) corteza del cerebelo, e) capa molecular, f) capa granular. En verde GFAP, rojo Yoduro de propidio, núcleos. [a y d) Tilescan 2 \* 2 tomada en confocal, objetivo 25x. (b-f) proyección en Z- stack de 5  $\mu$ m en cortes de cerebelo, objetivo 25x.

Para evaluar el estado de activación de la microglía, cortes de cerebelo se inmuno-marcaron contra la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1, por sus siglas en inglés IBA-1. En cortes de ratas Sham se observó células de microglía en estado de reposo, es decir, con sus procesos alargados y ramificados; en

contraste, la microglía en las ratas APC mostraron una morfología característica de estado reactivo, es decir, con clara retracción de los procesos, y además de una dispersión de células IBA-1 positivas a través de las capas de la corteza de cerebelo [Figura 4].

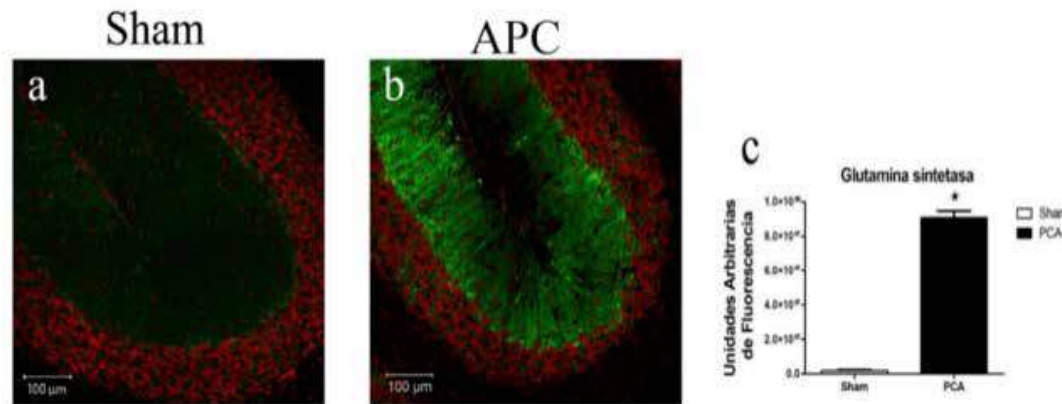


**Figura 4.** Evaluación del estado en reposo/reactivo de la microglía (IBA-1) en cortes sagitales de la corteza del cerebelo, ratas PCA. Arriba Panel a) Células IBA-1 positivo en Sham; microglía en reposo. b) Células IBA-1 positivo en APC, microglía ameboidea. Abajo (c y d) Estado en reposo/activo, cuantificación del número de puntos finales (voxel) expresado como End-point voxel de 50 células por grupo (n= 7). En verde IBA-1 marcador de microglía. En rojo yoduro de propidio, marcador de núcleos. Imágenes vistas por microscopia confocal, proyección en Z, stack corte óptico de 5 µm, objetivo 25x.

### 3.3. Adaptaciones metabólicas e hídricas

La caracterización de los cerebelos afectados después de 13 semanas de la APC también incluyó la inmunohistoquímica de la principal enzima encargada del metabolismo del amonio cerebral, la glutamina sintetasa de localización glial. En las ratas Sham se observó una

