



Alteraciones de las colinesterasas en un modelo experimental de encefalopatía hepática en la rata cirrótica

Memoria presentada por Asunción Candela Gomis para aspirar al Grado de
Doctora en Medicina

Directores: Dr. D. Javier Sáez-Valero y Dr. D. Antonio F. Compañ Rosique.

Universidad Miguel Hernández de Elche.

Departamento de Patología y Cirugía

Alicante 2014

A mis padres, Ramón y Asunción, que me han dado todo.

A mi hermana Toñi y mi sobrina Valeria, con cariño.

A Rubén y Ramón, que son mi luz.

Mis más sinceros agradecimientos:

A los profesores D. Antonio Compañ Rosique y D. Javier Sáez Valero, Directores de esta Tesis Doctoral, por su apoyo y estímulo en la realización de este trabajo, y sobre todo por su amistad.

A la Dra. María Salud García Ayllón por sus enseñanzas y su amistad. A todo el personal investigador del laboratorio del Dr. Sáez.

Al director del animalario, José Antonio Pérez de Gracia, por su ayuda incondicional y a todos los miembros del personal del animalario que hicieron posible estos estudios.

A los Doctores D. Rodrigo Jover, D. Pepe Such, D. Josemi Seguí, D. Luis Company, D^a. Ana Gutiérrez y al profesor D. Miguel Pérez Mateo por su ayuda y espíritu investigador.

A los profesores D. Justo Medrano Heredia y D. Rafael Calpena Rico por su estímulo constante en la realización de esta Tesis Doctoral y por sus enseñanzas.

A los miembros del Departamento Patología y Cirugía, en especial a Noelia y Pilar.

A mis compañeros y amigos del Servicio de Cirugía General y Digestiva del Hospital Universitari Sant Joan d'Alacant por su apoyo y comprensión.

A mis compañeros y amigos del Hospital Universitari de Sant Joan d'Alacant.

A la Dra. Belen Cutillas por su ánimo y amistad y a la D^a. Mercedes Bernabeu por su ayuda en la realización de este trabajo.

A todos aquellos que hicieron posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A Rubén y mi hijo Ramón, por su paciencia, cariño y apoyo que me han permitido seguir y no darme por vencida.

INDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	23
I. INTRODUCCIÓN	29
1. Cirrosis hepática.	31
2. Encefalopatía hepática.	32
2.1 Encefalopatía hepática episódica.	33
2.2 EH persistente.....	34
2.3 EH mínima (EHM).....	34
2.4 Características neuroanatómicas.	34
2.5 Características neuroquímicas.....	36
2.6 Edema cerebral de bajo grado.....	36
3. Las colinesterasas (Butirilcolinesterasa y Acetilcolinesterasa) y su alteración en la cirrosis hepática y patologías del sistema nervioso.....	37
3.1. Formas moleculares de las colinesterasas.	40
3.2. Las colinesterasas en el sistema nervioso.	41
3.3. Las colinesterasas en la cirrosis hepática.	43
3.4. Las colinesterasas en patologías del sistema nervioso.	44
4. Modelos animales de cirrosis hepática y encefalopatía hepática.....	45
Modelos experimentales de cirrosis en la rata.	45
4.1 Modelo de ligadura del conducto biliar.....	46
4.2 Modelo de tetracloruro de carbono.....	46
4.3 Modelo de tioacetamida (TAA).....	47
4.4 Cirrosis inducida por dimetilnitrosamina (DMNA).	47
4.5 Cirrosis inducida por dieta (déficit de colina).	48

Modelos experimentales de encefalopatía hepática en la rata.	48
4.6 Modelos animales de encefalopatía hepática aguda: insuficiencia hepática aguda (Encefalopatía hepática tipo A).....	49
4.7 Modelos animales de encefalopatía hepática crónica (tipo B).....	50
4.8 Modelo experimental de encefalopatía hepática en la rata cirrótica: LCB y dieta rica en amonio.....	52
5. Descripción del estudio.....	53
6. Justificación del estudio.....	54
II. HIPÓTESIS.	56
III. OBJETIVOS	61
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.	65
4.1 Material utilizado.	67
4.2 Animales de experimentación y diseño del estudio.	71
4.3 Inducción de cirrosis hepática mediante la ligadura del conducto biliar (modelo experimental de LCB):	73
4.4 Modelo de encefalopatía hepática en la rata cirrótica (modelo experimental de LCB+DA).	78
4.5 Extracción de muestras y preparación de tejidos: sangre, hígado, líquido cefalorraquídeo y cerebro.	78
4.6 Determinaciones y metodología utilizada.	83
4.7 Análisis estadístico.	91
V. RESULTADOS.	92
5.1 Modelo animal de cirrosis (LCB).	95
5.1.1 Determinación de proteínas y perfil hepático en las muestras de sangre:.....	96
5.1.2 Actividad específica AChE y BuChE, y niveles de sus formas moleculares, en el hígado de ratas LCB y NL:	97
5.2 Modelo animal de EH crónica (modelo de LCB+DA).	102

VI. DISCUSIÓN.	111
6.1 Modelo experimental de EH en la rata cirrótica.	113
6.2 Actividades enzimáticas y formas moleculares de BuChE y AChE en hígado y plasma del modelo experimental de cirrosis en la rata mediante LCB.	120
6.3 Actividades enzimáticas y formas moleculares de BuChE y AChE en cerebro y LCR en el modelo animal de EH en la rata cirrótica.	123
VII. CONCLUSIONES	127
VIII. BIBLIOGRAFÍA	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Detoxificación del amonio en los astrocitos	35
Fig. 2 Formas moleculares de acetilcolinesterasa.	39
Fig. 3 Incisión de laparotomía media en la rata para la localización del conducto biliar principal.....	74
Fig. 4 Identificación de la primera asa de intestino delgado.	74
Fig. 5 Identificación del conducto biliar principal.....	75
Fig. 6 Ligadura del conducto biliar	75
Fig. 7 Doble ligadura del conducto biliar principal.	76
Fig. 8 Sección del conducto biliar principal.....	76
Fig. 9 Cierre de la laparotomía media(I).	77
Fig. 10 Cierre de la laparotomía media (II).....	77
Fig. 11 Extracción venosa mediante punción cardiaca.....	81
Fig. 12 Extracción venosa mediante punción a nivel de la cola de la rata.	81
Fig. 13 Localización de la cisterna magna.	82
Fig. 14 Extracción de LCR.....	82
Fig. 15 Muestra histológica de tejido hepático de las ratas con ligadura del conducto biliar.	95
Fig. 16 Niveles séricos de proteínas y perfil hepático	96
Fig. 17 La cirrosis hepática y formas G ₄ de AChE a nivel hepático.	98
Fig. 18 La cirrosis hepática y los niveles de G ₄ de AChE plasmática	100
Fig. 19 La cirrosis hepática y los niveles BuChE plasmática	101
Fig. 20 Muestra histológica de tejido hepático en el modelo de LCB+DA....	102
Fig. 21 Concentraciones plasmáticas de los mediadores de inflamación	104
Fig. 22 Alteración de enzimas colinérgicas en cerebro durante la condición cirrótica.....	106
Fig. 23 Determinación de formas moleculares de AChE cerebral en los grupos NL, LCB y LCB+DA	107
Fig. 24 Determinación de colinesterasas y sus formas moleculares en líquido cefalorraquídeo (LCR) de los grupos de NL, LCB y LCB+DA.....	109

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valores bioquímicos en plasma y niveles de amonio cerebral.	103
Tabla 2: Comparación entre modelos animales de cirrosis y EH crónica, y la EH episódica en humanos.	119

ABREVIATURAS

A₄, A₈, A₁₂	Formas asimétricas de las colinesterasas, conteniendo 4, 8 o 12 subunidades catalíticas.
acetil CoA	Acetil coenzima A.
AChE	Enzima acetilcolinesterasa (EC 3.1.1.7).
ALT	Enzima alanina aminotransferasa.
AST	Enzima aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1) antes conocida como GOT o transaminasa glutámico-oxalacética. Las aminotransferasas o transaminasas son enzimas que transfieren grupos aminos de un metabolito a otro, generalmente aminoácidos.
BuChE	Enzima butirilcolinesterasa (EC 3.1.1.8).
BCA	Método del ácido bicincónico.
BW284c51	Dibromuro de 1,5-bis-(alildimetilamoniofenil)-pentan-3-ona.
ChAT	Enzima colin-acetil-transferasa (EC 2.3.1.6).
ChE(s)	Colinesterasa(s) (AChE o BuChE).
CCl₄	Tetracloruro de carbono.
cGMP	Enzima guanosina cíclica monofosfato.
CH	Cirrosis hepática.
DA	Dieta con amonio.
dpm	Desintegraciones por minuto, unidad de medida de radioactividad.

DMNA	Dimetilnitrosamina.
DSM-IV	Manual diagnóstico y estadístico de los Trastornos mentales de la Asociación Americana de Psiquiatría.
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EEM	Error estándar de la media.
EGTA	Ácido etilenglicol-tetracético.
EH	Encefalopatía hepática.
EHM	Encefalopatía hepática mínima.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas. (del término inglés "enzyme-linked immunosorbent assay").
FA	Fosfatasa alcalina.
FNT-α	Factor de necrosis tumoral alfa.
G₁, G₂, G₄	Formas globulares de las colinesterasas conteniendo 1, 2 o 4 subunidades catalíticas.
GABA	Ácido gamma-amino butírico.
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida.
GS	Enzima glutamina sintetasa.
GGT	Enzima gamma glutamil transpeptidasa.
GOT	Enzima transaminasa glutámico-oxalacética.
GPT	Enzima transaminasa glutámico-pirúvico.

HDA	Hemorragia digestiva alta.
HRP:	del inglés horseradish peroxidase conjugate.
IL-6	Interleucina 6.
ISHEN	Sociedad internacional de encefalopatía hepática y metabolismo nitrogenado.
iso-OMPA	Tetraisopropilpirofosforamida.
IUPAC-IUBMB	Unión internacional de química pura y aplicada. Unión internacional de bioquímica y biología molecular.
KDa	Unidad de medida kilodalton.
LCB	Ligadura del conducto biliar principal.
LCB+DA	Ligadura del conducto biliar más dieta rica en amonio.
LCR	Líquido ceforraquídeo.
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NH₄⁺	Amonio.
NL	Sin ligadura del conducto biliar.
nm	Unidad de medida nanómetro.
NO	Enzima óxido nítrico sintetasa.
PBS	Tampón fosfato salino.
PC	Anastomosis porto-cava.
PRiMA	del inglés Proline-rich membrane anchor.
PRAD	Del inglés proline-rich attachment domain.
p/v	Relación peso/volumen.
S	Unidad Svedberg de coeficiente sedimentación.

sGC	Enzima guanilato ciclasa soluble.
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico.
TAA	Tioacetamida.
v/v	Relación v/v.

RESUMEN

RESUMEN

La encefalopatía hepática es una complicación frecuente en los pacientes cirróticos. Actualmente no existe un modelo animal experimental adecuado que reproduzca las alteraciones neurológicas de la encefalopatía hepática sobre una situación de cirrosis hepática previa. Por otra parte se han descrito alteraciones de las enzimas colinesterasas en situaciones de cirrosis hepática. Estos estudios se han centrado en la enzima butirilcolinesterasa, siendo la enzima acetilcolinesterasa, que se conoce relacionada con procesos cognitivos y de la conducta, poco estudiada. Nuestra hipótesis de trabajo fue que el sistema colinérgico podría estar implicado en las alteraciones neurológicas que se producen en la encefalopatía hepática de los pacientes cirróticos. Para ello nos planteamos dos objetivos: primero validar un modelo experimental animal adecuado para el estudio de la encefalopatía hepática sobre una cirrosis previa; y en segundo lugar ver si las colinesterasas se alteran en situaciones de enfermedad hepática y cerebral. Se diseñaron tres grupos de estudio: un grupo control, un grupo de cirrosis y un grupo de encefalopatía hepática en la rata cirrótica. El modelo animal de encefalopatía hepática (modelo de ligadura del conducto biliar más dieta rica en amonio) se validó a nivel histológico (reproducción de cirrosis hepática) y bioquímico (reproducción de las alteraciones del metabolismo del amonio y mediadores inflamatorios en situación de encefalopatía hepática). Los resultados fueron que los animales desarrollaron cirrosis a las tres semanas de la ligadura del conducto biliar, y solo el grupo de ligadura del conducto biliar más dieta con amonio mostró niveles elevados de amonio a nivel cerebral. La actividad de la enzima acetilcolinesterasa disminuyó en el hígado cirrótico un 50% respecto al grupo control, produciéndose una disminución selectiva de la forma molecular tetramérica o G₄. En el plasma de los animales con ligadura del conducto biliar la actividad de la acetilcolinesterasa disminuyó un 45% respecto al grupo control. Los niveles de la

enzima butirilcolinesterasa permanecieron sin cambios significativos. A nivel cerebral se determinó un aumento de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en un 20% respecto al grupo control, en concreto de la forma molecular G₄, siendo este aumento independiente de los niveles elevados de amonio. Este aumento de la actividad acetilcolinesterasa fue paralelo a una disminución del 50-60% en los niveles de acetilcolina cerebral. En el líquido cefalorraquídeo, se determinó una disminución de las formas G₄ de acetilcolinesterasa en el grupo de ligadura del conducto biliar, mimetizando los cambios observados en el plasma, y no los del cerebro. En conclusión el modelo animal de ligadura del conducto biliar más dieta con amonio es un modelo experimental adecuado para el estudio de la encefalopatía hepática en la cirrosis. Así mismo podría ser útil en el estudio de cómo los mediadores de la inflamación pueden inducir efectos sinérgicos con toxinas, como el amonio, en la patogénesis de la EH.

Este modelo animal nos ha resultado de utilidad para determinar la afectación del sistema colinérgico cerebral, con alteración en los niveles de acetilcolinesterasa también en el hígado como en el plasma. Estas alteraciones no muestran relación con los niveles de amonio elevados a nivel cerebral, y sí con la existencia de cirrosis hepática. Estos hallazgos en el sistema colinérgico podrían tener un papel importante en la patogénesis de la encefalopatía hepática, pudiendo ser útiles tanto como marcadores de cirrosis, como en el desarrollo de dianas terapéuticas para el control de los síntomas neurológicos de la encefalopatía hepática episódica.

DESCRIPTORES: cirrosis, encefalopatía hepática, acetilcolinesterasa, modelos animales.

ABSTRACT

Hepatic encephalopathy is a severe neuropsychiatric complication in both acute and chronic liver failure. Studies of the pathogenesis of hepatic encephalopathy are hampered by the lack of a satisfactory animal model. The mammalian liver is rich in cholinesterases, enzymes that catalyze the hydrolysis of choline esters. The two main cholinesterases, acetylcholinesterase, which terminates the action of acetylcholine post-synaptically, and butyrylcholinesterase, with no clear physiological function, differ in their substrate specificities and inhibition by selective inhibitors. In humans, reduced serum butyrylcholinesterase activity has been linked to chronic liver diseases, including cirrhosis. However, since the level of acetylcholinesterase in human serum is much lower than the level of butyrylcholinesterase, the main cholinergic enzyme, acetylcholinesterase, had not received much attention. The cholinergic system, and specifically the neurotransmitter acetylcholine, is involved in specific behavioral responses and cognitive processes in both healthy subjects and those with neurological dysfunction. We examined the potential alterations of cholinesterases in the plasma, liver and brain levels in animal model with liver failure. Three groups were studied: sham, bile duct ligation and bile duct ligation fed a hyperammonemic diet. This group rats were made hyperammonemic with an ammonia-containing diet that began in the 14 day after operation. Results were that bile duct ligation plus hyperammonemic diet show cirrhosis three weeks after the surgery. This animal model produces impairment in the cholinergic system in liver, plasma and cerebral cortex. Acetylcholinesterase levels decrease in liver 50% compared with sham-operated. A selective loss of tetrameric (G₄) acetylcholinesterase was detected in rats with bile duct ligation. Plasma from rats with bile duct ligation had approximately 45% lower activity than controls, displaying decreased G₄ levels. Intriguingly, acetylcholinesterase activity in brain cortical extracts of bile duct ligated rats was increased 20%

compared to controls. A selective increased of tetrameric acetylcholinesterase was detected. Increased acetylcholinesterase in cirrhotic rats leads to a pronounced decrease (50-60%) in the levels of acetylcholine. The decrease of serum G₄ levels in bile duct ligated rats was correlates with a decrease of the tetrameric species in the cerebrospinal fluid. In conclusion bile duct ligation plus hyperammonemic diet in rats is an animal model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. This animal model replicates affectation in liver and plasma cholinesterases, but in acetylcholinesterase and not in butyrylcholinesterase. Our data also indicates a brain cholinergic imbalance as a consequence of liver failure, and points to the possible role of the cholinergic system in the pathogenesis of hepatic encephalopathy.

DESCRIPTORS: cirrhosis, hepatic encephalopathy, acetilcholinesterase, animal models.

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN.

1. Cirrosis hepática.

La cirrosis hepática (CH) es una enfermedad crónica del hígado, difusa e irreversible caracterizada por necrosis, fibrosis y nódulos de regeneración. Es más frecuente en varones y las dos causas más comunes en nuestro entorno son el alcohol y los virus hepatotropos (hepatitis B y C). Suele diagnosticarse entre los 40-60 años, aunque puede manifestarse a cualquier edad.

Los síntomas clínicos de la cirrosis hepática son muy variables y pueden manifestarse como astenia, hepatomegalia, ascitis, alteraciones cutáneas, siendo las complicaciones más importantes la hemorragia digestiva, la peritonitis bacteriana espontánea o encefalopatía hepática (EH).

La EH es una de las complicaciones más frecuentes del paciente cirrótico. La existencia de una EH en un paciente cirrótico conlleva importantes connotaciones pronósticas ya que los casos de encefalopatía sin un factor desencadenante se asocian a una supervivencia del 50% a los seis meses.

La etiopatogenia de la EH no está del todo aclarada, aunque la hipótesis más aceptada contempla un origen multifactorial. Así, se consideran los diferentes mecanismos etiopatogénicos como no excluyentes (véase amonio, alteración de neurotransmisores cerebrales, alteraciones funcionales de los astrocitos; para una revisión consultar Felipo y Buttterworth, 2002).

2. Encefalopatía hepática.

La EH se define como un conjunto de manifestaciones neuropsiquiátricas objetivadas en pacientes con disfunción hepática o en presencia de comunicaciones portosistémicas, una vez excluidas otras causas de afectación cerebral. Se considera que el principal mecanismo fisiopatológico es la derivación de sangre portosistémica, que expone al sistema nervioso central (SNC) a sustancias que no han sido depuradas por el hígado.

Las principales sustancias que se relacionan con el desarrollo de EH son el amoníaco, sustancias que funcionan como “falsos” neurotransmisores (octopamina, feniletanolamina), el ácido gamma-amino butírico (GABA), diversos ácidos grasos de cadena corta, mercaptanos, neuroesteroides, el manganeso y las benzodiazepinas naturales. Se considera además íntimamente ligada al desarrollo de la EH la alteración de la función de los astrocitos, células de la glía que rodean las sinapsis. Mediado por esta disfunción astrocitaria, se produciría la alteración neuronal y funcionalmente la afectación en la neurotransmisión, responsable final de las manifestaciones clínicas. Existen todavía importantes limitaciones en la comprensión de los mecanismos que desencadenan esta complicación de la cirrosis.

La EH puede aparecer en pacientes con fallo hepático fulminante, con cirrosis hepática o con comunicaciones portosistémicas y función hepática conservada. Es por ello que se clasifica en tres tipos según la patología de base sobre la que se desarrolla (Ferenci *et al.*, 2002):

Tipo A: en pacientes con insuficiencia hepática aguda grave.

Tipo B: en pacientes con comunicaciones portosistémicas sin daño hepatocelular intrínseco.

Tipo C: en pacientes con cirrosis más hipertensión portal o comunicaciones portosistémicas. A su vez ésta se divide en tres subcategorías:

C.1) EH episódica.

C.2) EH persistente.

C.3) EH mínima.

2.1 Encefalopatía hepática episódica.

En la cuarta edición del Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales de la Asociación Americana de Psiquiatría (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM-IV) se corresponde con un Delirio secundario a una Condición Médica General (código 293.0). El Delirio se define como una alteración en la consciencia que se acompaña por un cambio en la cognición que no se puede explicar por una demencia preexistente o en desarrollo, que se produce durante un periodo corto de tiempo y con una gravedad fluctuante. Se subclasifica en:

2.1.1) Precipitada: si se reconoce la causa que la provoca.

2.1.2) Espontánea: si no se reconoce. Antes de utilizar este término se deben excluir factores precipitantes como la hemorragia digestiva alta (HDA), uremia, uso de medicación psiquiátrica o de diuréticos, transgresiones dietéticas, infecciones, estreñimiento, deshidratación, hiponatremia e hiper o hipopotasemia.

2.1.3) Recurrente: si ocurren dos episodios en un año.

2.2 EH persistente.

Engloba el concepto de degeneración hepatocerebral adquirida, y que incluye los defectos cognitivos que impactan negativamente en el rol social o laboral y que se subdivide según afecte a la autonomía del paciente y la dependencia del tratamiento en:

2.2.1) Leve (EH grado 1).

2.2.2) Grave (EH grado 2-4).

2.2.3) Dependiente de tratamiento.

2.3 EH mínima (EHM).

En los pacientes con cirrosis hepática compensada se ha constatado un cierto grado de deterioro cognitivo que se conoce como encefalopatía mínima o subclínica, y que supone un importante deterioro en la calidad de vida de estos pacientes.

En el estudio de la etiopatogenia de la EH en la cirrosis hepática, se han objetivado una serie de hallazgos característicos a nivel neuroanatómico y neuroquímico además de la existencia de edema cerebral de bajo grado.

2.4 Características neuroanatómicas.

Los astrocitos son las células cerebrales encargadas de eliminar el amonio que se metaboliza por acción de la glutamina sintetasa (GS), una enzima cuya localización en el cerebro se ciñe casi exclusivamente a este tipo celular. Como

resultado de la acción de la GS, convirtiendo el glutamato en glutamina, las neuronas resultan protegidas de la toxicidad del amonio (**Fig. 1**)

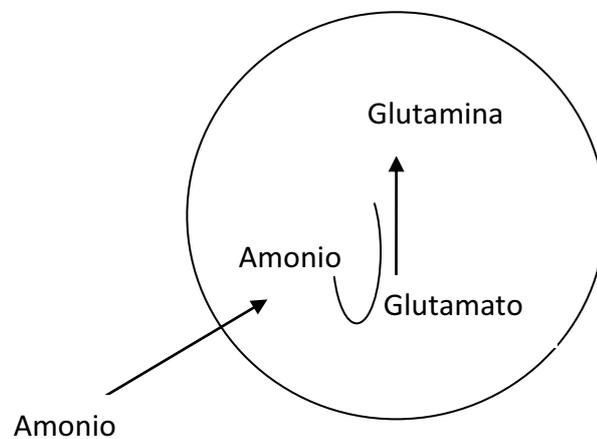


Fig. 1 Detoxificación del amonio en los astrocitos (Jover *et al.*, 2005).

Los astrocitos son células particularmente afectadas en la EH, presentando cambios morfológicos más significativos que los de neuronas u otras células del SNC (Norenberg, 1987; 1996). En la EH de los pacientes cirróticos el tipo de astrocitos dominante son los llamados de tipo II de Alzheimer, existiendo una correlación positiva entre la severidad de la EH y el grado de astrocitosis de Alzheimer tipo II. Así, histopatológicamente el estudio de secciones de cerebro de pacientes cirróticos que fallecieron por coma hepático muestran astrocitos patológicos de Alzheimer tipo II, caracterizados por edema en el citoplasma, con un núcleo pálido y un nucleolo prominente (Hazell y Butterworth, 1999). Estos cambios neuropatológicos de los astrocitos están relacionados con alteraciones en proteínas estructurales. Por ejemplo, en la enfermedad hepática crónica se ha caracterizado disminución de la expresión de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (Butterworth, 2001; Sobel *et al.*, 1981). La GFAP es una proteína del citoesqueleto de los astrocitos y que constituye la mayor parte de los filamentos intermedios en los astrocitos diferenciados del SNC (Eng *et al.*, 2000). La

expresión de GFAP también está íntimamente relacionada con la regulación del volumen celular y la pérdida de dicha proteína podría explicar un aumento de las propiedades viscoelásticas de la célula que favorecerían el citado aumento de volumen celular (Kalman y Hajos, 1989).

2.5 Características neuroquímicas.

Aunque se sospecha de los efectos de la hiperamonemia alterando distintos mecanismos asociados a la neurotransmisión, hasta la fecha la alteración de la neurotransmisión glutamatérgica es la única suficientemente caracterizada (Felipo y Butterworth, 2002; Michalak *et al.*, 1997). La activación de los receptores de glutamato produce un aumento del calcio intracelular el cual activa la enzima óxido nítrico sintetasa (NO), aumentando la producción de óxido nítrico, el cual a su vez activa la enzima guanilato ciclasa soluble (sGC), resultando en un aumento de guanosina cíclica monofosfato (cGMP). Este mecanismo patogénico del glutamato-óxido nítrico-cGMP modula importantes procesos cerebrales como la comunicación intercelular, los ritmos circadianos (sueño-vigilia) y algunas formas de aprendizaje y memoria (Hawkins, 1996; Corbalan *et al.*, 2002).

2.6 Edema cerebral de bajo grado.

Como ya se ha comentado, a nivel cerebral, el amonio es detoxificado en los astrocitos mediante la enzima GS. Esta enzima transforma el glutamato en glutamina, que es una sustancia osmótica. En la insuficiencia hepática aguda, hay un rápido aumento de amonio cerebral con aumento súbito de la glutamina cerebral y del volumen de los astrocitos, resultando en edema cerebral. Este

rápido edema cerebral provoca hipertensión intracraneal siendo una importante causa de muerte en estos pacientes.

Sin embargo en la EH que se produce asociada a la cirrosis hepática existen mecanismos compensatorios para evitar el edema cerebral con hipertensión intracraneal. El principal mecanismo de compensación es la disminución de sustancias osmóticamente activas como el mioinositol. En un modelo experimental de EH con anastomosis portocava en la rata se ha estudiado el aumento de glutamina y la disminución de mioinositol, además de otras sustancias osmóticas (Cordoba *et al.*, 1996).

3. Las colinesterasas (Butirilcolinesterasa y Acetilcolinesterasa) y su alteración en la cirrosis hepática y patologías del sistema nervioso.

El hígado de los mamíferos es rico en colinesterasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de los ésteres de colina. Las dos colinesterasas más importantes son la acetilcolinesterasa [AChE; según la IUPAC-IUBMB (International Union of Pure and Applied Chemistry- International Union of Biochemistry and Molecular Biology): EC 3.1.1.7] y la butirilcolinesterasa (BuChE; EC 3.1.1.8). Ambas colinesterasas presentan un porcentaje alto de homología a nivel de su secuencia primaria en aminoácidos, y se diferencian entre sí por su preferencia a sustratos y su sensibilidad a inhibidores.

El gen de la AChE reside en el hombre en la región génica 7q22 (Ehrlich *et al.*, 1992; Getman *et al.*, 1992), y se ha descrito un rico procesamiento alternativo, o “splicing”. Los distintos transcritos de AChE a su vez sufren modificaciones post-traduccionales generando un rico polimorfismo con formas

moleculares de AChE que van desde subunidades catalíticas monoméricas a complejos de subunidades catalíticas y no catalíticas (**Fig. 2**; para una revisión ver Massoulié, 2002).

Este amplio polimorfismo está finamente regulado a nivel celular y depende del estadio del desarrollo y estado patológico. Detrás de este rico polimorfismo se presupone la existencia de diversas funciones biológicas para la AChE y existen evidencias que apuntan a ello (Massoulié *et al.*, 1993; Small *et al.*, 1996; Soreq y Seidman, 2001). No obstante, la función biológica más conocida y mejor caracterizada de la AChE es la inactivación rápida del neurotransmisor acetilcolina después de su liberación en las sinapsis colinérgicas (Katz, 1966; Nachmansohn y Neumann, 1975) proporcionando el control temporal preciso para la transmisión sináptica. La enzima AChE se ha descrito como ubicua y en mayor o menor medida es identificable en prácticamente todos los tejidos de mamíferos, siendo particularmente abundante en tejido nervioso y unión neuromuscular, pero también en eritrocitos, timo y placenta.

En lo que respecta a la BuChE, cuyo gen ha sido identificado en humano en la región génica 3q26 (Arpagaus *et al.*, 1990; Gaughan *et al.*, 1991; Allderice *et al.*, 1991), su función biológica se desconoce (Chatonnet y Lockridge, 1989).

Al igual que la AChE, la BuChE es ubicua y se ha descrito en prácticamente todos los tejidos excepto eritrocito. Aunque la BuChE no presenta procesamiento alternativo a nivel de transcritos, sí que comparte con AChE la posibilidad de formas complejas moleculares. La BuChE en humanos es especialmente abundante en plasma, cuyo origen probable sería el hígado, se presupone que participa en procesos de detoxificación y quizás en el metabolismo de lípidos (Chatonnet y Lockridge, 1989; Massoulié *et al.*, 1993).

3.1. Formas moleculares de las colinesterasas.

Tal cual se ha introducido, las colinesterasas son enzimas altamente polimórficas, presentándose como monómeros u oligómeros de subunidades catalíticas. Tanto para las distintas moléculas de AChE como para la BuChE es preferible el término “forma molecular” al de “isoenzima”, ya que dichas especies de colinesterasas proceden de diferentes estadios del procesamiento de una misma estructura original compleja. Además de diferir en su estructura cuaternaria, son diferentes en cuanto a su solubilidad, interacciones iónicas o hidrofóbicas, parámetros hidrodinámicos y dotación de carbohidratos.

Tanto el transcrito T (del término inglés “tail”) de AChE, como el único transcrito para BuChE, son susceptibles de procesamiento postraduccional que llega a generar hasta seis diferentes tipos estructurales de asociación cuaternaria. La clasificación tradicional, acuñada por el profesor Massoulié (Bon *et al.*, 1979), distingue entre formas globulares (G) y formas asimétricas (A). Las formas G pueden ser monómeros, dímeros y tetrámeros (G1, G2 y G4) de una subunidad catalítica de unos 75 KDa, mientras que las formas A se presentan como uno, dos o tres tetrámeros (A4, A8 y A12) asociados a una subunidad estructural o tallo, de unos 500nm, de naturaleza similar al colágeno. En eritrocitos, donde sólo se expresa AChE, esta es producto del transcrito llamado H (del inglés “hydrophobic”) que genera formas G1 y G2 ancladas a membrana por un glucosilfosfatidilinositol. También se han identificado para AChE formas G1 solubles producto de un tercer transcrito denominado R (de “readthrough”). Estas especies son también ubicuas, como las T, pero mucho más minoritarias, aunque aparecen aumentadas en distintas situaciones de estrés fisiológico (Soreq y Seidman, 2001).

Como se ha comentado el patrón de formas moleculares es característico del tejido en cuestión, incluso del tipo celular, estando muy finamente regulada su expresión. Hasta la fecha, en el suero de mamíferos las únicas formas

detectables de colinesterasas son las globulares, siendo particularmente abundante la AChE o la BuChE dependiendo de la especie (Skau, 1985; Chatonnet y Lockridge, 1989). Así, en el plasma humano, la cantidad de BuChE excede con mucho la de AChE (García-Ayllón *et al.*, 2010), mientras que en el plasma de la rata y ratón los niveles de ambas colinesterasas son más parejos (García-Ayllón *et al.*, 1999; 2006). Respecto al hígado, existen menos publicaciones, particularmente para humano, aunque de estudios en diferentes roedores se deduce que las formas moleculares tanto de AChE como de BuChE son también globulares (Perelman *et al.*, 1990; Jbilo *et al.*, 1994; Gómez *et al.*, 2000).

3.2. Las colinesterasas en el sistema nervioso.

Respecto al sistema nervioso y su abundancia en colinesterasas, ya en 1938 se consiguieron las primeras evidencias sobre las implicaciones colinérgicas existentes en el sistema nervioso central (SNC) al comprobarse el efecto de la acetilcolina en el cerebro (Dikshit, 1934). Los estudios sobre las vías colinérgicas en cerebro han revelado la presencia de una intensa inervación colinérgica en el cerebro anterior (Lewis y Shute, 1966; 1967). Las fibras colinérgicas constituyen una red ascendente desde las células del cerebro medio, que son idénticas a las del sistema reticular activador, hasta las células colinoceptivas en el estriatum y córtex cerebral, de tal forma que en esta última región se localizan más de la mitad de las terminales colinérgicas del cerebro anterior (Silver, 1967). En el SNC predominan las formas G, al igual que en el sistema nervioso periférico (SNP). En cerebro de mamífero la gran mayoría de la AChE (80-90%) corresponde a moléculas G4 y el resto es principalmente G1 (Grassi *et al.*, 1982), aunque según el área cerebral investigada estas proporciones pueden variar (Atack *et al.*, 1986). El componente principal de la AChE del cerebro de los mamíferos, y del hombre en concreto, es una forma G4 anfifílica que requiere detergentes para su solubilización (Sáez-Valero *et al.*, 1993), se localiza en la membrana plasmática,

anclada en la misma mediante una proteína integral de membrana de tipo I conocida como PRiMA (del inglés, *proline-rich membrane anchor*), y correspondería a la enzima que lleva a cabo la acción de hidrolizar al neurotransmisor. La BuChE presente en el SNC del hombre se corresponde también con formas G4 y en menor medida G1 (Sáez-Valero *et al.*, 1993).

En el líquido cefalorraquídeo (LCR) humano predominan las formas G4 hidrofílicas de AChE y BuChE (Tornel *et al.*, 1992) y la actividad AChE aumenta con la edad (Tornel y Vidal, 1991).

El rico polimorfismo presente en colinesterasas no representa una ventaja cinética, ya que en todos los casos las subunidades catalíticas presentan parámetros cinéticos muy semejantes. Por el contrario, esta riqueza en especies de una misma proteína podría tener un fin estructural, porque de este modo se conseguiría la asociación y localización de la enzima en un sitio funcional de un modo muy eficiente y/o secreción, reflejando a su vez la variedad de funciones no relacionadas con la transmisión sináptica.

Dado que cambios en el patrón de formas moleculares podrían reflejar alteraciones patológicas y funcionales, su estudio ha sido extenso. En los últimos años se ha alcanzado un mayor refinamiento de este estudio de formas moleculares de colinesterasas a través de su combinación con el análisis de glicosilación. A pesar de que todas las formas moleculares de colinesterasas están glicosiladas, el patrón de glicosilación es ligeramente diferente entre ellas en un mismo tipo celular (la glicosilación dirige el procesamiento final de las glicoproteínas), y en diferentes tipos celulares (con diferencias en sus maquinarias de glicosilación) las colinesterasas se glicosilan de manera distinta. De este modo, se han encontrado diferencias entre los restos oligosacáridicos de diferentes formas moleculares e incluso entre isoformas homólogas, para distintos tejidos de un animal, e incluso en el mismo tejido, por lo que la glicosilación es una fuente adicional de polimorfismo con potencialidad

diagnóstica (para una amplia revisión ver Vidal, 1996). Además, hay que recordar que el correcto funcionamiento de la glicosilación determinará un adecuado tráfico intracelular, plegamiento, ensamblaje y localización final y funcional de las glicoproteínas, por lo que su alteración puede tener importantes implicaciones patológicas.

3.3. Las colinesterasas en la cirrosis hepática.

Se han descrito alteraciones en los niveles plasmáticos de la llamada colinesterasa plasmática o BuChE en pacientes cirróticos y otras disfunciones hepáticas (Brown *et al.*, 1981). La AChE, como parte del sistema colinérgico, es una enzima potencialmente asociada a demencia (ver García-Ayllón *et al.*, 2011), aunque hasta la fecha se desconoce si su expresión se altera en el curso de la EH.

Es lógico presumir que dada la probable procedencia hepática de las colinesterasas plasmáticas, y en particular de la BuChE, sus niveles se vean afectados en problemas de malfuncionamiento hepático. Dicha alteración, al igual que ocurre asociado a otras patologías, podría cursar con alteraciones específicas en sus formas moleculares que podrían permitir caracterizar y afinar diagnósticamente.

Mientras que la gran mayoría de autores consideran que el hígado es la fuente de la BuChE del plasma, no existe total acuerdo sobre el origen de la AChE plasmática que en parte puede provenir del hígado, aunque no se descarta que también proceda de otros órganos periféricos, del encéfalo (LCR) y/o del endotelio vascular. Hasta la fecha, los estudios de la actividad colinesterasa en situaciones de enfermedad hepática se han centrado en la BuChE, mientras que la AChE ha sido relegada a un segundo plano.

3.4. Las colinesterasas en patologías del sistema nervioso.

Alteraciones en el sistema colinérgico, y particularmente en la enzima AChE, se han asociado a los problemas cognitivos en enfermedad de Alzheimer y otros desórdenes neurológicos como el Parkinson, o el síndrome de Down (Massoulié *et al.*, 1993; Small *et al.*, 1996). En la enfermedad de Alzheimer tanto la actividad AChE como la proporción de formas moleculares del cerebro quedan afectadas con una disminución selectiva de las especies colinérgicas de la enzima, las formas G4, lo que se ha caracterizado por alteraciones en la relación de formas o cociente G4/G1, en distintas áreas del cerebro (Atack *et al.*, 1983; Younkin *et al.*, 1986; Fishman *et al.*, 1986; Arendt *et al.*, 1992; Sáez-Valero *et al.*, 1999). A pesar de esta variación en los niveles de AChE, en el LCR la magnitud del cambio, tanto en actividad como en el cociente G4/G1, no resulta de suficiente magnitud para su uso diagnóstico (Sáez-Valero *et al.*, 1999; 2000). Otras aproximaciones como alteraciones en la glicosilación de formas moleculares de AChE, particularmente asociadas al β -amiloide, puedan contribuir a precisar el diagnóstico (Sáez-Valero *et al.*, 1997; Sberna *et al.*, 1998). De cualquier modo el consenso en el campo es que el detrimento en formas colinérgicas de la AChE cursa en paralelo al progreso de la patología. De hecho, la enzima AChE es objeto de las terapias paliativas que actualmente se emplean en el Alzheimer, con distintos fármacos inhibidores de AChE como la tacrina, el donezepilo, la galantita y la rivastigmina, cuyo empleo pretende enlentecer el deterioro cognitivo asociado a la disminución en los niveles de acetilcolina (Lleó *et al.*, 2006; Muñoz-Torrero, 2008).

De este modo, no es descartable que alteraciones en el contenido de la AChE cerebral puedan contribuir de algún modo en las alteraciones cognitivas detectadas en otros procesos que cursan con demencia como el derivado de la cirrosis hepática, es decir, la encefalopatía hepática.