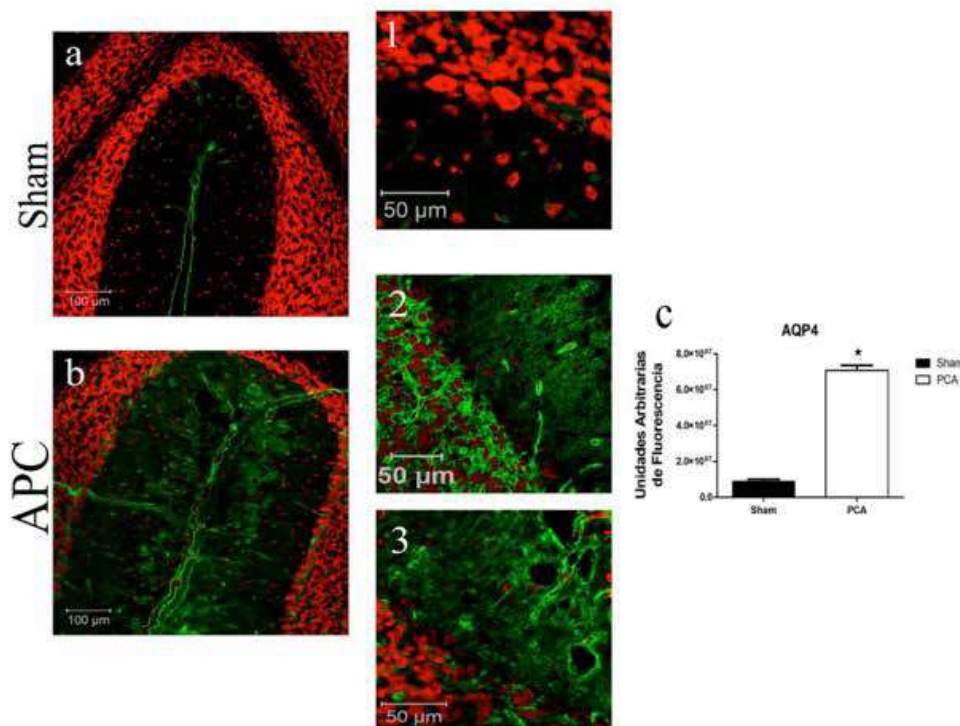
señal discreta en la capa molecular del cerebelo y casi inexistente en la capa granular. El principal cambio detectado en las ratas APC fue un incremento de ~97% en la presencia de esta enzima, principalmente en la capa molecular, pero también apreciable en la capa granular [Figura 5].



**Figura 5.** Inmunoreactividad contra GS en secciones sagitales de cerebelo a las 13 semanas post cirugía. Panel a) GS positivo en rata sham. b) GS positivo en rata APC. c) Cuantificación de densidad de fluorescencia del marcador GS. En verde GS marcador de la enzima glutamina sintetasa. En rojo yoduro de propidio, marcador de núcleos. Tilescan 2 \* 2, microscopia confocal, objetivo 25x. Significancia representada (\*), prueba t, valor de P <0.005.

El manejo alterado de amonio en el cerebro se acompaña de desequilibrios celulares y compartimentales en el manejo del agua, lo que resulta en el establecimiento de edema que usualmente es citotóxico. Como marcador de esta condición, se llevó a cabo una inmuno-detección del canal de agua aquaporina 4. Los cerebelos de las ratas Sham mostraron una señal definida en la parte media de la capa molecular. En contraste,

los animales APC incrementaron hasta 6 veces la presencia de aquaporina 4 en la capa molecular, pero extendiendo su ubicación también en la capa granular del cerebelo. Análisis más detallado de esta presencia incrementada mostró estructuras filiformes que atraviesan la capa molecular e incursionan en la capa granular, así como marcaje de aquaporina 4 (AQP -4) en células ependimales (Figura 6).



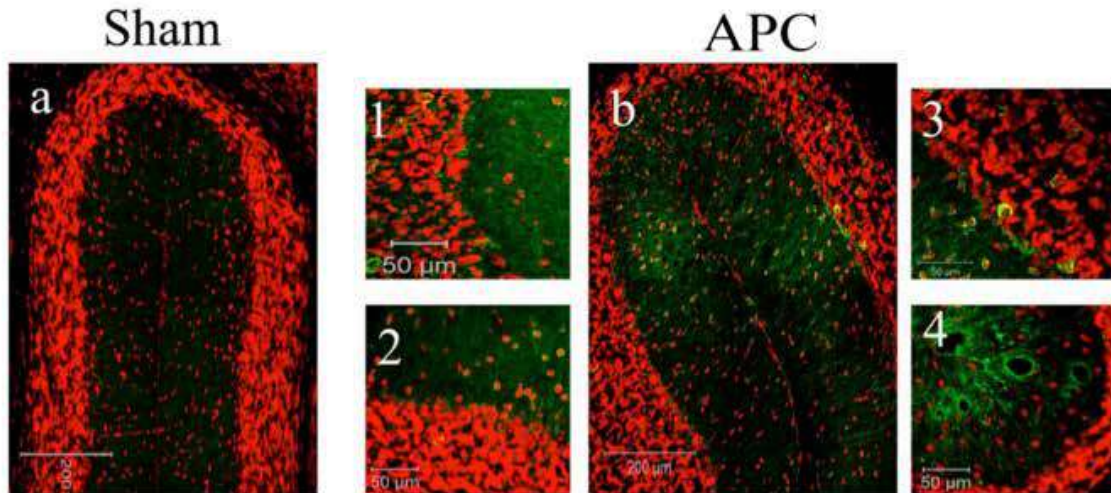
**Figura 6.** Inmunoreactividad de AQP 4 en cerebelo ratas APC a las 13 semanas post cirugía. Panel a) Marcador AQP 4 en rata sham; 1) Acercamiento (crop 1.8) de la capa molecular, granular y Purkinje. b) Marcador AQP 4 en rata PCA; 2) Capa molecular (crop 1.8, proyección en Z stack). 3) Capa molecular, enfoque en las células ependimarias (crop 1.8). c) cuantificación de densidad de fluorescencia AQP 4. Significancia representada (\*), prueba t, valor de P <0.005. En verde AQP 4; rojo Yoduro de propidio núcleos (a y b), Tilescan 2 \* 2 tomada en confocal, objetivo 25x. (Proyección en Z-stack de 5 µm).