4. Modelos animales de cirrosis hepática y encefalopatía hepática.

Los modelos animales experimentales son importantes para el estudio de la fisiopatología de las enfermedades hepáticas y sus complicaciones. Para la elección del modelo animal en el estudio de la CH y EH se deben tener en cuenta diferentes factores. Unos generales de aplicación a cualquier modelo animal y otros específicos dependiendo de los aspectos fisiopatológicos que se quieran estudiar. Los modelos animales que se describen a continuación son los más frecuentemente utilizados para el estudio de la cirrosis y la EH. Se basan principalmente en tres mecanismos fisiopatológicos: fallo hepático, derivación de la circulación del sistema venoso portal y alteraciones metabólicas.

Modelos experimentales de cirrosis en la rata.

Los más utilizados son los siguientes (para una revisión ver Abraldes *et al.*, 2006):

4.1 Modelo de ligadura del conducto biliar.

4.2 Modelo de tetracloruro de carbono.

4.3 Modelo de tioacetamida (TAA).

4.4 Modelo de dimetilnitrosamina (DMNA).

4.5 Modelo de cirrosis inducida por dieta (déficit de colina).

4.1 Modelo de ligadura del conducto biliar.

La ligadura y sección del conducto biliar principal (LCB) produce cirrosis biliar en la rata en 3-4 semanas. Los animales desarrollan ictericia, hipertensión portal (Kountouras *et al.*, 1984), *shunt* portocava (Dunn *et al.*, 1991), ascitis, translocación bacteriana, y alteración del sistema inmune (Greve *et al.*, 1990; Roughneen *et al.*, 1986). Aunque los niveles de amonio pueden estar elevados no alcanzan los documentados en la EH (Huang *et al.*, 2004; Rodrigo *et al.*, 2005; Weisdorf *et al.*, 1990), aunque los animales sí presentan disminución de la actividad motora (Chan *et al.*, 2004) y déficit de memoria espacial (Huang *et al.*, 2004).

4.2 Modelo de tetracloruro de carbono.

Se utiliza una sustancia hepatotóxica que es el tetracloruro de carbono (CCl₄). La acción del tóxico sobre el hepatocito se produce a dos niveles: una acción inicial y directa dañando la membrana celular y una segunda fase debida a la toxicidad inducida por los metabolitos del tetracloruro de carbono generados por el citocromo P450. Este compuesto induce una cirrosis micronodular irreversible tras aproximadamente 12-15 semanas de inicio del tratamiento, hipertensión portal, *shunt* portosistémico (30-60%) e infecciones (peritonitis bacteriana espontánea). Si se mantiene durante más tiempo el tratamiento con CCl₄ (14-20 semanas), la mayoría de las ratas acaba desarrollando ascitis (Jiménez *et al.*, 1992; Jiménez, 1988; Kamada *et al.*, 2003; Hernández- Muñoz *et al.*, 2001).

La principal limitación de este modelo es que no se ha evidenciado ninguno de los criterios de EH (edema cerebral, alteración de los osmolitos cerebrales, existencia de astrocitos de Alzheimer tipo II) por lo que no se utiliza para estudiar esta patología.

4.3 Modelo de tioacetamida (TAA).

En este modelo se desarrolla cirrosis micro y macronodular en aproximadamente 12 semanas. Presenta una problemática semejante al modelo de cirrosis por CCl₄, es decir, diferente sensibilidad de las ratas a la dosis del compuesto tóxico y la heterogeneidad del grado de cirrosis. Algunos autores (Li *et al.*, 2002) han propuesto un esquema de administración, en el que la dosis administrada se matiza cada semana de acuerdo con la pérdida/ganancia de peso del animal. Esta modificación evita, de forma completa, la mortalidad durante la inducción de cirrosis, con una supervivencia del 90% a las 12 semanas. Las ratas desarrollan hipertensión portal, signos de circulación hiperdinámica y un 40% desarrolla ascitis.

4.4 Cirrosis inducida por dimetilnitrosamina (DMNA).

La DMNA es otro tóxico que causa necrosis hepatocitaria y que tras su administración continuada causa fibrosis a partir de la cuarta semana. A las 5 semanas, las ratas muestran hipertensión portal y *shunt* portosistémico. Sin embargo, la cirrosis franca con ascitis no se desarrolla hasta las 13 semanas. En diversos estudios se ha utilizado este modelo a 5 semanas tras el inicio de la administración de DMNA. En ese momento los animales no presentan cirrosis ni circulación hiperdinámica. La administración del tóxico es generalmente intraperitoneal. Es un modelo con limitaciones debido al uso de DMNA por su alta carcinogenicidad (Jenkins *et al.*, 1985).

4.5 Cirrosis inducida por dieta (déficit de colina).

La administración a ratas y ratones de una dieta deficiente en colina y metionina, o de una dieta baja en proteínas y colina y ricas en grasa, origina esteatosis hepática asociada a un marcado aumento del estrés oxidativo que origina inflamación y fibrosis. Con estos modelos se obtiene cirrosis de forma muy variable entre las semanas 12 y 24 (Tsukamoto *et al.*, 1990).

Modelos experimentales de encefalopatía hepática en la rata.

Distinguimos tres tipos de EH según la clasificación de Ferenci *et al.*, 2002:

- Tipo A: en pacientes con insuficiencia hepática aguda grave.
- Tipo B: en pacientes con comunicaciones portosistémicas sin daño hepatocelular intrínseco.
- Tipo C: en pacientes con cirrosis más hipertensión portal o comunicaciones portosistémicas.

Los modelos animales en la EH tipo A (insuficiencia hepática aguda) se han desarrollado en base dos mecanismos patogénicos. La exclusión del hígado de la circulación sistémica (modelos anhepáticos) y la administración de sustancias hepatotóxicas. El objetivo fundamental en este tipo de modelo animal experimental es la producción de una insuficiencia hepática aguda grave (EH asociada a fallo hepático agudo derivado de enfermedad hepática inflamatoria y/o necrótica de instauración rápida).

Los criterios del modelo animal experimental que reproduce este tipo de encefalopatía son: reproducibilidad clínica de los diversos grados de EH, progresión de los síntomas que incluyan edema cerebral y sus complicaciones (hipertensión intracraneal, herniación cerebral), potencial de reversibilidad,

hiperamonemia y aumento cerebral de amonio y glutamina, reproducibilidad de la patología hepática y cerebral, mínimo riesgo de infecciones o tóxicos para el personal que trabaja en estos modelos.

Respecto a los modelos animales de EH crónica (tipo B y C) existen controversias según la bibliografía consultada ya que no se ha encontrado un modelo animal adecuado que reproduzca las alteraciones clínicas que se objetivan en los humanos.

4.6 Modelos animales de encefalopatía hepática aguda: insuficiencia hepática aguda (Encefalopatía hepática tipo A).

4.6.1 Modelos anhepáticos:

- Devascularización hepática (ligadura de la arteria hepática). (Traber *et al.*, 1989)
- Hepatectomía (en dos tiempos), (Potvin *et al.*, 1984).

4.6.2 Modelos hepatotóxicos:

-Galactosamina: Se ha demostrado que a las 48 horas de la administración intraperitoneal (1,5 g/kg) de D-galactosamina se evidencian cambios histopatológicos a nivel hepático parecidos a los producidos en humanos en las hepatitis víricas agudas. Estos cambios desaparecen a las cuatro semanas de la administración de D-galactosamina; en ese momento ya no se observan cambios histológicos respecto a las ratas control (Mullen *et al.*, 1988; Dixit y Chang, 1990).

-Acetaminofen: en modelo en la rata de administración masiva de este fármaco analgésico se puede producir un grado variable de EH y edema cerebral (Francavilla *et al.*, 1989).

-Tioacetamida: Este compuesto organo-sulfuroso puede producir necrosis hepatocelular e infiltrado linfocitario sin colestasis. El modelo de tioacetamida se ha utilizado para el estudio de la neuromodulación de los astrocitos en relación con el grado de EH (Zimmerman *et al.*, 1989). La tioacetamida (350mg/Kg) en inyección intraperitoneal durante tres días consecutivos produce una alteración en el comportamiento de las ratas (disminución de la actividad motora respecto al grupo control).

Las recomendaciones de la ISHEN (Internacional Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism) acerca del desarrollo de modelos animales experimentales para el estudio de EH, dicen que para la caracterización de la EH tipo A los modelos más apropiados son el modelo de devascularización hepática y la hepatotoxicidad inducida por tioacetamida (Butterworth *et al.*, 2009).

4.7 Modelos animales de encefalopatía hepática crónica (tipo B).

4.7.1 Anastomosis portocava.

La anastomosis portocava (PC) en la rata es el modelo animal más utilizado para el estudio de la EH crónica tipo B (*shunt* portocava sin daño hepatocelular intrínseco). La base de este modelo es la creación de una anastomosis portocava terminolateral que reproduce la circulación colateral que se produce en la cirrosis hepática, pero sin daño hepatocelular. La literatura científica muestra una amplia variabilidad según estudios (Chamuleau, 1996); por ejemplo la

dependencia del género descrita en algunos artículos, solo las ratas macho muestran una disminución significativa en la actividad motora espontánea después del *shunt* PC (Conjeevaram *et al.*, 1994) pero no es corroborada en otros (Steindl *et al.*, 1995). Parte de estas diferencias se pueden atribuir a diferencias en los gradientes de presión portocava por diferentes técnicas quirúrgicas o falta de personal con experiencia en el modelo animal (Coy *et al.*, 1991). El tejido cerebral en este modelo no muestra astrocitos de Alzheimer tipo II y no hay aumento del contenido cerebral de agua (Pilbeam *et al.*, 1983). Sí desarrolla hiperamonemia y aumento cerebral de amonio y glutamina, alteraciones del ritmo circadiano y del ciclo sueño-vigilia, hipoquinesia, disminución de la memoria y de la capacidad de aprendizaje, alteración de los reflejos y atrofia testicular.

4.7.2 Modelo de hiperamonemia.

Este modelo consiste en la inducción de hiperamonemia sin daño hepático ni *shunt* portocava. Los animales son alimentados con suplementos de acetato de amonio en la dieta (Azorin *et al.*, 1989). El amonio también puede ser administrado de forma parenteral (Ferenci *et al.*, 1982) o inducido con tratamiento con ureasa (Prior y Visek, 1972), pero estos últimos modelos necesitan de mucho tiempo y no resultan útiles para estudios a largo plazo. Es un modelo que se ha demostrado valioso para el estudio de los efectos tóxicos del amonio a nivel cerebral, particularmente para el estudio del mecanismo patogénico glutamato-NO-cGMP (Hermegildo *et al.*, 1998).

4.7.3 Estenosis gradual de la vena porta.

La ligadura parcial de la vena porta reproduce la EH mínima y es más fácil que la realización de la anastomosis terminolateral portocava. Los efectos que produce son disminución de la actividad motora, alteración del ritmo circadiano de sueño-vigilia, hiperamonemia y aumento cerebral de amonio y glutamina.

4.8 Modelo experimental de encefalopatía hepática en la rata cirrótica: LCB y dieta rica en amonio.

La obstrucción del conducto biliar principal reproduce un modelo de cirrosis hepática en ratas. A diferencia del modelo de anastomosis porto-cava, la ligadura biliar (LCB) produce fallo hepático, ictericia, hipertensión portal, *shunt* porto-cava, translocación bacteriana y alteraciones del sistema inmune. Las ratas con obstrucción del conducto biliar son hiperamonémicas pero muestran un bajo grado de EH (disminución de la actividad motora). El modelo de ratas hiperamonémicas reproduce los efectos del aumento de amonio per se (sin lesión hepática) a nivel cerebral. Este modelo ha sido utilizado para el estudio de neurotransmisores a nivel cerebral, dado que las ratas hiperamonémicas muestran alteraciones en el aprendizaje y la memoria.

Un rápido repaso por los modelos anteriores muestra que todos son deficientes en algún aspecto, por lo que se hace necesario el desarrollo de un modelo experimental animal que reproduzca las alteraciones neuropatológicas de la EH (células de Alzheimer tipo II, edema cerebral de bajo grado, alteraciones de la osmolaridad cerebral, inflamación y déficits de la coordinación motora y del aprendizaje).

Algunos de los criterios que se deberían cumplir en un modelo experimental animal para el estudio de la EH en el fallo hepático crónico (tipo C) son los siguientes (Chamuleau, 1996):

- hepatopatía crónica con shunt portosistémico.
- grados de EH desde EH mínima a coma.
- existencia de factores precipitantes.
- respuesta clínica al tratamiento establecido.
- existencia de astrocitos de Alzheimer tipo II.
- disminución de osmolitos cerebrales como la fosfocolina y el mioinositol.

Con el ánimo de contar con un modelo animal más completo que reproduzca la patología en humanos, nuestro objetivo ha sido desarrollar un modelo animal experimental en la rata que combina la ligadura del conducto biliar principal (LCB) (modelo experimental de cirrosis) con una dieta que induce hiperamonemia crónica (modelo experimental de EH).

5. Descripción del estudio.

La EH es una de las complicaciones más frecuentes e importantes de los pacientes cirróticos. En esta afectación neurológica están descritos la implicación de varios sistemas de neurotransmisores cerebrales como el glutamatérgico, monoaminérgico, opioides endógenos, γ -aminobutírico y serotoninérgico. Diversos estudios han analizado estas alteraciones clínica y experimentalmente (Butterworth, 1996; Felipo y Butterworth, 2002; Lozeva *et al.*, 2004).

Por otro lado, se han descrito alteraciones en el contenido de colinesterasas periféricas (disminución de la enzima BuChE sérica), aunque no cerebrales, asociadas a enfermedades hepáticas crónicas, incluida la cirrosis (Rao *et al.*, 1994; Kabatnik *et al.*, 1999; Jamal *et al.*, 2007; Swapna *et al.*, 2007; Brown *et al.*, 1981). Los estudios realizados en humanos se han centrado principalmente en la enzima BuChE, siendo la AChE sérica poco estudiada en patología cirrótica. También se han descrito alteraciones de la enzima AChE en algunos deterioros cognitivos (como la enfermedad de Alzheimer), existiendo un consenso respecto a que la disminución de la AChE cursa en paralelo al progreso de la patología.

Dado que la etiopatogenia de la EH es multifactorial y no del todo bien estudiada, se desconoce si el sistema colinérgico también sufre afectación durante el desarrollo de la EH al igual que ocurre en otros deterioros cognitivos

6. Justificación del estudio.

La disponibilidad de un modelo animal adecuado es crucial para el estudio de cualquier enfermedad, no existiendo un modelo animal adecuado en estos momentos para el estudio de la EH en la cirrosis hepática (EH tipo C). Por ello en este trabajo primero se ha desarrollado un modelo experimental de EH en la rata cirrótica.

Tal cual se ha comentado la ligadura del conducto biliar en la rata produce cirrosis biliar en 3-4 semanas con la aparición de fibrosis hepática, hipertensión portal, *shunt* portosistémico y alteraciones del sistema inmune. De otro lado, el modelo de hiperamonemia no requiere de cirugía y no provoca daño hepático ni *shunt* portocava.

En este modelo que proponemos se reproduce una lesión hepática crónica descompensada al añadir una dieta rica en amonio y es capaz de mimetizar gran parte de las alteraciones observadas en los humanos (cirrosis hepática, alteración de los parámetros de inflamación en sangre y aumento de niveles de amonio en sangre y cerebro).

Con este modelo planteamos la oportunidad de estudiar si existe una alteración del sistema colinérgico en el desarrollo de la EH al igual que se ha constatado en el curso de otros procesos neurodegenerativos.

HIPÓTESIS

II. HIPÓTESIS.

Como ya se ha expuesto anteriormente una de las complicaciones más frecuentes de la cirrosis es la EH y aunque su etiopatogenia es multifactorial y no del todo conocida, el principal mecanismo patogénico estudiado es la alteración del metabolismo del amonio. (Felipo y Buttterworth, 2002). Por otra parte en la cirrosis hepática existe una alteración de las colinesterasas plasmáticas, probablemente como consecuencia del daño hepático, en concreto de la BuChE (Brown *et al.*, 1981), al igual que se ha visto una alteración de las colinesterasas en otros deterioros cognitivos sin afectación hepática, en concreto de la AChE.

La disponibilidad de un modelo animal es crucial para el estudio de cualquier enfermedad; en estos modelos se estudian los mecanismos fisiopatológicos de los diferentes trastornos que afectan al humano y se ensayan posibles tratamientos para los mismos. Existen modelos animales experimentales de cirrosis y modelos animales de EH. En la actualidad no existe un modelo animal adecuado para el estudio de la EH tipo C, es decir aquella EH que se produce en pacientes con cirrosis más hipertensión portal o comunicaciones portosistémicas. Para ello hemos desarrollado un modelo animal experimental de EH en la rata cirrótica que nos permita reproducir las alteraciones que se producen en el hígado cirrótico y una de sus principales complicaciones como es el desarrollo de la EH.

De igual modo planteamos en paralelo la hipótesis de trabajo de que en la EH podría existir una alteración de las colinesterasas al igual que ocurre en otros deterioros cognitivos. Para ello hemos analizado en un modelo animal de cirrosis si existen cambios en el sistema colinérgico a nivel hepático y plasmático, y a continuación hemos analizado el sistema colinérgico a nivel cerebral y en LCR en un modelo de cirrosis y de EH crónica.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS:

1. Principal:

1.1- Desarrollo de un modelo animal de EH en la rata con cirrosis hepática: modelo de ligadura del conducto biliar y dieta rica en amonio.

2. Secundarios:

2.1- Determinación de las actividades enzimáticas totales de BuChE y AChE, y de sus formas moleculares, en hígado y plasma en el modelo animal de cirrosis en la rata (modelo de ligadura biliar), para caracterizar la afectación periférica en el contenido de estas enzimas.

2.2-Determinación de las actividades enzimáticas totales de BuChE y AChE, y de sus formas moleculares, en cerebro y LCR en el modelo animal de EH en la rata cirrótica, para caracterizar la relación de estas enzimas con parte de la patología cerebral reproducida en este modelo animal.

MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1 Material utilizado.

4.1.1 Quirúrgico.

- Caja de microcirugía vascular Aesculap, compuesta por microtijeras FD 16, pinzas rectas BD 338, pinzas rectas BD 330, pinzas curvas BD 329, tijeras de disección OK 366 y pinzas Adson BD 220.
- Caja de cirugía macroscópica con tijera tipo Metzen-Baun, tijera tipo Mayo, mango de bisturí, pinzas con y sin dientes de ratón, pinzas de forcipresión tipo Cryle y tipo Kocher, mosquitos rectos y curvos.
- Tabla quirúrgica de intervención de pequeños animales.
- Dos lámparas tipo flexo de 60 vatios.
- Guantes desechables y estériles.
- Gasas (5 compresas 20 x 40 Torvac®).
- Paños de campo estériles.
- Hojas de bisturí.
- Suturas y ligaduras de seda de 3-0 y 2-0.
- Sutura de ácido poliglicólico cilíndrica de 2-0.
- Mascarillas quirúrgicas.
- Povidona yodada (Betadine®).

4.1.2 Anestésico.

- Ketamina (Ketolar® 50 mg).
- Diazepam (Valium® 10 mg).

- Suero fisiológico (cloruro sódico 0,9%).
- Jeringuillas de 2 ml (BD Emerald™, Becton Dickinson).
- Agujas intradérmicas.

- Isoflurano 100% p/p Isoba® vet (Schering-Plough Animal Health)
- Peso electrónico Pag Oerlikon Ag, modelo Precisa 510C.
- Suplementos de acetato de amonio (20% p/p).