### 3.4. Inflamasoma

La activación del proceso inflamatorio se monitoreó por la presencia del marcador NLRP3. En las ratas Sham se observó una señal discreta principalmente en la capa molecular. Los cerebelos de las ratas APC mostraron una

clara elevación del marcaje, pero el principal cambio en las ratas hiperamonémicas fue un incremento en la densidad de la señal en el citoplasma de ciertas poblaciones celulares, muy probablemente astrocitos (Figura 7).

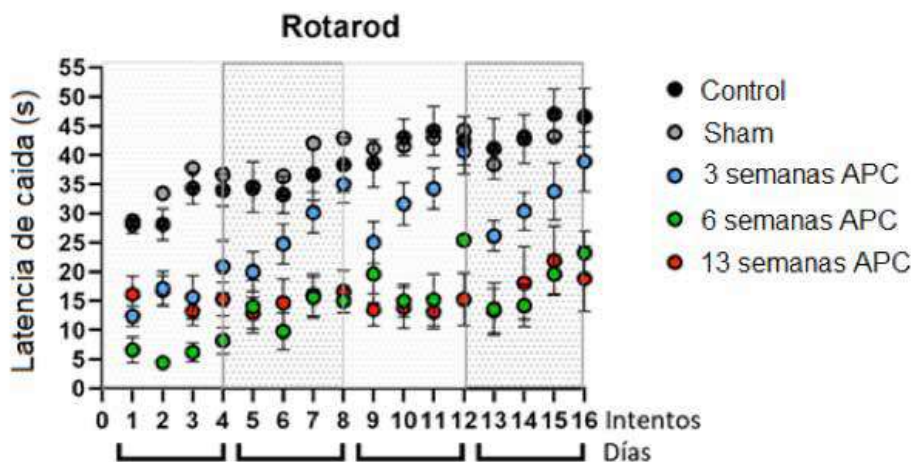


**Figura 7.** Inmunoreactividad de NLRP3 en cerebelo ratas APC a las 13 semanas post cirugía. Panel a) Marcador NLRP3 en rata sham; b) Inmunoreactividad de NLRP3 en rata APC. 1) Inflamasomas en la capa granular (crop 1.8). 2) Inmunoreactividad en la periferia de células residentes de capa molecular (crop 1.8). 3) Capa granular, inflamasoma (crop 1.8). 4) Inmunoreactividad de NLRP3 en el daño vacuolar del cerebelo. En verde NLRP3; rojo Yoduro de propidio núcleos. Tilescan 2 \* 2 tomada en confocal, objetivo 25x.

### 3.5. Evaluación de la coordinación motora

Una de las principales funciones que se le atribuyen al cerebelo es la del control del equilibrio corporal, tono muscular, y la planeación e iniciación de movimientos discretos en las extremidades (Shiotzuki et al., 2010). La prueba de rotarod descartó alguna posible lesión en ratas Sham (Figura 8, círculos grises). Ratas sin procedimiento quirúrgico mostraron una mejora en su desempeño a lo largo

de la prueba (círculos negros). A las 3 semanas postcirugía, las ratas APC mostraron un déficit inicial en la prueba que eventualmente fue superado por aprendizaje hasta alcanzar niveles normales. A las 6 semanas (círculos verdes), en las ratas APC se observó una reducción total en el desempeño motor con respecto a los controles; además es evidente una falta de aprendizaje. El desempeño de ratas APC de 6 y 13 semanas (círculos rojos) de tratamiento fue similar.