4.1.3 Para la obtención y procesamiento de muestras de los animales de experimentación.

- Tubos de Vacutainer con K3-EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético) (1mg/mL).
- Centrífuga refrigerada Allegra™ 64 R (Beckman Coulter).
- Rotor TYPE 70 Ti (Beckman Coulter) para la extracción de proteínas
- Rotor SW 41 Ti para la separación de las formas moleculares en gradientes de densidad (Beckman Coulter).
- Congelador Forma-86 C ULT Freezer (ThermoForma).
- Agujas intradérmicas y endovenosas.
- Jeringuillas de 2, 5 y 10 cc.
- Tritón X-100/PBS (tampón fosfato salino) 1% (p/v) (Sigma Aldrich).
- Hematoxilina-eosina (Biopack®)
- Formol 10% v/v (Biopack®).
- Tampón Tris-salino (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, y 50 mM de MgCl₂, pH 7,4).
- Inhibidores de proteasas: inhibidor de tripsina, 0,1mg/ml; EGTA (ácido etilenglicol-tetraacético) 1mM; benzamidina 2mM; bacitracina, 1 mg/ml; pepstatina A, 10 µg/ml; leupetina, 20 µg/ml; aprotinina, 20 U/ml (Sigma Aldrich).

4.1.4 Para las determinaciones en fluidos y tejidos.

4.1.4.1 Determinaciones bioquímicas en plasma:

- Autoanalizador (Vitros 950 Chemistry System).

4.1.4.2 Determinación de los parámetros inflamatorios en plasma:

- ELISA Biotrak™ system (Amersham Biosciences).
- Test BD OptEIA™ (BD Biosciences).

4.1.4.3 Determinación de amonio en plasma y cerebro:

- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida (NADH) (Roche).
- Ácido tricloroacético 6%.
- Bicarbonato potásico 2M.
- Fluorímetro (Fluoroskan Ascent LabSystems).
- Microplaca de 96 pocillos Costar 96-well UV plates (Corning Costar Corporation).
- Ácido α - ketoglutarato.
- Tampón de fosfato potásico (pH 8,0).
- Enzima glutamato deshidrogenasa (Boehringer).

4.1.4.4 Determinación de nitratos y nitritos en plasma:

- Reactivo de Griess (nitrato reductasa) 10 U/ml.
- Flavin adenina dinucleótido 0,1 mmol /l.
- Tampón fosfato 0,5 mol/l.

- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida (NADH) (Roche).
- Lector de placa Infinite M200 (Tecan).

4.1.4.5 Determinación de colinesterasas en plasma y líquido cefalorraquídeo:

- Centrífuga refrigerada Allegra™ 64 R .
- Reactivo de Ellman, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB).
- Inhibidores de colinesterasas: 50 μ M Iso-OMPA, 10 μ M de BW284c51 (de Sigma Aldrich).
- Triton X-100 al 0,5% (p/v).
- Tampón Tris-salino.
- Lector de placa Infinite M200 (Tecan).
- Ácido bicinconínico (BCA) de la casa comercial Pierce.
- Aparato de ultrafiltración (Amicon Ultra 10.000 MWCO, Millipore Corporation).
- Rotor SW 41 Ti.
- Catalasa (11.4 S), fosfatasa alcalina (6.1).

4.1.4.6 Extracción de colinesterasas en hígado y cerebro:

- Sonicador Microson™ ultrasonic cell disruptor XL (Misonix).
- Tampón Tris-salino (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, y 50 mM de $MgCl_2$, pH 7,4).
- Triton X-100
- Inhibidores de proteasas: inhibidor de tripsina, 0,1mg/ml; EGTA 1mM; benzamidina 2mM; bacitracina, 1 mg/ml; pepstatina A, 10 μ g/ml; leupetina, 20 μ g/ml; aprotinina, 20 U/ml.
- Rotor TYPE 70 Ti para la extracción de proteínas.

- Rotor SW 41 Ti para la separación de las formas moleculares.
- Ultracentrífuga Optima™ L-100 XP (Beckman Coulter).
- 50 µM Iso-OMPA como inhibidor de la BuChE, y 10 µM de BW284c51 como inhibidor de la AChE.
- Ácido bicinconínico.
- Reactivo de Ellman, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB).
- Catalasa (11.4 S) y fosfatasa alcalina (6.1).

4.1.4.7 Ensayo de ChAT:

- 0,2 mM de acetil coenzima A [C^{14}] (100.000 dpm; [$1-^{14}C$] Acetyl-coenzyme A pack size 10 µCi, Amersham Biosciences).
- 300 mM de NaCl, 50 mM de tampón fosfato sódico (pH 7,4).
- 8 mM de bromuro de colina.
- 20 mM de EDTA (pH 7,4).
- 0,1 mM de eserina.
- 2 ml de acetronitrilo.
- Sistema de ultrafiltración (Amicon Ultra 10.000 MWCO, Millipore Corporation).
- Espectrómetro de centelleo líquido (Beckman Instruments, inc. LS1701 ANALYZER).

4.2 Animales de experimentación y diseño del estudio.

Todos los animales de experimentación se utilizaron siguiendo las normas del Comité Ético de experimentación animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Se utilizaron ratas macho *Sprague-Dawley* (una rata albina de uso extensivo en el campo de la biomedicina) con un peso comprendido entre 250 y 300 g.

Se utilizó una muestra total de 110 animales distribuidos en tres grupos de estudio:

- Grupo de ligadura del conducto biliar (LCB), modelo de cirrosis.
- Grupo control, sin ligadura del conducto biliar (NL).
- Grupo de ligadura del conducto biliar más dieta con amonio (LCB+DA), modelo de encefalopatía hepática en la rata cirrótica.

En primer lugar se analizó si existía daño hepático en el modelo de cirrosis con la determinación de un perfil hepático básico y el estudio anatomopatológico del mismo, tanto en el grupo de LCB (n=25) como en el grupo de NL (n= 25). De muestras de este grupo se procedió a posteriori a determinar la actividad enzimática y las formas moleculares de las colinesterasas (AChE y BuChE) en el tejido hepático y en el plasma para ver si existían cambios en la condición cirrótica de los animales de experimentación.

En una segunda fase se caracterizó el modelo de cirrosis con encefalopatía hepática, con determinación del daño hepático con un perfil bioquímico, estudio anatomopatológico, niveles de amonio en plasma y tejido cerebral, parámetros de la inflamación y niveles de nitritos y nitratos en plasma, en los grupos de LCB (n=20), NL (n=20) y LCB+DA (n=20). También en estos grupos se determinó la actividad enzimática y las formas moleculares de las colinesterasas (AChE y BuChE) en tejido cerebral y líquido cefalorraquídeo de los animales en condición cirrótica y encefalopática.

4.3 Inducción de cirrosis hepática mediante la ligadura del conducto biliar (modelo experimental de LCB):

La técnica quirúrgica de la ligadura del conducto biliar consiste en la doble ligadura y sección del conducto biliar. Para ello se prepara una solución anestésica con una proporción de 7 ml de ketamina (Ketolar® 50 mg) (100 mg/Kg), 2 ml de diazepam (Valium® 10 mg) (3 mg/Kg) y 1 ml de suero fisiológico. Se inmoviliza a la rata y se le administra una dosis de 0,03 ml por kilo de peso (para una rata de 300 g se le administraría una dosis de aproximadamente 1 ml) de solución anestésica vía intraperitoneal a nivel de la raíz de una de las extremidades posteriores para evitar puncionar la vejiga urinaria o un asa intestinal. El inicio de la acción anestésica es de treinta a sesenta segundos, manteniéndose el efecto de la misma durante cinco o diez minutos. Si fuese necesario administrar dosis adicionales para prolongar el efecto anestésico, la administración se realiza vía intramuscular a razón de 0,1 ml por kilo de peso, ya que así se consigue una duración del efecto de anestesia quirúrgica entre doce y veinticinco minutos.

A continuación se rasura la parte superior del abdomen de la rata. Se pinta con solución antiséptica y se coloca un campo estéril (guantes e instrumental quirúrgico). Se practica una incisión en la línea media desde cerca de la apófisis xifoides hasta una extensión de unos 2 cm de longitud. Se localiza la primera asa de intestino delgado y se tracciona suavemente de ella hacia delante, exponiéndose así el tejido pancreático y el conducto biliar. Con unas pinzas micro quirúrgicas se disecciona el conducto biliar y se colocan dos ligaduras de sutura irreabsorbible (seda de 3-0) para realizar la doble ligadura y sección del conducto biliar. Finalmente se cierra la pared muscular abdominal con puntos discontinuos de sutura reabsorbible (ácido poliglicólico de 2-0) y la piel con puntos discontinuos de seda de 2-0. En el grupo control, sin ligadura del conducto biliar (NL), y tras la incisión quirúrgica se identificó el conducto biliar sin realizar otra intervención (ver **Fig. 3-10**).

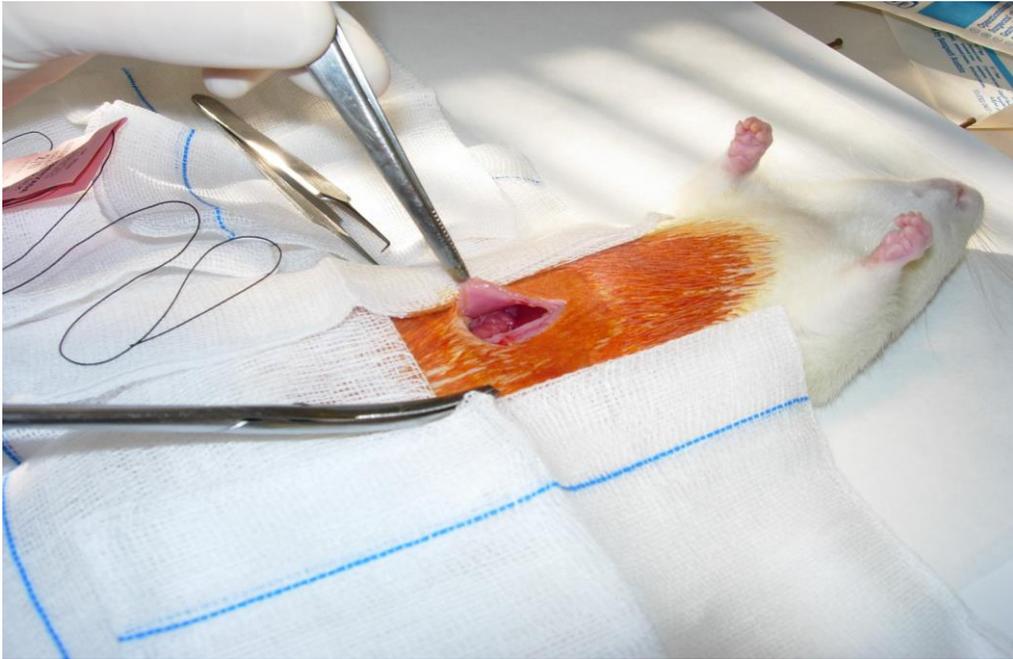


Fig. 3 Incisión de laparotomía media en la rata para la localización del conducto biliar principal.

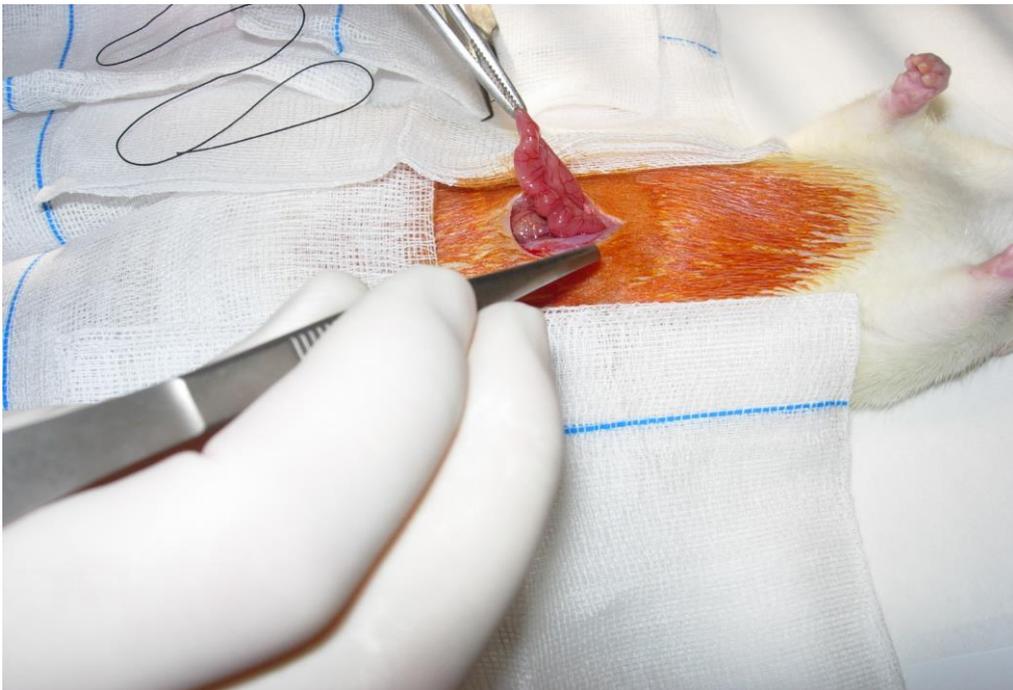


Fig. 4 Identificación de la primera asa de intestino delgado. La tracción intestinal debe ser muy suave para evitar el sangrado del tejido pancreático localizado en el meso intestinal.



Fig. 5 Identificación del conducto biliar principal con unas pinzas microquirúrgicas. En el grupo control (NL) solo se realizó esta maniobra quirúrgica de identificación.

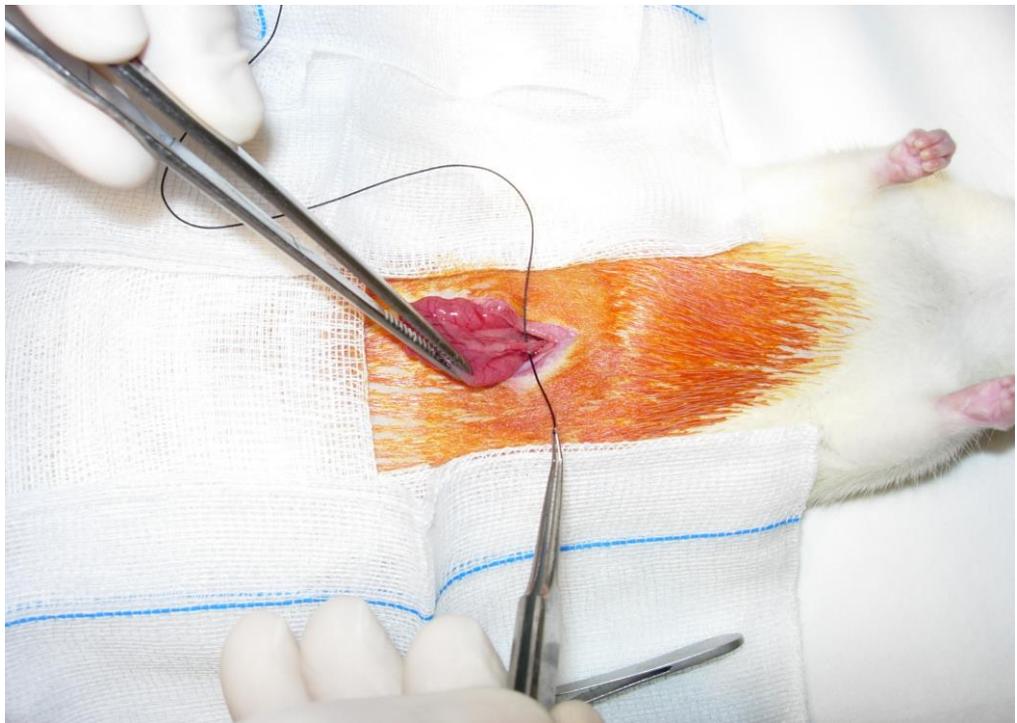


Fig. 6 Ligadura del conducto biliar con material de sutura irreabsorbible.

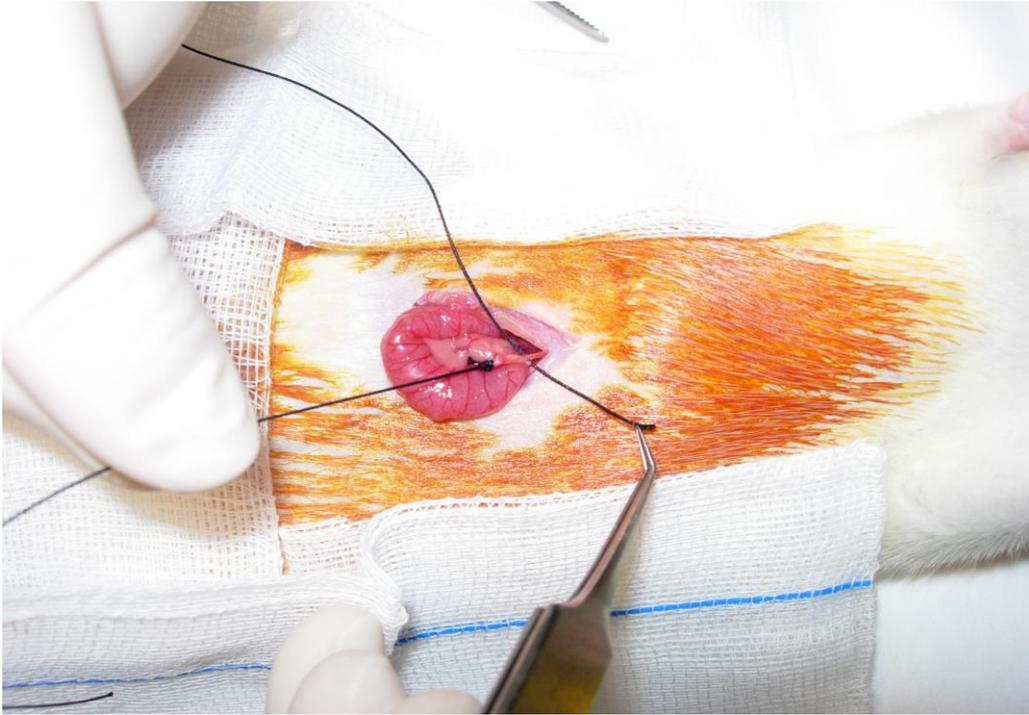


Fig. 7 Doble ligadura del conducto biliar principal con ligaduras de seda.