**Figura 8.** Coordinación motora “Rotarod”. Esquema representativo del desempeño temporal en la coordinación motora en ratas APC 3 semanas (círculos azules), 6 semanas (círculos verdes), 13 semanas (círculos rojos) vs controles (ratas sanas, negro) y Sham (cirugía placebo, gris).

### 3.6. Metabolitos en cerebelo

**Tabla 1.** Niveles de metabolitos cerebelares cuantificados por medio de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear. Los metabolitos mostrados son los que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, calculadas con una prueba de t de student ( $p < 0.05$ ). a = diferencia por tratamiento; b = diferencia por tiempo. Los datos están expresados en Unidades Institucionales, y son el producto de 32 observaciones independientes.

Metabolitos												
Grupo	Gln (glutamina)		GSH (glutación)		NAA (N-acetilaspart		Tau (Taurina)		GPC+PCh (metab colina)		Cr+PCr (creatina)	
	Promedio	Error	Promedio	Error	Promedio	Error	Promedio	Error	Promedio	Error	Promedio	Error
Sham 6	6.8	0.4	2.6	0.1	11.1	0.5	5.7	0.3	2.8	0.1	16.6	0.5
APC 6	4.8	0.3 <sup>a</sup>	2.6	0.4	12.7	0.6	5.7	0.3	2.8	0.2	16.6	0.9
Sham 13	23.5	2.2 <sup>b</sup>	5.1	0.3 <sup>b</sup>	9.9	0.1	4.1	0.3 <sup>b</sup>	2.0	0.4	15.4	1.1
APC 13	37.5	5.5 <sup>a,b</sup>	5.8	0.3 <sup>b</sup>	14.1	1.4 <sup>a</sup>	0.9	0.9 <sup>a,b</sup>	0.4	0.2 <sup>a,b</sup>	23.2	1.3 <sup>a,b</sup>

## 4. Discusión

El bloque de datos experimentales de este proyecto es un compendio interdisciplinario que abarca enfoques histopatológicos, conductuales y metabólicos. Amalgama técnicas analíticas complementarias como: 1) la inmunohistoquímica, que permite la identificación y la ubicación anatómica de las proteínas de interés, 2) pruebas etológicas como el rotarod, que es una prueba ampliamente aceptada para evaluar el funcionamiento cerebelar [Shiotzuki et al., 2010], 3) la espectroscopía por RMN que funciona para cuantificar en condiciones in vivo, la presencia de metabolitos de importancia metabólica y marcadores bioquímicos indicadores de pérdida de integridad celular.

En este trabajo se implementó un modelo experimental de EH en roedores, al efectuar una técnica quirúrgica de alta complejidad como lo es la anastomosis porto-cava. Nuestros experimentos se centraron en estudiar los cambios cerebelares, ya que sólo esa parte del cerebro se vio particularmente afectada. En un reporte previo, ya se había caracterizado un daño cerebelar en un modelo de APC, pero con tratamientos agudos de lipopolisacárido [García-Lezana et al., 2017]. Por lo tanto, el presente protocolo es la primera vez que un proceso neurodegenerativo espontáneo y privativo del cerebelo se estudia de manera sistemática en ratas

con APC. El daño cerebelar que encontramos fue de naturaleza espongiiforme, presentando una vacuolización característica, por lo que recuerda a las enfermedades relacionadas con patologías cerebrales amiloides. Este resultado histopatológico se vuelve de gran interés biomédico, ya que la degeneración espongiiforme no se había ligado con anterioridad a perturbaciones metabólicas, como las asociadas a la hiperamonemia.

### 4.1. Daño celular

Los circuitos neuronales del cerebelo se conservan en vertebrados a lo largo de la escala filogenética (desde lampreas hasta cetáceos), y despliegan propiedades integrativas únicas que capacitan la integración sensoriomotora y la coordinación motriz con una alta precisión temporal [Kistler y De Zeeuw, 2002]. De manera consistente, las ratas APC presentaron vacuolas de tamaños diversos, posiblemente indicando grados de agregación, en la línea media de la capa molecular del cerebelo. Esta alteración celular es característica de lesiones observadas en cerebros de organismos con patologías amiloides, como las asociadas con priones, proteína  $\beta$ -amiloide, tau y  $\alpha$ -sinucleína [McAllister et al., 2020]. Desde una perspectiva de investigación básica este hallazgo conlleva interesantes implicaciones, ya que la relación entre amiloidopatías y desequilibrios

metabólicos, como los asociados a la EH, sólo se han reportado en la Enfermedad de Alzheimer (Zhou et al., 2018). Esta posibilidad, será explorada por nuestro grupo en un proyecto colateral a través de una colaboración internacional en un futuro cercano.

En paralelo a la presencia de vesículas, nuestro estudio detectó alteraciones en todos los tipos celulares del cerebelo: a) pérdida significativa de células de Purkinje, siendo estas células la principal vía eferente encargada del control motor del cerebelo; 2) modificaciones morfológicas en la glía de Bergmann, que son astrocitos especializados, principalmente en las fibras radiales que se extienden en el plano parasagital y en las ramificaciones laterales que son zonas enriquecidas en contactos neurona-glía ; 3) se detectaron astrocitos Alzheimer tipo II, con núcleo aumentado y morfología alargada; 4) en el número y estado de activación de la microglía, lo que sugiere el desencadenamiento de un proceso proinflamatorio.

#### 4.2. Alteraciones metabólicas y funcionales

Exploramos con especial interés la presencia de la glutamina sintetasa glial, ya que esta enzima es la forma principal de encausar el metabolismo del amonio elevado en el sistema nervioso para evitar su toxicidad. El indiscutible y claro aumento de esta enzima en la zona molecular del cerebelo de las ratas APC reafirma la hiperamonemia alcanzada en nuestro sistema experimental, pero al mismo tiempo conlleva otras implicaciones: a) desequilibrio en el metabolismo energético, ya que el amonio aumentado desplaza el balance entre el glutamato y la glutamina (en glía), pero también el balance entre el  $\alpha$ -cetoglutarato y el glutamato (en glía y neuronas), por lo que de forma neta el intermediario del ciclo de Krebs es sustraído de la mitocondria por medio de esta reacción cataplerótica; b) la pérdida de  $\alpha$ -cetoglutarato mitocondrial comentada en el punto anterior, implica otro desbalance metabólico, ya que se activa una reacción de transaminación que convierte el glutamato en  $\alpha$ -cetoglutarato, pero al hacerlo el oxaloacetato (otro intermediario del ciclo de Krebs) se transforma en aspartato; el aspartato hace reacción con acetil-CoA y forma N-acetilaspártato (NAA), metabolito que se vio incrementado en los experimentos de espectroscopía por RMN; c) la mitocondria se ve además afectada por las reacciones pro-oxidantes generadas por el amonio (Rama et al., 2005); d) a nivel bioenergético, otro

parámetro que indica un ajuste del sistema cerebelar es la elevación de Creatina+Fosfocreatina (cuantificado por espectroscopía de RMN) en las ratas APC (13 semanas) que sugiere una modificación del potencial fosforilante de las células del cerebelo.

A nivel funcional, el experimento del Rotarod dejó en evidencia que las ratas APC presentan problemas severos de función cerebelar y de coordinación motora. Este resultado también implica que: a) El déficit en capacidad de equilibrio se instala paulatinamente, ya que los animales con 3 semanas de APC desempeñan la prueba de manera adecuada, aunque de forma retardada; b) el despliegue de la conducta se pierde desde la 6ta semana después de la cirugía, lo que implica que el daño cerebelar es ya limitante para la función cerebelar desde tiempos. Nuestro grupo de trabajo ha iniciado experimentos complementarios para explorar de manera longitudinal la forma en que se van instalando las alteraciones histopatológicas y metabólicas en las ratas con la cirugía experimental.