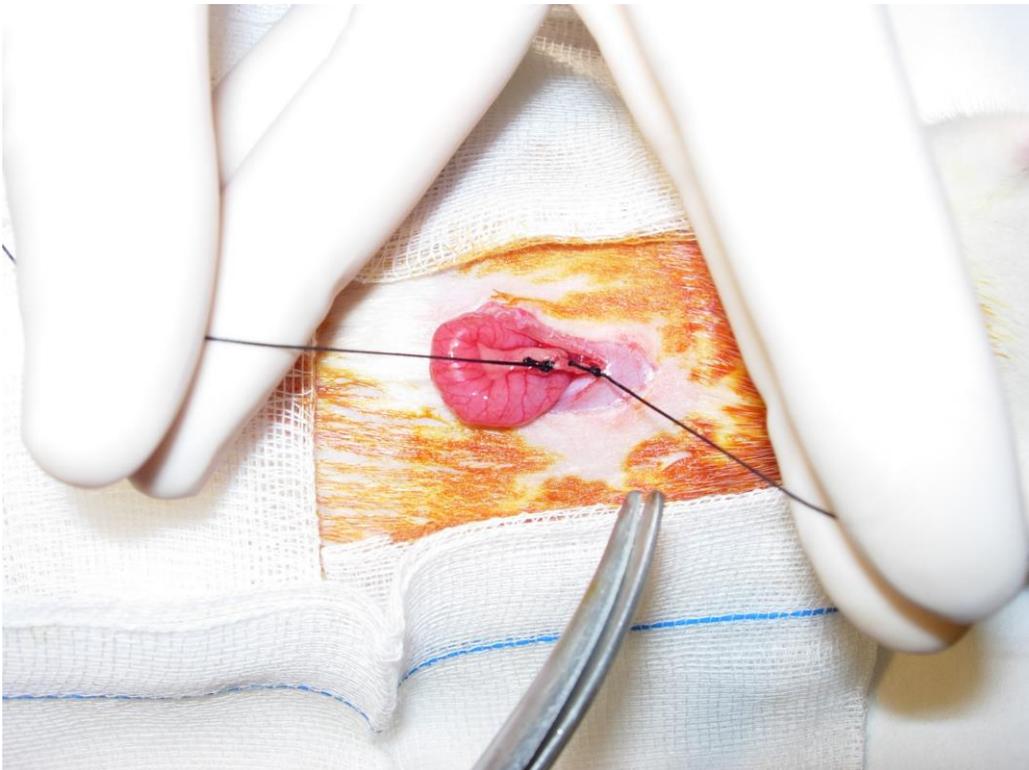


Fig. 8 Sección del conducto biliar principal una vez realizada la doble ligadura del conducto biliar.

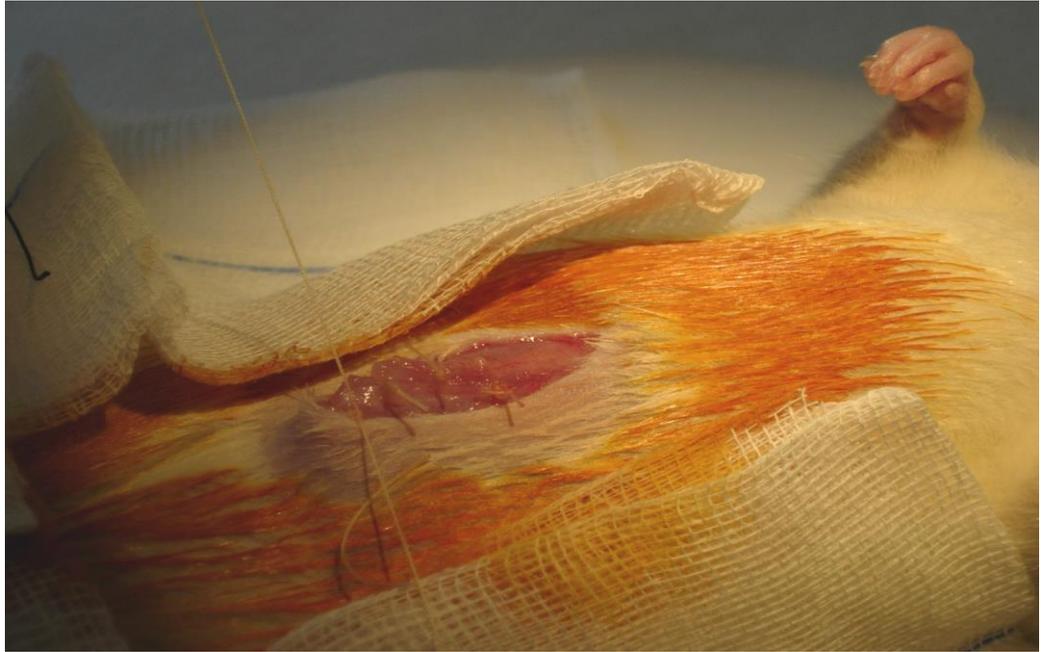


Fig. 9 Cierre de la laparotomía media una vez finalizada la doble ligadura y sección del conducto biliar principal. El plano muscular se aproximó con puntos discontinuos de material de sutura reabsorbible.

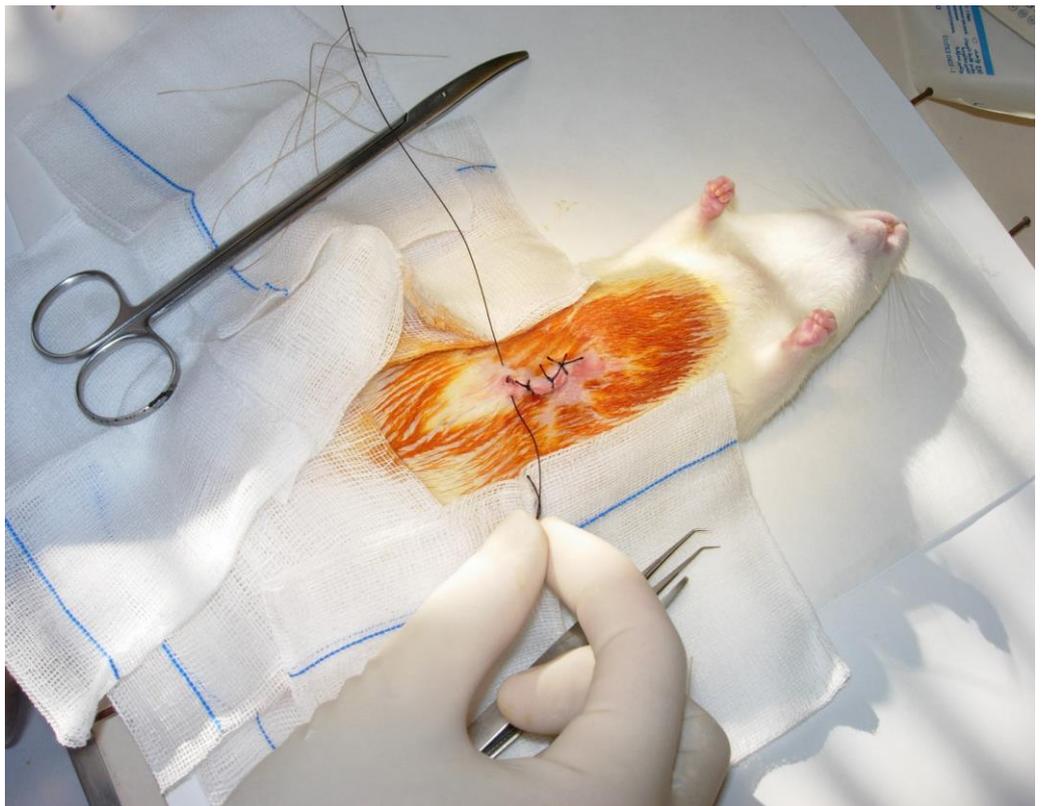


Fig. 10 Cierre de la laparotomía media una vez finalizada la doble ligadura y sección del conducto biliar principal. La piel se aproximó con puntos discontinuos de seda.

4.4 Modelo de encefalopatía hepática en la rata cirrótica (modelo experimental de LCB+DA).

La doble ligadura y sección del conducto biliar se realizó según se ha expuesto previamente en el modelo de cirrosis.

4.4.1 Inducción de hiperamonemia.

El grupo de LCB+DA se alimentó con una dieta rica en amonio según se ha descrito previamente en otros estudios (Azorin *et al.*, 1989) que consiste en administrar en la dieta de los animales suplementos de acetato de amonio (20% p/p) a partir del día 14 postoperatorio después de la ligadura del conducto biliar hasta el sacrificio de los animales a las tres semanas de la cirugía.

4.5 Extracción de muestras y preparación de tejidos: sangre, hígado, líquido cefalorraquídeo y cerebro.

4.5.1 Sangre.

Las ratas fueron sacrificadas a las tres semanas de la cirugía. Se anestesiaron con isofluorano y se extrajeron muestras de sangre, mediante punción cardíaca (**Fig.11**). La sangre se depositó en tubos de Vacutainer que contenían K3-EDTA (1mg/mL), se centrifugaron a 500 $\times g$ durante 5 minutos a 4°C y se obtuvo el plasma. Para la determinación de amonio y nitritos/nitratos en plasma, se extrajeron muestras de sangre venosa de la cola (**Fig.12**).

4.5.2 Hígado.

Para la confirmación de la cirrosis las muestras fijadas con formol se analizaron histológicamente por tinción en hematoxilina-eosina según se ha descrito en otros estudios (Clària y Jiménez, 2005).

Para la determinación de colinesterasas, el hígado se extrajo rápidamente y se lavó con solución salina. Las muestras fueron almacenadas a -80°C para su posterior análisis.

Para la extracción de proteínas hepáticas del tejido hepático las muestras descongeladas gradualmente se homogenizaron en hielo [10% peso/volumen (p/v)] con un tampón Tris-salino (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, y 50 mM de MgCl_2 , pH 7,4) que contiene 1% (p/v) de Triton X-100 y una mezcla de inhibidores de proteasas (Sáez-Valero *et al.*, 1996). El Triton X-100 es un detergente que se utiliza para solubilizar las proteínas de membrana, es decir, para poder extraer la AChE de los tejidos. Esta suspensión se centrifugó a $100.000 \times g$ a 4°C durante 1 hora para la obtención de la fracción rica en colinesterasas.

4.5.3 L.C.R.

La técnica de extracción del LCR se realizó mediante punción de la cisterna magna, desechándose aquellas muestras que estuvieran contaminadas con sangre (**Fig.13, 14**). Tras centrifugar de manera semejante a la sangre ($500 \times g$, 5 minutos, 4°C), se reservó el sobrenadante para las determinaciones enzimáticas, conservándolo a -80°C .

4.5.4 Cerebro.

La homogenización del tejido cerebral y extracción de proteínas para la medición de las colinesterasas se asemeja a lo realizado para hígado, salvo que se realizó una extracción secuencial.

Las hemicortezas cerebrales de las ratas fueron homogeneizadas (10% p/v) en hielo Tris-salino tampón (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl y 50 mM MgCl₂, pH 7,4) suplementada con una mezcla de inhibidores de proteínas (Sáez- Valero *et al.*, 1996). Los homogenizados se centrifugaron a 100.000 ×g a 4°C durante 1 hora, retirándose el sobrenadante que contiene la extracción de la fracción soluble de proteínas y de aquellas que están débilmente unidas a membrana. Los pellets se resuspendieron en el mismo volumen usando ahora el mismo tampón Tris-salino con Triton X-100 al 1% (p/v). Tras homogeneizar estos extractos la suspensión se centrifugó nuevamente a 100.000 ×g a 4°C durante 1 hora, para obtener ahora la fracción solubilizada en detergente, con presencia de proteínas intrínsecas de membrana. Este método de extracción se ha demostrado eficaz para obtener una mayor eficacia en la extracción de la AChE colinérgica o G₄ de membrana de células cerebrales (Sáez-Valero *et al.*, 1993; Sberna *et al.*, 1998). Para el ensayo de actividad enzimática se combinaron los sobrenadantes con volúmenes iguales de sal (tampón Tris-Salino) y detergente (Triton X-100).



Fig. 11 Extracción venosa mediante punción cardiaca.



Fig. 12 Extracción venosa mediante punción a nivel de la cola de la rata.



Fig. 13 Localización de la cisterna magna.



Fig. 14 Extracción de LCR.

4.6 Determinaciones y metodología utilizada.

4.6.1 Determinaciones bioquímicas en plasma.

4.6.1.1 Perfil hepático, mediadores de la inflamación, amonio y nitritos/nitratos:

Se realizaron mediciones de glucosa, urea, creatinina, sodio, GOT (transaminasa glutámico oxalacética o AST, enzima aspartato aminotransferasa), GPT (transaminasa glutámico-pirúvico o ALT, enzima alanina aminotransferasa), GGT (enzima gamma glutamil transpeptidasa), fosfatasa alcalina (FA) y proteínas totales en muestras de sangre obtenidas por punción cardiaca. Estos parámetros se determinaron externamente en un laboratorio asociado y mediante autoanalizador (Vitros 950 Chemistry System).

Para las determinaciones de interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α) las muestras de sangre por punción cardiaca, en tubos de EDTA, se centrifugaron a 450 \times g durante 5 minutos a 4°C y posteriormente se congelaron a -80°C hasta el momento de las determinaciones analíticas. La IL-6 se midió mediante ELISA Biotrak™ system (Amersham Biosciences). El factor de necrosis tumoral alfa se determinó mediante el test BD OptEIA™ (BD Biosciences). El test de ELISA Biotrak™ system (Amersham Biosciences) es una técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) para la medición cuantitativa de la IL-6 de la rata que se puede determinar tanto en suero, plasma o en el sobrenadante de cultivos celulares. Se basa en que los complejos antígeno-anticuerpo de IL-6 reaccionan con una enzima sustrato, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), que produce una reacción de color y son detectados en un lector de placa a una longitud de onda de 450 nm. La medición de factor de necrosis tumoral mediante el test BD OptEIA™ (BD Biosciences) utiliza el mismo principio descrito pero la enzima sustrato de la reacción es la streptavidina-HRP

(streptavidin-horseradish peroxidase conjugate), midiéndose en un lector de placa la reacción colorimétrica de los inmunocomplejos a una longitud de onda de 450 nm.

La determinación de amonio en plasma se realizó utilizando una adaptación del procedimiento descrito por Kun y Kearne (Hermenegildo *et al.*, 2000). Este procedimiento se basa en la reacción del amonio (NH_4^+) con nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH) que es una sal disódica, y un ácido, el α -ketoglutarato, mediante la enzima glutamato dehidrogenasa. La disminución de NADH se midió por fluorescencia a una longitud de onda de 460 nm. El pH óptimo de la reacción es de 8 y las muestras se procesaron en una centrifuga refrigerada a 4°C. Los reactivos utilizados fueron: ácido tricloroacético 6%, bicarbonato potásico 2M, ácido α -ketoglutarato, nicotinamida adenina dinucleótico, tampón de fosfato potásico (pH 8,0), enzima glutamato deshidrogenasa. Procedimiento (según método de Kun y Kearne): se extrajeron muestras de sangre de la cola de la rata (150 μl) en la tercera semana después de la cirugía. Las muestras de sangre fueron desproteinizadas con un volumen de hielo de ácido tricloroacético al 6%, y guardadas en hielo durante 15 minutos. Tras centrifugar a 12.000 $\times g$ durante 10 minutos a 4°C, se separó el sobrenadante que se neutralizó con KHCO_3 a una concentración 2M, sometiéndose a ulterior centrifugación a 12.000 $\times g$ durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante neutralizado se utilizó para medir el amonio, mediante fluorimetría. Para la medición de amonio simultáneamente en varias muestras, se utilizó una microplaca de 96 pocillos Costar 96-well UV plates y se midió la fluorescencia a una longitud de onda de 460 nm. El sobrenadante contenía en un volumen final de 100 μl , 50 o 60 μl de muestra, 30 mM de α -ketoglutarato, 0.5 mM de nicotinamida adenina dinucleótico en un tampón de fosfato potásico (pH 8,0). Las reacciones se iniciaron con la adición de 5 μg de glutamato deshidrogenasa y se siguieron en el fluorímetro durante 70 minutos. El estándar de referencia contenía 25 nmol de amonio para cada ensayo.

Para la determinación de nitritos y nitratos se midieron en plasma mediante el método Griess (Green *et al.*, 1991) después de reducir el nitrato a nitrito. El reactivo de Griess produce una reacción de color (colorante azoico) que está relacionado con la cantidad de nitrito de la muestra, que se puede medir por espectrofotometría, con una absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. La absorbancia se siguió por espectrofotometría, en concreto mediante un lector de placa Infinite M200 (Tecan). Los reactivos utilizados fueron: reactivo de Griess (nitrato reductasa), flavin adenina dinucleótido, nicotidamida adenina dinucleótido fosfato forma reducida. Procedimiento (Método de Griess): las muestras de sangre venosa (150 μ l) se extrajeron de la cola de la rata con tubos de EDTA y se centrifugaron a 450 $\times g$ durante 5 minutos. Antes de las determinaciones, las muestras de plasma se incubaron durante 20 minutos a 37°C, y para convertir el nitrato en nitrito, en 0,5 mol/l de tampón fosfato con 10 U/ml de nitrato reductasa (reactivo de Griess), 0,1 mmol/l de flavin adenina dinucleótido y 1 mmol/l de nicotidamida adenina dinucleótido fosfato reducida, para convertir el nitrato en nitrito.

4.6.1.2 Actividad enzimática y formas moleculares de AChE y BuChE.

La actividad enzimática de AChE y BuChE se determinó separadamente, entre los distintos tipos de colinesterasa, con una adaptación a microensayo del método de Ellman y mediante el uso de inhibidores específicos (dado que ambas colinesterasas co-existen en el tejido, para analizar la actividad de una la otra debe ser inhibida): 50 μ M Iso-OMPA como inhibidor de la BuChE, y 10 μ M de BW284c51 como inhibidor de la AChE (para más detalle ver, Sáez-Valero *et al.*, 1993).

Una unidad de actividad enzimática de AChE o BuChE se definió como la cantidad de extracto necesaria para hidrolizar 1 nmol del sustrato acetilticolina o butirilticolina, por minuto y a 22°C. Se usan tio-análogos, para que tras la hidrólisis la tiocolina liberada reaccione con el reactivo de Ellman, generando una

reacción colorimétrica en el amarillo que se sigue a 412 nm, y cuya variación de intensidad en el tiempo es indicativa de la actividad enzimática. Se siguió la variación en absorbancia mediante el lector de placa Infinite M200.

Para expresar la actividad enzimática en unidades específicas estas se refirieron al contenido en proteína total (U/mg). La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el procedimiento del ácido bicinónico. El principio de este método se basa en la reducción, por reacción con las proteínas, de los iones cúprico a iones cuproso bajo condiciones alcalinas. Los iones cuproso reaccionan con el BCA (originalmente de color verdoso) para dar un color morado. La intensidad del color morado será proporcional al contenido proteico de la muestra, y se sigue colorimétricamente a 562 nm (lector de placa Infinite M200).

Las formas moleculares de AChE y BuChE se determinaron mediante análisis de sedimentación. Dichas formas moleculares se separaron de acuerdo a sus coeficientes de sedimentación mediante ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa continuo que va del 5 al 20% (p/v) y conteniendo el detergente Triton X-100 al 0,5% (p/v) en un tampón Tris-salino (Sáez-Valero *et al.*, 1993; 1999). La ultracentrifugación se realizó a 150.000 $\times g$ en un rotor SW 41 Ti durante 18 horas a 4°C. Se obtuvieron aproximadamente 40 fracciones desde el fondo de cada tubo, y en cada una de ellas se determinó la actividad colinesterasa (AChE o BuChE, según sea el caso). La actividad colinesterasa determinada en el continuo de todas las fracciones definió uno o varios picos de actividad, que se identificaron como formas moleculares concretas por su proximidad a marcadores de coeficiente de sedimentación conocido que se añadieron antes de centrifugar las muestras, catalasa (11.4 S) y fosfatasa alcalina (6.1). Definimos el cociente de formas de AChE $G_4/(G_1+G_2)$ como la proporción de moléculas G_4 respecto a la suma de formas globulares ligeras G_1 y G_2 . Para algunos experimentos las fracciones de sacarosa que contenían picos de G_4 y

G₁+G₂ se agruparon por separado, se dializaron y concentraron por ultrafiltración en tampón Tris-salino.