#### 4.3. Patogenia

Los datos obtenidos indican al menos 2 procesos patogénicos activos en el daño cerebelar de las ratas APC: edema e inflamación. El edema es un desequilibrio hídrico que afecta la morfofisiología celular. El incremento tan notorio de aquaporina 4, la disminución significativa de taurina (uno de los principales osmolitos celulares) y de metabolitos derivados de colina, sugieren fuertemente la presencia de un edema citotóxico, aunque no descartamos que también pudiera instalarse un edema vasogénico. Los problemas osmóticos que se asocian al edema comprometen la compartimentalización celular y el flujo de metabolitos necesario para el buen funcionamiento de las redes metabólicas. Por otro lado, la inflamación es parte de una respuesta biológica compleja que el sistema despliega ante una situación de daño celular. En la respuesta inflamatoria es clave la participación de células inmunitarias, que en el cerebro están representadas por la microglía. Nuestros hallazgos demostraron fehacientemente que la microglía de las ratas APC estaba notoriamente reactiva en comparación a las ratas Sham, y que el marcador NLRP3 estaba incrementado. Estos datos indican que el daño esponjiforme en la capa molecular del cerebelo está acompañado de un proceso

inflamatorio activo. Como una de las etapas finales de la inflamación, es la presencia de una forma especializada de muerte celular denominada piroptosis, experimentos futuros de nuestro grupo, buscarán confirmar muerte piroptótica en las células cerebelares de las ratas APC.

## Conclusión

Aunque este trabajo no implica un beneficio económico inmediato para el Estado de Querétaro o el país, es importante reconocer que implica beneficios sociales y culturales de gran valía, en la medida en que la investigación básica de alta calidad es pilar para el desarrollo científico de nuestra sociedad. Ciertamente, México necesita una actividad científica bien sustentada, de proyección internacional y de arraigo entre las nuevas generaciones. El quehacer científico es uno de los elementos clave para que los países emergentes aspiren a ser más competitivos y tener mejores perspectivas de desarrollo social y cultural. En el caso particular del presente proyecto, hemos implementado un proyecto de gran interés en el contexto de la ciencia básica, con muchas ramificaciones todavía por explotar, y explotando un modelo que nos permite entender mejor los mecanismos celulares que se asocian a un problema grave en la población mexicana, como lo es el daño cerebral que acompaña la deficiencia hepática.

## Resumen curricular

### *Biol. Mayra Lizeth López Cervantes*

Bióloga egresada de la Universidad Autónoma de Baja California. Adscrita al laboratorio de Fisiología Celular del INB, de la UNAM. Estudia los mecanismos celulares implicados en diversos procesos fisiopatológicos.

### *Dr. Andrés Quintanar Stephano*

Departamento de Fisiología y Farmacología Universidad Autónoma de Aguascalientes Estudió la licenciatura en Medicina en la UNAM, la Maestría en Fisiología y Biofísica en el CINVESTAV y el Doctorado en Ciencias Fisiológicas en la UNAM. Estancia en la Universidad de Toronto, en Canadá. Trabaja en el Depto. de Fisiología y Farmacología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Fisiólogo, SNI II. Ha hecho

contribuciones significativas en la caracterización de las funciones no canónicas de la vasopresina.

### *Dr. Sarael Alcauter Solórzano*

Licenciado en Ciencias Físico-Matemáticas por la UMSNH. Realizó una Maestría en Física Médica en la UNAM y el Doctorado en Ciencias Biomédicas también de la UNAM. Estancia posdoctoral en la Universidad de Carolina del Norte. Investigador Titular A, SNI II, experto en estudios del desarrollo estructural y cerebral del cerebro. Adscrito al Depto. de Neurobiología Conductual y cognitiva del INB, UNAM.

### *Dr. Mauricio Díaz Muñoz*

Biólogo egresado de la Facultad de Ciencias, Maestría y Doctorado en Investigación Biomedica Básica, todos los estudios en la UNAM. Estancias posdoctorales en Baylor College y UCSD. Investigador Titular C, SNI III, experiencia en modelos fisiopatológicos del hígado. Adscrito al Depto. de Neurobiología Celular y Molecular del INB, UNAM.