4.6.2 Determinaciones en tejido hepático.

4.6.2.1 *Estudio histológico del tejido hepático.*

Las muestras para la confirmación de la cirrosis se tiñeron con hematoxilina-eosina según se ha descrito en otros estudios (Clària y Jiménez, 2005).

4.6.2.2 *Actividad enzimática y formas moleculares de AChE y BuChE.*

Para la extracción de proteínas hepáticas del tejido hepático se homogenizó en hielo [10% peso/volumen (p/v)] con un tampón Tris-salino (50 mmol/l Tris-HCl, 1 mol/l NaCl, y 50 mmol/l de MgCl₂, pH 7,4) que contiene 1% (p/v) de Triton X-100 y una mezcla de inhibidores de proteinasas (Sáez-Valero *et al.*, 1999). Esta suspensión se centrifugó a 100.000 ×g a 4°C durante 1 hora para la obtención de la fracción rica en colinesterasa.

La actividad enzimática de AChE y BuChE se determinó mediante el método de microensayo modificado de Ellman según se ha descrito previamente (Sáez-Valero *et al.*, 1999) y la concentración total de proteínas mediante el método del ácido bicinconínico.

Las formas moleculares de AChE se determinaron mediante análisis de sedimentación según se ha descrito previamente.

4.6.3 Determinaciones en tejido cerebral.

4.6.3.1 Amonio.

Para la determinación del contenido de amonio cerebral se realizó una preparación previa del tejido. La corteza cerebral fue homogeneizada y desproteinizada en 5 volúmenes de hielo de ácido tricloroacético al 6% y guardada en frío durante 15 minutos (de manera semejante a lo descrito en plasma).

Después de centrifugar las muestras a 12.000 $\times g$ durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante resultante se neutralizó con KHCO_3 a una concentración 2M y se centrifugó de nuevo a 12.000 $\times g$ durante 10 minutos a 4°C. El amonio fue medido en los sobrenadantes neutralizados mediante fluorimetría. Se añadió a las muestras 5 μg de glutamato deshidrogenasa para que se iniciase la reacción y fueron seguidas en el fluorímetro durante 70 minutos a una longitud de onda de 460 nm. El estándar de referencia contenía 25 nmol de amonio en cada ensayo. Los ensayos fueron realizados en una microplaca Costar 96-well UV.

4.6.3.2 Actividad enzimática y formas moleculares de AChE y BuChE.

Aproximadamente 0,2 g de corteza de ratas fue homogeneizada (10% p/v) en hielo Tris-salino tampón (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl y 50 mM MgCl_2 , pH 7,4) suplementada con una mezcla de inhibidores de proteínas (García-Ayllón *et al.*, 2006). Los homogenizados se centrifugaron a 100.000 $\times g$ a 4°C durante 1 hora para la extracción de la fracción soluble. Los pellets se obtuvieron con un volumen igual de tampón Tris salino con un contenido de Triton X-100 al 1% (p/v), y la suspensión se centrifugó a 100.000 $\times g$ a 4°C durante 1 hora para obtener la fracción soluble detergente, con enzimas ricas de membrana. Como

se ha comentado este protocolo de extracción permitió optimizar la solubilización de las formas de membrana de la AChE. Para el ensayo de actividad enzimática se combinaron volúmenes iguales de los dos sobrenadantes extraídos secuencialmente.

La actividad enzimática de AChE y BuChE, así como de la proteína total, se determinaron como se ha detallado anteriormente. De manera semejante para la determinación de las formas moleculares de AChE y BuChE se separaron por ultracentrifugación según lo comentado.

4.6.3.3 Determinación de actividad ChAT.

La actividad de la enzima colina acetil transferasa (ChAT; EC 2.3.1.6) fue analizada con el procedimiento radioenzimático establecido por Fonnum (ver la adaptación empleada en Sberna *et al.*, 1998). Las muestras de tejido cerebral se homogeneizaron (10% p/v) y se prepararon tal y como se ha descrito para la extracción de AChE.

Volúmenes iguales de los sobrenadantes obtenidos secuencialmente se mezclaron y se incubaron con un sustrato formado por: 0,2 mM de acetil coenzima A (acetil Co A) [C14] (100.000 dpm; [1-14C] Acetyl-coenzyme A pack size 10 μ Ci, Amersham Biosciences), 300 mM de NaCl, 50 mM de tampón fosfato sódico (pH 7,4), 8 mM de bromuro de colina, 20 mM de EDTA (pH 7,4) y 0,1 mM de eserina. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C antes del final de la reacción. Después del periodo de incubación, las muestras se lavaron dentro de los viales del contador de centelleo con tampón fosfato sódico 10 mM (pH 7,4). A continuación se añadieron 2 ml de acetronitrilo conteniendo 10 mg de Kalignost y 10 ml de mezcla de tolueno del centelleo. Se agitaron las muestras

durante un minuto, de manera que la acetilcolina extraída quedó en la fase del tolueno y la acetil CoA quedó en la fase acuosa.

El contador de centelleo (medidor de radioactividad) utilizado fue un espectrómetro de centelleo líquido (Beckman Instruments, inc. LS1701 ANALYZER). Lo que sucede en esta reacción es que la acetilCoA marcada con el C^{14} reacciona con el bromuro de colina y libera acetilcolina marcada. La actividad enzimática se calculó como las desintegraciones por minuto (dpm) del C^{14} .

4.6.4 Determinaciones en LCR.

4.6.4.1 Actividad enzimática y formas moleculares de AChE y BuChE.

La actividad enzimática y las formas moleculares de las colinesterasas se determinaron de la misma forma que en las muestras de plasma. Así pues la actividad enzimática en el LCR se determinó mediante el método de microensayo modificado de Ellman (Sáez-Valero *et al.*, 1999) y la determinación proteica mediante el método del ácido bicinconínico. Las formas moleculares de AChE y BuChE se determinaron mediante análisis de sedimentación.

4.7 Análisis estadístico.

En el estudio descriptivo, los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM) o la desviación estándar (DE) según se especifica en cada figura y/o tabla.

Para la comparación entre grupos se utilizó el test de la t de Student o el test de ANOVA, seguido del test post-hoc de Newman-Keuls. La comparación entre grupos que no siguió una distribución normal se realizó con tests no paramétricos como el Mann-Whitney y el Kruskal-Wallis ANOVA.

Se aceptó como significativo un nivel de confianza del 95% y la significancia estadística fue designada para una $P < 0,05$. Los datos se analizaron mediante el software SigmaStat (versión 2.03; SPSS, Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

V. RESULTADOS.

En primer lugar se documenta la caracterización del modelo LCB.

5.1 Modelo animal de cirrosis (LCB).

Las ratas se sacrificaron a los 21 días de la ligadura del conducto biliar, mostrando pérdida de peso, ictericia, coluria, ascitis y signos evidentes de hipertensión portal. A nivel histológico las ratas LCB mostraron claros signos de cirrosis hepática (**Fig. 15**). Ninguno de estos hallazgos se observaron en el grupo de ratas sin ligadura biliar (NL) que también se sacrificaron a las 3 semanas.

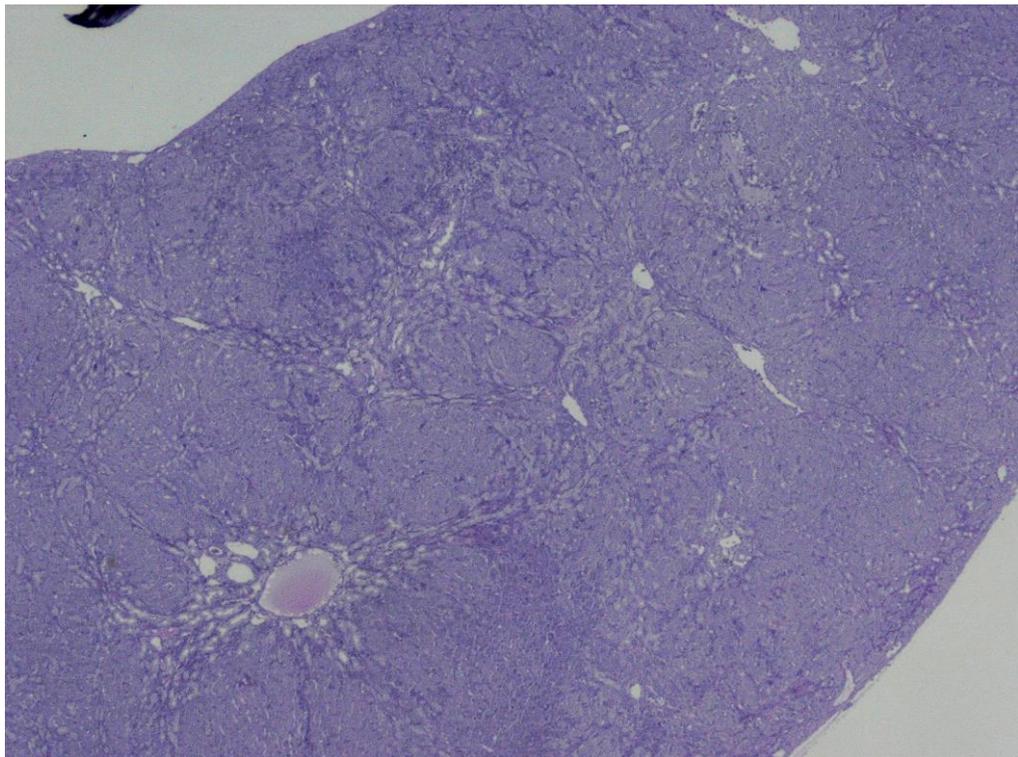


Fig. 15 Fotografía de una muestra histológica de tejido hepático con tinción de hematoxilina-eosina donde se observa alteración de espacio periportal y disrupción alrededor de la vena porta por tractos de fibrosis en tejido hepático de las ratas con ligadura del conducto biliar (4×).

5.1.1 Determinación de proteínas y perfil hepático en las muestras de sangre:

La totalidad de los marcadores séricos de disfunción hepática analizados también se mostraron alterados en el grupo LCB (Fig. 16).

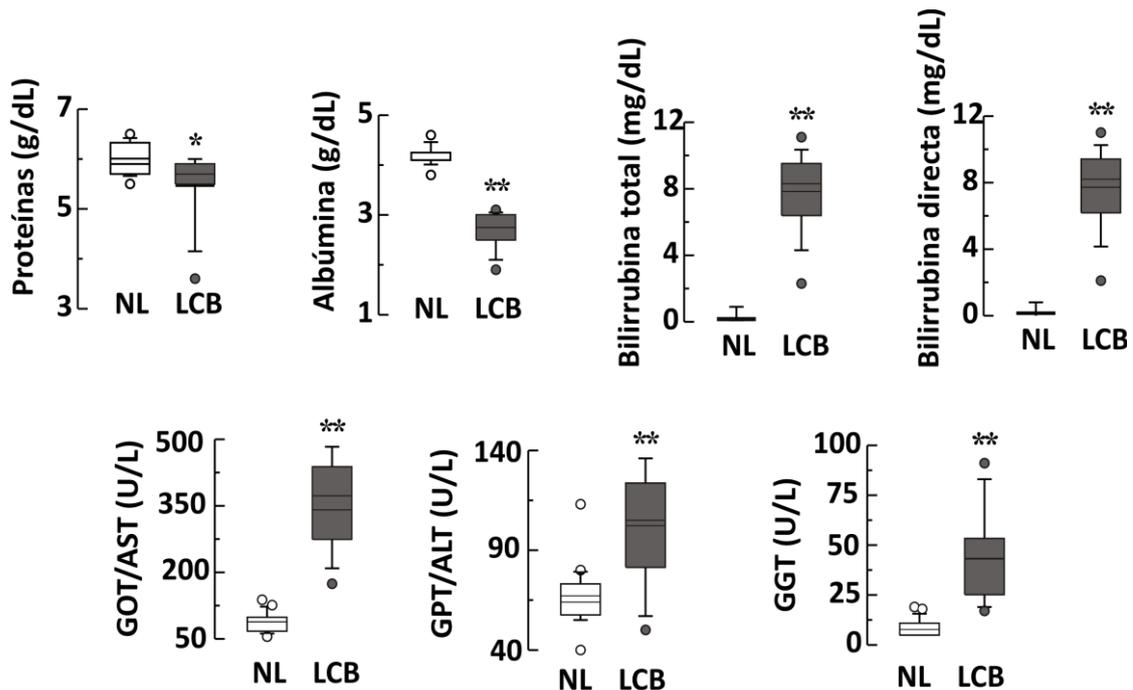


Fig. 16 Niveles séricos de proteínas (proteínas totales, albúmina, bilirrubina total y directa) y perfil hepático (GOT/AST, GPT/ALT, GGT) medidas en el momento del sacrificio de los animales a los 21 días de intervención, en el grupo control (NL; n=15) y en el grupo de LCB (n=15). *P<0,05, **P<0,001, resultados estadísticamente significativos respecto al grupo NL, comparados con el test t de Student o el test de U de Mann-Whitney. GOT o AST (enzima transaminasa glutámico-oxalacética o aspartato aminotransferasa), GPT o ALT (enzima transaminasa glutámico-pirúvico o alanina amino transferasa), GGT (enzima gamma glutamil transpeptidasa), NL (no ligadura), LCB (ligadura del conducto biliar). Los resultados están expresados como la media ±EEM.

5.1.2 Actividad específica AChE y BuChE, y niveles de sus formas moleculares, en el hígado de ratas LCB y NL:

En primer lugar determinamos si los niveles de AChE y BuChE estaban alterados en el hígado de las ratas LCB (**Fig. 17A**). La actividad específica de AChE se demostró disminuida en los extractos de tejidos de animales LCB respecto a los control NL (descenso 51%, con una $P < 0,001$). Los niveles de BuChE no varían significativamente en rata cirrótica frente a controles.

La AChE (y la BuChE) se expresa en diferentes formas moleculares cuyo patrón es específico del tejido en cuestión, y su estimación puede ser útil en relación al proceso patológico. Estas formas moleculares pueden distinguirse según su peso molecular y sus propiedades hidrodinámicas (Massoulié *et al.*, 1993).

Para determinar si el descenso en la actividad de AChE en hígado de ratas LCB era atribuible al descenso de una forma molecular específica, los extractos hepáticos se fraccionaron por ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa para separar las formas moleculares de AChE (y BuChE) mayoritarias (**Fig. 17B**). Para AChE se identificaron picos de actividad en zona con un coeficiente de sedimentación de $10,2 \pm 0,1$ S (o unidad de sedimentación Svedberg calculadas por la distancia a marcadores de coeficiente de sedimentación conocido), correspondiente a tetrámeros de AChE (G_4), así como en picos de $4,7 \pm 0,1$ S, que resuelven formas ligeras monómeros (G_1). En algunos de los gradientes se distinguieron formas diméricas de AChE (G_2 ; $5,5 \pm 0,2$ S), aunque sin poder resolverse separadamente de las G_1 , por lo que siempre se cuantificaron ambas de manera conjunta. Obtuvimos resultados similares cuando los animales se perfundieron con solución salina al sacrificio, indicando que la mayoría de la actividad AChE identificada como tisular era real y no un artefacto procedente de la sangre, muy rica en actividad colinesterasa (colinesterasa solubles). En las muestras hepáticas del grupo LCB, el pico de

G_1+G_2 disminuye ligeramente, pero el efecto más significativo fue la casi total depleción de las formas tetraméricas. Debido a ello, se puede caracterizar una disminución significativa en el cociente $G_4/(G_1+G_2)$ en el grupo LCB respecto al grupo NL (Fig. 17B). Las formas moleculares de BuChE no sufrieron cambios aparentes (Fig. 17C).

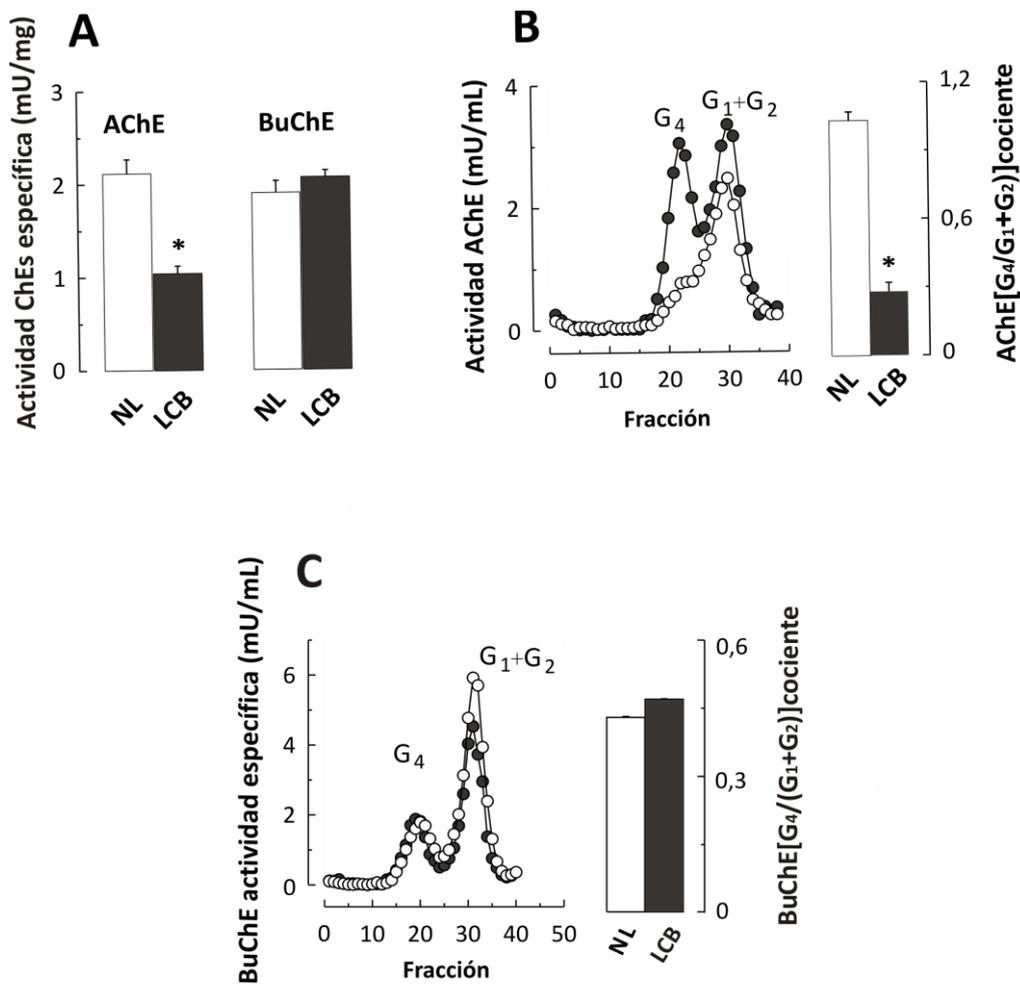


Fig. 17 La cirrosis hepática induce una disminución particularmente de las formas G_4 de AChE a nivel hepático. En (A) se muestra la actividad específica (mU/mg) de la AChE y la BuChE en el hígado de las ratas con LCB y las ratas control. Las formas moleculares de AChE (B) y BuChE (C) en el hígado de las ratas con LCB (círculos negros, $n=6$) y las ratas control (círculos blancos, $n=6$) también se muestra; con la definición del cociente $G_4/(G_1+G_2)$ para documentar el cambio en AChE. * $P<0,005$. ChEs (colinesterasas); AChE (acetilcolinesterasa); BuChE (butirilcolinesterasa). Los resultados están expresados como la media \pm EEM.