## Referencias bibliográficas

- Blei, A.T., Córdoba, J. [2001]. Hepatic encephalopathy. *American Journal of Gastroenterology*, 96(7), 1968-1976.
- Butterworth, R.F. [2016]. Pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis: the concept of synergism revisited. *Metabolism and Brain Disease*, 31(6), 1211-1215.
- Chamuleau, R.A. [1996]. Animal models of hepatic encephalopathy. *Seminar in Liver Disease*, 16(3), 265-270.
- Davis, B.M., Salinas-Navarro, M., Cordeiro, M.F., Moons, L., & Groef, L.De. [2017]. Characterizing microglia activation: A spatial statistics approach to maximize information extraction. *Scientific Reports*, 7(1), 1-12.
- García-Lezana, T., Oria, M., Romero-Giménez, J., Bové, J., Vila, M., Genescà, J., ...Córdoba J. [2017]. Cerebellar neurodegeneration in a new rat model of episodic hepatic encephalopathy. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(3), 927-937.
- Guía de Práctica Clínica. Diagnóstico y Tratamiento de Encefalopatía en el Adulto. México: Instituto Mexicano del Seguro Social, 2013
- Jayakumar, A.R., Norenberg, M.D. [2018]. Hyperammonemia

- in hepatic encephalopathy. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 8(3), 272-280.
- Jindal, A., Jagdish, R.K. (2019). Sarcopenia: ammonia metabolism and hepatic encephalopathy. *Clinical and Molecular Hepatology*, 25(3), 270-279.
- Jurgens, P. (1997). New aspects of etiology, biochemistry and therapy of portal systemic encephalopathy: a critical survey. *Nutrition*, 13(6), 560-570.
- Kistler, W.M., and De Zeeuw, C.I. (2002). Dynamical working memory and timed responses: the role of reverberating loops in the olivo-cerebellar system. *Neural Computation*, 14, 2597-2626.
- Lee, S.H., Fisher, B. (1961). Portacaval shunt in the rat. *Surgery*, 50, 668-672.
- Leise, M.D., Poterucha, J.J., Kamath, P.S., Kim, W.R. (2014). Management of hepatic encephalopathy in the hospital. *Mayo Clinic Procedures*, 82(9), 241-253.
- Louis, E.D., Babij, R., Lee, M., Cortés, E. y Vonsattel, J.P.G. (2013). Quantification of cerebellar hemispheric purkinje cell linear density: 32 ET cases versus 16 controls. *Movement Disorders*, 28(13), 1854-1859.
- Malaguarnera, M., Llansola, M., Balzano, T., Gómez-Giménez, B., Antúnez-Muñoz, C., Martínez-Alarcón, N., ... Felipo V. Bicuculline reduces neuroinflammation in hippocampus and improves spatial learning and anxiety in hyperammonemic rats. Role of glutamate receptors. *Frontiers in Pharmacology*, 2019 Feb 25;10:132.
- McAllister, B.B., Lacoursiere, S.G., Sutherland, R.J., Mohajerani, M.H. (2020). Intracerebral seeding of amyloid- $\beta$  and tau pathology in mice: Factors underlying prion-like spreading and comparisons with  $\alpha$ -synuclein. *Neuroscience Behavioral Reviews*, 112, 1-27.
- Provencher S.W. (2001). Automatic quantitation of localized in vivo 1H spectra with LC model. *NMR Biomedicine*, 14, 260-264.
- Rama Rao, K.V., Jayakumar, A.R., Norenberg, M.D. (2005). Role of oxidative stresses in the ammonia-induced mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *Neurochemical International*, 47(1-2), 31-38.
- Shiotsuki, H., Yoshimi, K., Shimo, Y., Funayama, M., Takamatsu, Y., Ikeda, K., ... Hattori, N. (2010). A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *Journal of Neuroscience Methods*, 189(2), 180-185.
- Vázquez-Martínez, O., Valente-Godínez, H., Quintanar-Stephano, A., Gasca-Martínez, D., López-Cervantes, M.L., Palma-Tirado, L., ...Díaz-Muñoz, M. Reduced liver lipid peroxidation in subcellular fractions is associated with a hypometabolic state in rats with portacaval anastomosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019 Feb 21;2019:4565238.
- Zhou, Q., Zheng, H., Chen, J., Li, C., Du, Y., Xia, H., Gao, H. (2018). Metabolic fate of glucose in the brain of APP/PS1 transgenic mice at 10 months of age: a  $^{13}\text{C}$  NMR metabolomic study. *Metabolism and Brain Disease*, 33(5), 1661-1668.