Se postula que el origen celular de las colinesterasas solubles detectadas en el plasma es el propio hígado, por lo que una afectación hepática conllevaría potenciales alteraciones en los niveles plasmáticos de las enzimas. Sin embargo existen otros órganos que pueden contribuir a ese pool de enzimas plasmáticas. Para determinar si los cambios que ocurrían en el hígado tras la ligadura biliar se manifestaban también de algún modo en el plasma, se determinaron en el mismo los niveles totales de AChE y BuChE, y los de sus formas moleculares.

El análisis de la actividad enzimática de la AChE plasmática reveló que el plasma del grupo LCB tenía una actividad enzimática menor que el grupo control (44 % disminución con una $P < 0,001$; **Fig. 18 A**). El fraccionamiento de formas moleculares para la AChE en el plasma del grupo control mostró abundantes tetrámeros y tan sólo trazas de formas ligeras (**Fig. 18 B**). No obstante estas escasas formas ligeras parecen poco afectadas respecto a la disminución de G_4 , resultando en una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,001$) en el cociente de formas $G_4/(G_1+G_2)$ entre el grupo LCB y NL (**Fig. 18C**). De nuevo, en este caso con isoformas secretadas de AChE se pone de manifiesto que la condición cirrótica afecta sobre todo a la formas G_4 de la enzima. Ni los niveles totales de BuChE, ni el de sus formas moleculares sufrieron cambios significativos en las ratas cirróticas LCB, respecto a las ratas control NL (**Fig. 19**).

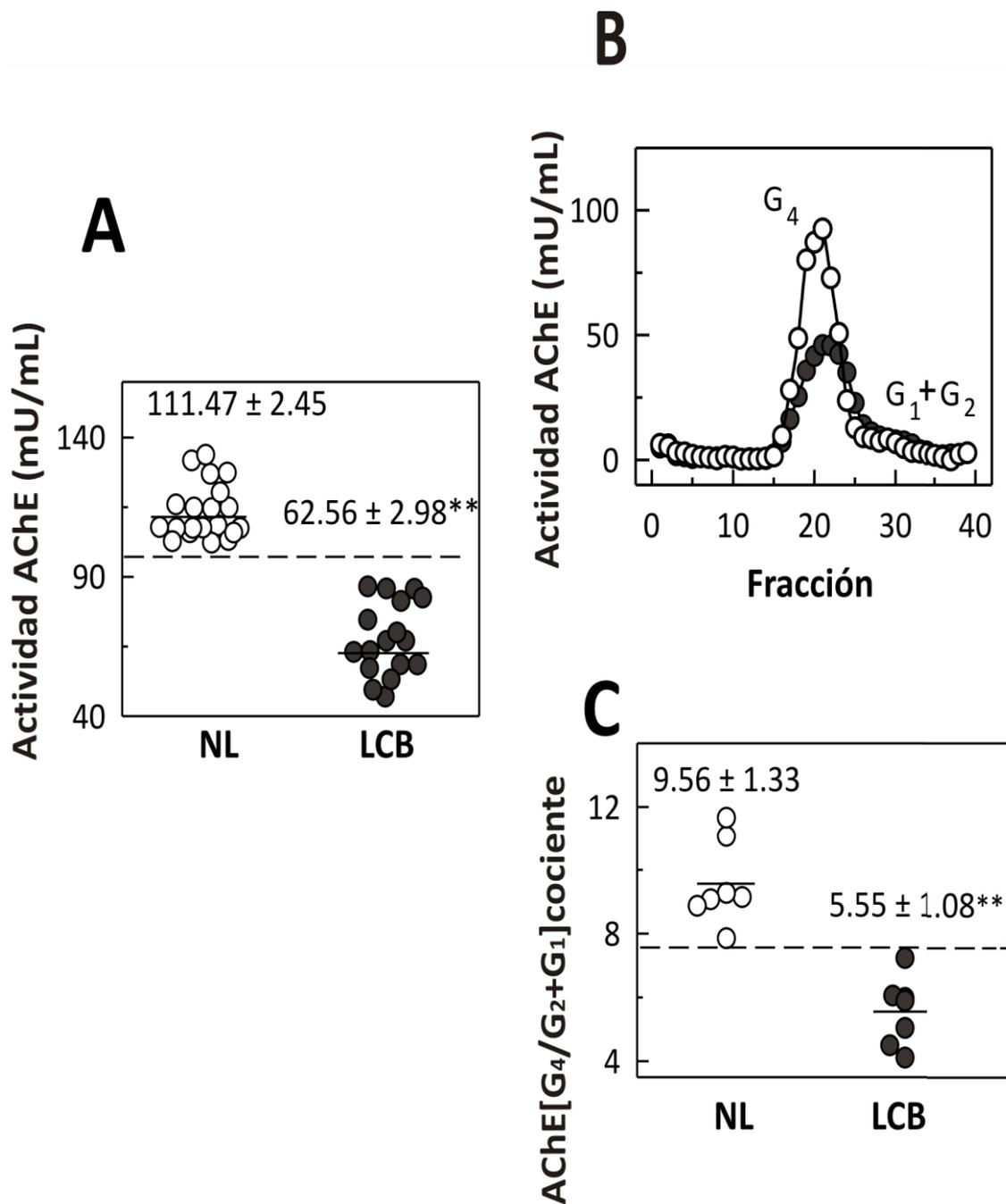


Fig. 18 Los niveles de G_4 de AChE plasmática también están particularmente afectados por la condición cirrótica. (A) La actividad enzimática de la AChE disminuye en el plasma de las ratas LCB (círculo negro, $n=20$) respecto al grupo NL (círculo blanco, $n=16$). (B) La disminución en la actividad en el grupo LCB se atribuye a una pérdida de las formas G_4 determinadas mediante ultracentrifugación en un gradiente de sucrosa. (C) El cociente entre formas G_4/G_1+G_2 demuestra las diferencias entre grupos. $^{**}P<0,001$. Los resultados están expresados como la media \pm EEM.

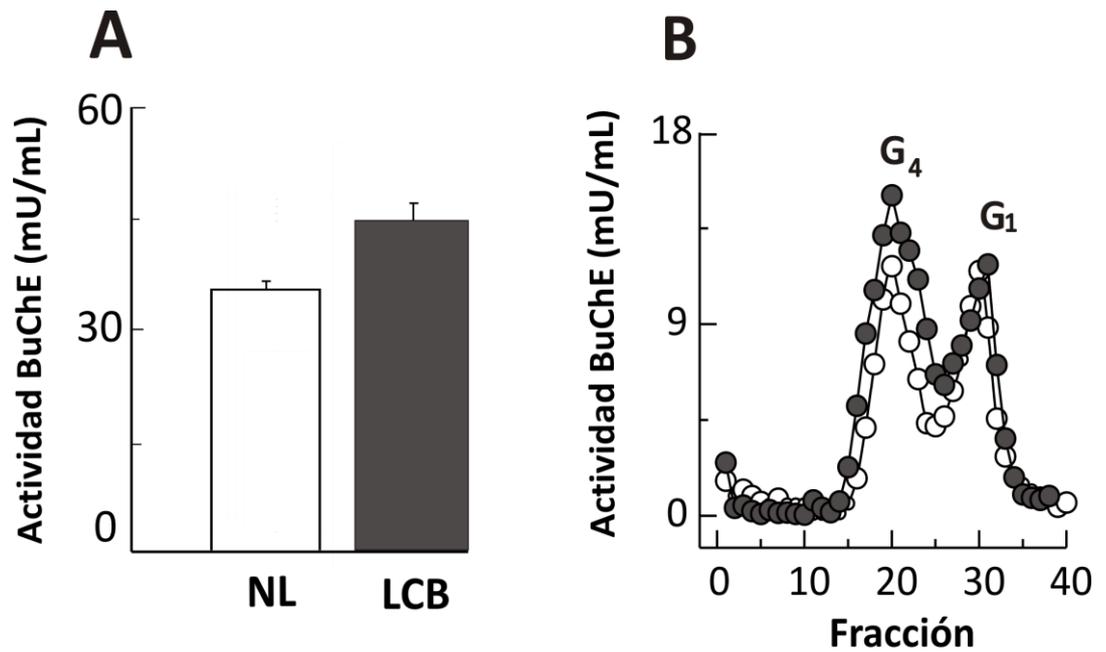


Fig. 19 La cirrosis hepática no promueve alteración en los niveles BuChE plasmática. (A) Actividad enzimática de BuChE en plasma en el grupo de NL (círculo blanco, n= 20) y el grupo de LCB (círculo negro, n =16); y (B) niveles de sus formas moleculares. No se observan diferencias significativas entre ambos grupos. Los resultados están expresados como la media \pm EEM.

Una vez caracterizado el modelo de rata LCB y demostrado su utilidad en documentar cambios en AChE, nos centramos en el desarrollo de una variante del modelo que mimetizara la EH, el modelo de ligadura del conducto biliar y dieta rica en amonio (LCB+DA), para el ulterior análisis de AChE en cerebro. Para la comparación entre modelos LCB y LCB+DA extendimos gran número de análisis de caracterización de los mismos para poder calibrar diferencias que ofrecieran ventajas en el LCB+DA.

5.2 Modelo animal de EH crónica (modelo de LCB+DA).

En el momento del sacrificio la mayoría de los animales del grupo LCB+DA, y obviamente al igual que los LCB, presentaban ascitis y signos evidentes de hipertensión portal. Para ambos grupos se puede estimar por el análisis histológico del hígado que el 70 % de los animales tenían cirrosis, y que del resto al menos el 20% mostraba fibrosis avanzada y el restante 10% fibrosis moderada (ejemplificado en la **Fig. 20**).

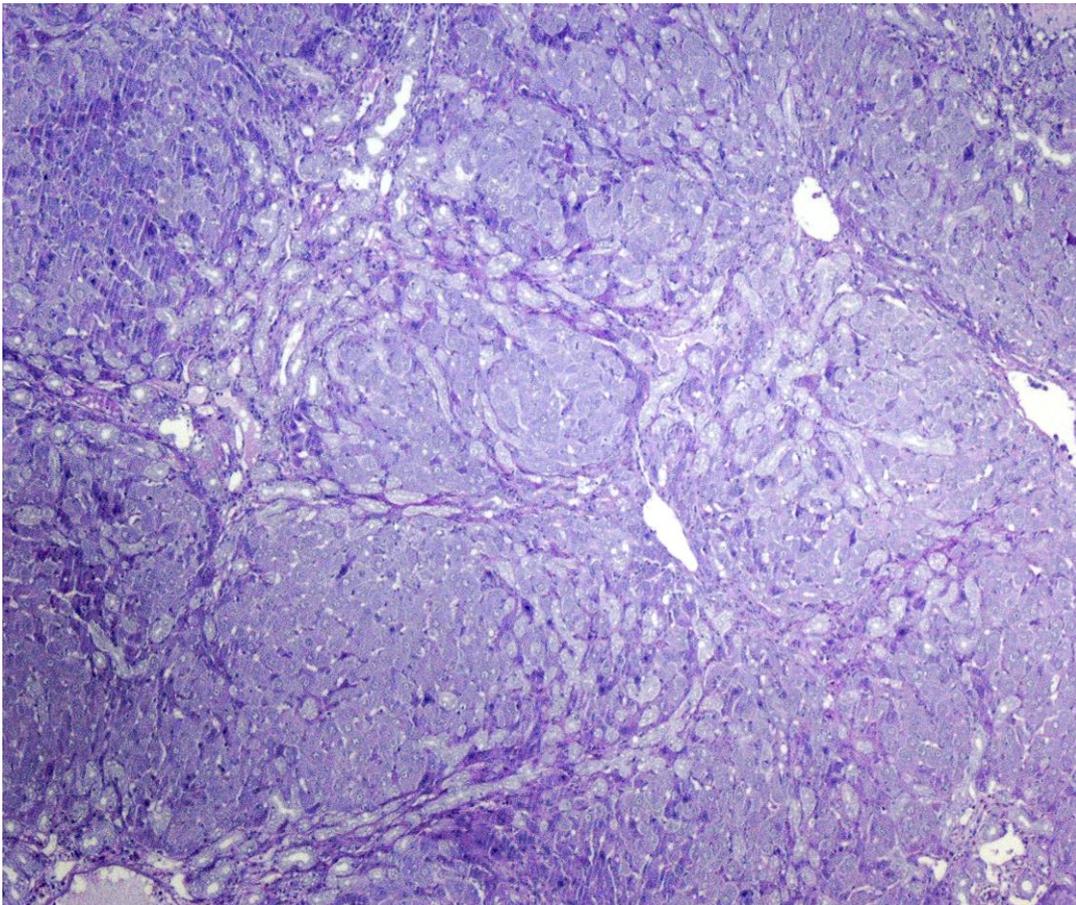


Fig. 20 Necrosis, fibrosis y nódulos de regeneración en el tejido hepático del modelo de LCB+DA. Tinción de hematoxilina -eosina (20x)

5.2.1 Caracterización bioquímica:

Los grupos de LCB+DA y de LCB presentaron niveles elevados de amonio en sangre, en comparación con el grupo de NL (**Tabla 1**), pero solo el grupo LCB+DA mostró un aumento de amonio a nivel de la corteza cerebral.

El resto de patrones bioquímicos analizados demostraron diferencias respecto al grupo de NL, reflejando la condición patológica, pero sin diferencias en la comparación entre los grupos LCB y LCB+DA.

Tabla 1: Valores bioquímicos en plasma y niveles de amonio cerebral.

	NL	LCB	LCB+DA
Amonio plasma ($\mu\text{mol/L}$)	112 \pm 30	122 \pm 70	170 \pm 39*
ALT/GPT (U/L)	34 \pm 14	66 \pm 20*	77 \pm 41*
GGT (U/L)	15 \pm 7	51 \pm 19*	60 \pm 13*
FA (U/L)	172 \pm 62	456 \pm 140*	343 \pm 198*
Proteínas Totales (g/dL)	6.3 \pm 0.4	5.9 \pm 0.3	5.1 \pm 0.5
Bilirrubina (mg/dL)	0.1 \pm 0.0	10.8 \pm 2.7*	9.1 \pm 2.4*
Glucosa (mg/dL)	207 \pm 47	160 \pm 47	135 \pm 21
Urea (mg/dL)	37 \pm 12	35 \pm 6	63 \pm 6*
Creatinina (mg/dL)	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1
Na (mEq/L)	146 \pm 5	146 \pm 4	150 \pm 8
Amonio Cerebro ($\mu\text{mol/g}$)	0.16 \pm 0.10	0.29 \pm 0.18	0.73 \pm 0.16*

Los valores mostrados son el resultado de la media \pm DE del análisis de las muestras por duplicado, para 7 ratas de cada grupo. *P<0,05 con respecto al grupo de NL. Abreviaturas: ALT o GPT (enzima alanina aminotransferasa o transaminasa glutámico-pirúvico), GGT (enzima gamma glutamil transpeptidasa), FA (enzima fosfatasa alcalina).

Para el estudio de los parámetros relacionados con la inflamación, se midieron los niveles de nitritos/nitratos en plasma, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la IL-6, todos los cuales resultaron alterados por la condición hepática, y sin reflejar cambios significativos entre los grupos LCB y LCB+DA (Fig. 21).

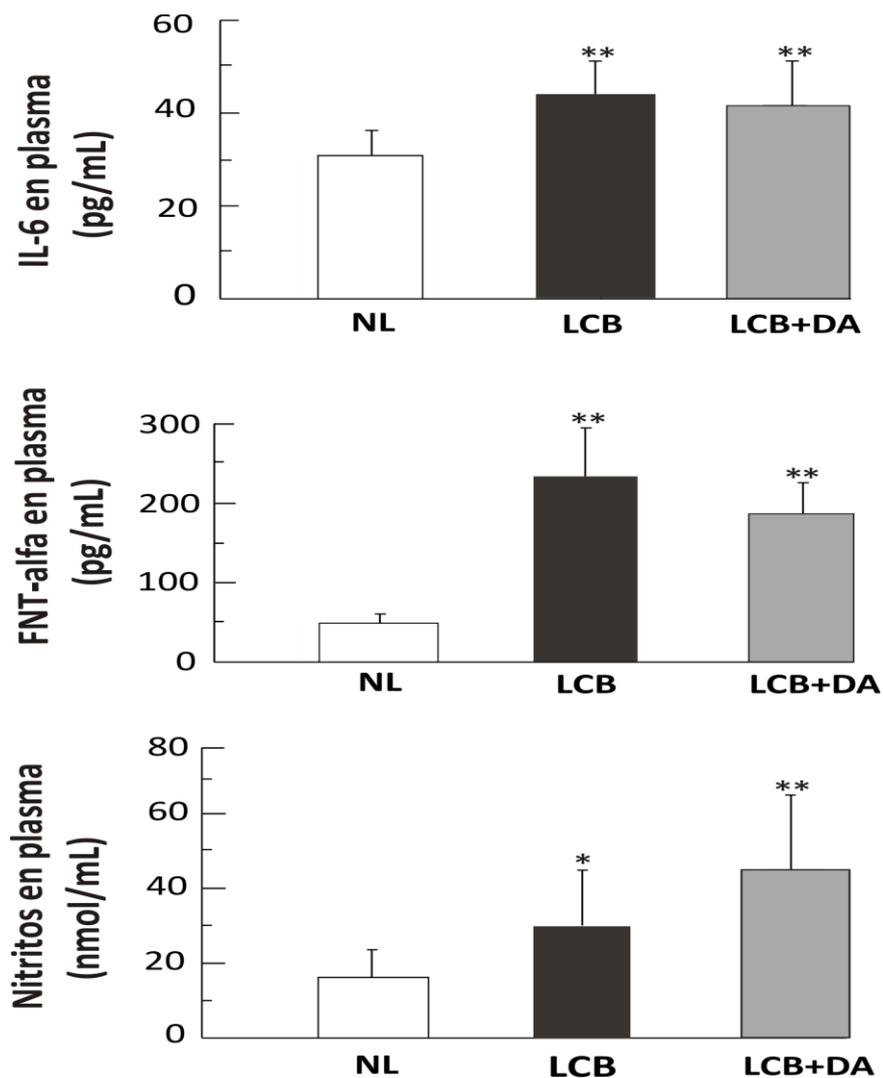


Fig. 21 Concentraciones plasmáticas de los mediadores de inflamación: IL-6, FNT-alfa y nitritos/nitratos. Los valores representados corresponden a la media \pm DE en las 7 ratas de cada grupo. *P<0,05 y **P<0,01. ANOVA, post-hoc Newman-Keuls. IL-6 (interleucina 6), FNT-alfa (factor de necrosis tumoral alfa).

5.2.2 Actividad enzimática y formas moleculares de AChE en cerebro y LCR en los modelos animales de cirrosis y de EH crónica.

Finalmente examinamos los niveles de estas enzimas en el cerebro de ratas de los diferentes modelos patológicos (**Fig. 22**). A pesar de que el modelo LCB+DA mostró una más clara afectación cerebral en la caracterización del mismo respecto al LCB, las alteraciones en la actividad de AChE extraída de corteza cerebral se manifestaron sin diferencia entre los modelos, como en este caso aumentos de alrededor de un 20% respecto al grupo control NL. Los niveles de BuChE no se vieron alterados, ni tampoco los de la ChAT, enzima encargada de la síntesis del neurotransmisor acetilcolina (**Fig. 22A-C**).

Nótese que en coincidencia con estudios previos (Huang *et al.*, 2004; Jover *et al.*, 2006), y a los valores previamente determinados en la caracterización del modelo (Tabla 1), los niveles de amonio solo aumentan significativamente en el grupo de LCB+DA, tanto en plasma como en cerebro, por lo que las ratas LCB no se manifestaba como hiperamonémicas; indicando la falta de correlación entre los niveles de amonio, factor identificado como desencadenante de cambios en muchas proteínas cerebrales en la EH, y el incremento de actividad de AChE.

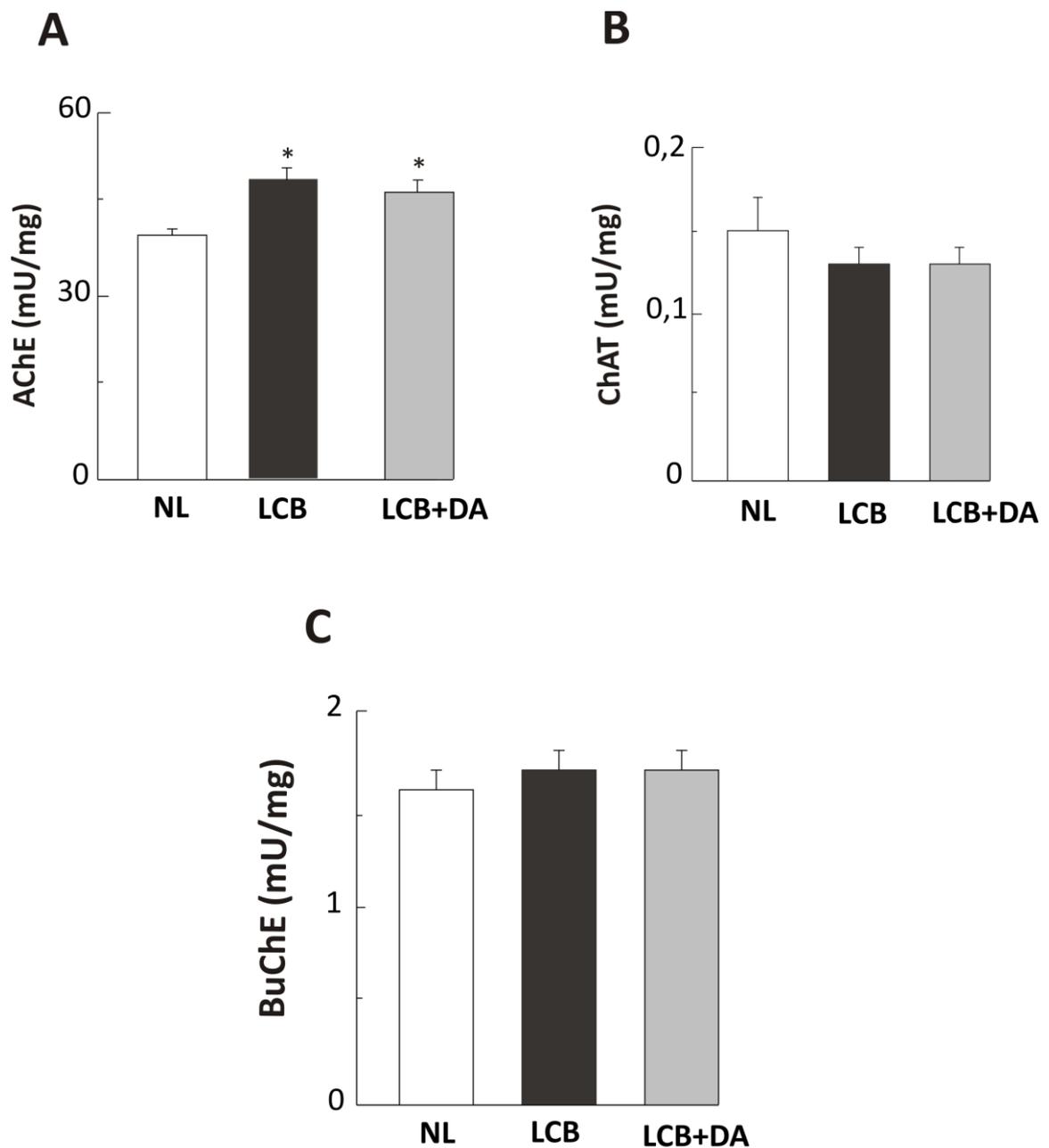


Fig. 22 Alteración de enzimas colinérgicas durante la condición cirrótica. Niveles de AChE (A), ChAT (B) y BuChE (C) en corteza cerebral de ratas NL, LCB y LCB+DA. Los valores están expresados como la media \pm EEM con una $*P < 0,05$ significativamente estadística respecto al grupo NL. No hubieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de LCB y LCB+DA ($n = 6$ para cada grupo).

Respecto a las formas moleculares de AChE, y aunque en sentido contrario a lo determinado en hígado, de nuevo la forma tetramérica de la AChE es la específicamente afectada por la condición cirrótica, con proporciones aumentadas de la misma en el grupo LCB respecto a controles (**Fig. 23**). Una tendencia similar se determinó en el grupo LCB+DA, aunque en este caso el cambio no resultó ser estadísticamente significativo (**Fig. 23**).

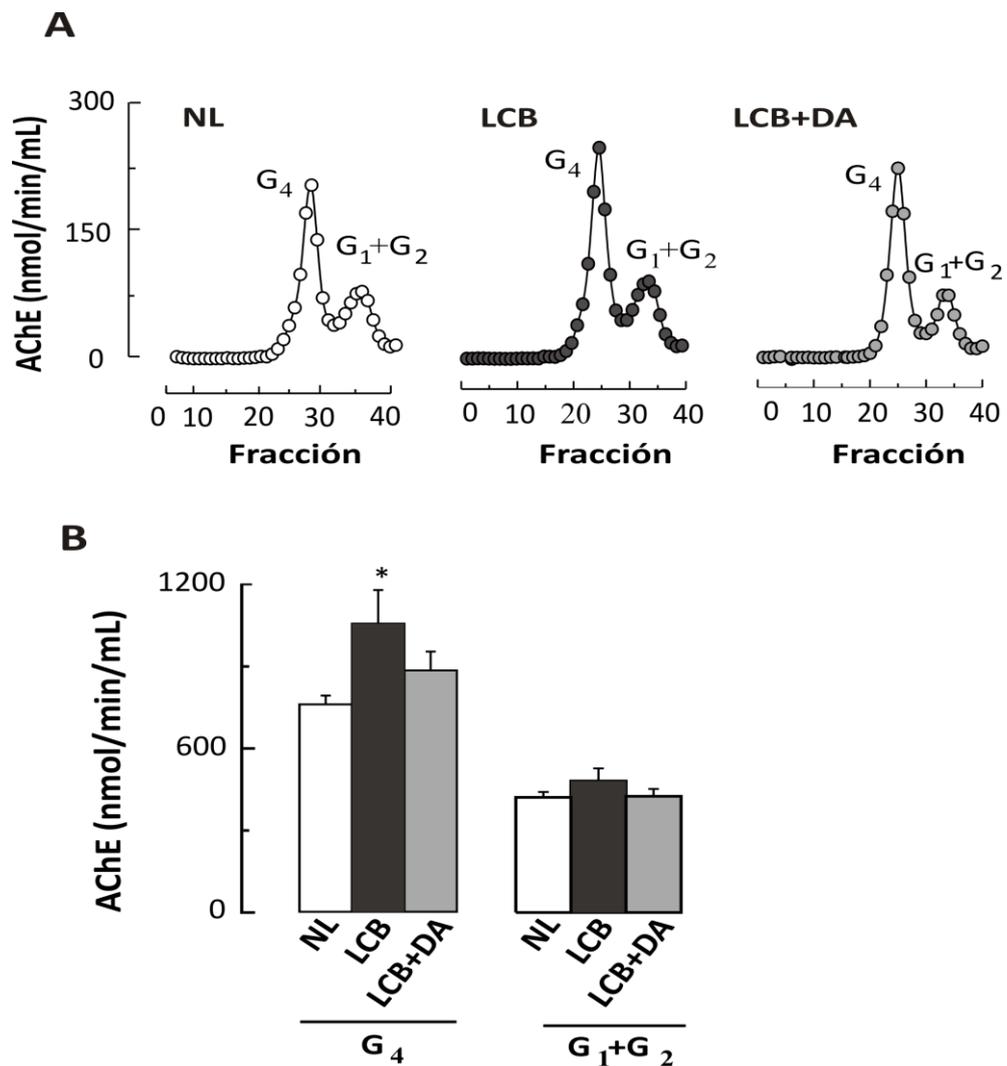


Fig. 23 Determinación de formas moleculares de AChE en modelos de ratas cirróticas. Formas moleculares de AChE (G_4 =tetrameros; G_1+G_2 = monómeros y dímeros) y la actividad molecular de cada forma de AChE en cerebro para los grupos NL, LCB y LCB+DA ($n = 6$ para cada grupo). Los valores están expresados como la media \pm EEM. * $P < 0,05$ estadísticamente significativa para el grupo NL.

Téngase en cuenta la especial relevancia de las especies G4 de AChE a nivel cerebral, puesto que son las formas propiamente colinérgicas, hidrolizando rápidamente el neurotransmisor acetilcolina y regulando temporalmente de manera precisa la excitación de la terminal post-sináptica, permitiendo una pronta nueva respuesta.

Respecto al LCR, la utilidad de la determinación de la AChE en el mismo se referiría al potencial como biomarcador, pudiéndose reflejar los cambios cerebrales en el mismo. El LCR obtenido por punción a través de la cisterna magna, al sacrificio del animal, indicó que los niveles de AChE curiosamente reflejaban el cambio detectado a nivel plasmático y no cerebral, con disminución significativa de la actividad AChE en ratas LCB comparadas con las controles (**Fig. 24**). Los niveles de BuChE no reflejaron alteración alguna. La disminución de actividad AChE en LCR, rico en especies G₄, se reflejó en disminución en los perfiles de dicha especie respecto a los detectados en animales control (**Fig. 24**). (**Fig. 24**). Los niveles de BuChE no reflejaron alteración alguna. La disminución de actividad AChE en LCR, rico en especies G₄, se reflejó en disminución en los perfiles de dicha especie respecto a los detectados en animales control (**Fig. 24**).

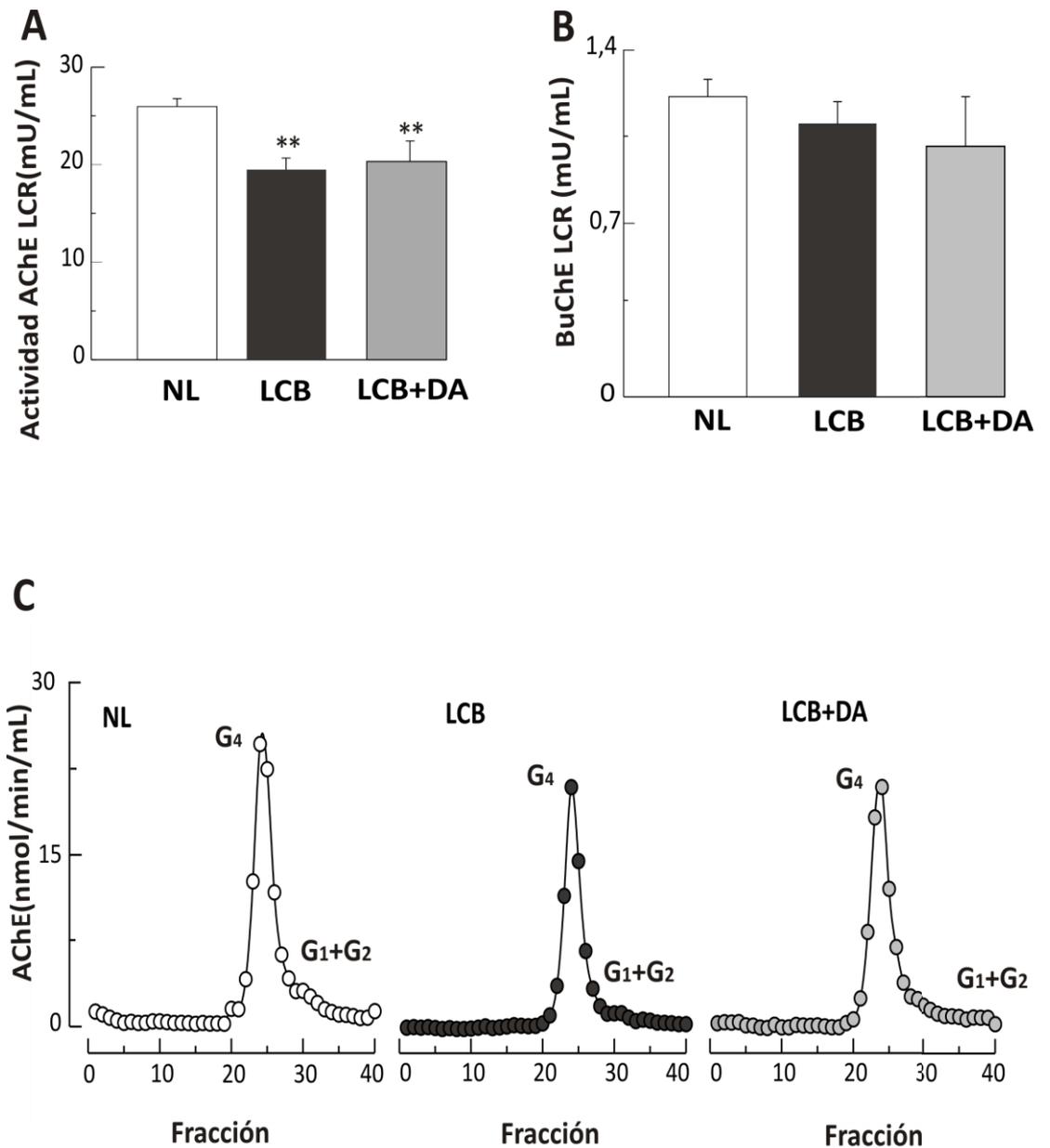


Fig. 24 Determinación de colinesterasas y sus formas moleculares en líquido cefalorraquídeo (LCR) de animales cirróticos. La actividad AChE y BuChE se determinó en los grupos de NL, LCB y LCB+DA (n=10 para cada grupo), los valores están expresados como la media \pm EEM con una **P<0,001. El cambio detectado en AChE llevó a determinar también sus formas moleculares por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa.

DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN.

6.1 Modelo experimental de EH en la rata cirrótica.

El modelo de LCB+DA reproduce una situación de cirrosis hepática a la cual se añade un factor precipitante de encefalopatía (hiperamoniemia), imitando la secuencia de hechos fisiopatológicos que sucede en los humanos, lo que representa una ventaja frente a otros modelos de EH crónica. En el momento del sacrificio los animales LCB+DA estaban ictericos, y mostraban signos macroscópicos de hipertensión portal y ascitis. Lo que es más relevante en este modelo animal, es que también reproduce alteraciones en los mediadores inflamatorios y en el metabolismo del amonio a nivel cerebral, al igual que ocurre en humanos.

El modelo de ligadura del conducto biliar se ha utilizado para el estudio de la cirrosis hepática de los humanos. Este modelo se ha realizado principalmente en ratas ya que esta especie tiene la ventaja de no tener vesícula biliar, por lo que es un animal de experimentación adecuado. Cuando este modelo se ha realizado en ratones, que sí tienen vesícula biliar, se han descrito casos de coleperitoneo por rotura de la vesícula biliar, incrementando la mortalidad en estos animales de experimentación. Este modelo animal en ratas reproduce una cirrosis biliar secundaria en un tiempo de tres semanas con elevación de las cifras de bilirrubina y alteración de las transaminasas. Asimismo la obstrucción del conducto biliar principal induce hipertensión portal, *shunt* porto-cava, translocación bacteriana y alteración del sistema inmune (Rodrigo *et al.*, 2005). Una limitación descrita en este modelo de cirrosis es que tras la ligadura del conducto biliar principal, los animales desarrollan un gran quiste en el conducto colédoco que interfiere para la medición y estudio de la hipertensión portal.

Otros modelos de cirrosis utilizados son el modelo de tetracloruro de carbono, el modelo de tioacetamida, el modelo de dimetilnitrosamina y el

modelo de déficit de colina. El modelo de cirrosis de tetracloruro de carbono, el modelo de tiacetamida y el modelo de dimetilnitrosamina, inducen una cirrosis micronodular a las doce o quince semanas tras la administración de esta sustancia hepatotóxica. Este hecho representa una desventaja frente al modelo de ligadura del conducto biliar que en tan solo tres semanas induce cirrosis objetivable en las muestras anatomopatológicas analizadas. La principal limitación del modelo de dimetilnitrosamina es el uso de esta sustancia por su alto poder carcinogénico (Jenkins *et al.*, 1985). El modelo de déficit de colina induce cirrosis de forma muy variable entre doce y veinticuatro semanas, por lo que presenta la misma desventaja que los anteriores. Una limitación del modelo de tetracloruro de carbono y del modelo de tioacetamida, es la diferente sensibilidad de las ratas a la dosis del compuesto hepatotóxico administrado (Li *et al.*, 2002), por lo que se han propuesto pautas de administración semanales adecuadas al peso del animal, y además se evita que aumente la mortalidad de los animales durante la inducción de la cirrosis.

En nuestro estudio, la mortalidad fue en promedio del 12%. En este resultado hay que destacar el proceso de la curva de aprendizaje tanto de la técnica quirúrgica como del manejo de los animales de experimentación. Previo al inicio del estudio, se realizaron intervenciones quirúrgicas para el aprendizaje de la técnica, la manipulación de los animales en el acto anestésico y el control de la supervivencia tras la ligadura del conducto biliar. Respecto a la manipulación del animal en la anestesia, la mayoría de los animales fallecidos corresponden a decesos tras la administración de la misma, hecho que prácticamente no se objetivó durante las intervenciones del estudio. Creemos que las posibles causas de estos cambios se deben a que inicialmente transcurrían de diez a quince minutos desde que pesábamos a la rata y luego la colocábamos en la mesa para la inyección intraperitoneal de ketamina. Evidentemente el animal estaba muy inquieto, lo que dificultaba la anestesia y la inyección de la dosis adecuada. Asimismo comprobamos que una vez colocado el

animal en la mesa de experimentación, si lo cubríamos con un paño, estaba más tranquilo, lo que facilitaba enormemente el acto anestésico.

Respecto a la técnica quirúrgica utilizada en el modelo de LCB podemos afirmar que se trata de: una técnica no compleja en lo que se refiere al instrumental utilizado, y no requiere de microscopio como en el caso de los modelos con anastomosis vasculares (modelo de *shunt* portocava). Además el tiempo quirúrgico es tan sólo de unos diez minutos, las complicaciones intraoperatorias son muy bajas (un caso de sangrado por desgarro del tejido pancreático), los animales no precisan de analgesia postoperatoria y no presentan infección de herida quirúrgica. Destacar respecto al tiempo quirúrgico empleado que al inicio de la curva de aprendizaje, era de treinta a cuarenta y cinco minutos, por lo que los animales precisaban de la administración de más dosis de anestésico. Una vez conocida la técnica quirúrgica, el tiempo operatorio se redujo a tan sólo diez o quince minutos. Objetivamos una supervivencia máxima de las ratas con ligadura del conducto biliar de 6 semanas, llegando a tener un peso de 550 g. Existen estudios que administran profilaxis antibiótica y vitamina K para prolongar la supervivencia de las ratas de experimentación (Abralde *et al.*, 2006). En nuestro estudio no consideramos que fuese necesario el uso de estos fármacos ya que los animales se sacrificaron a las tres semanas tras la ligadura del conducto biliar con cifras de mortalidad bajas.

Los pacientes cirróticos pueden desarrollar hipertensión portal sin niveles elevados de amonio o presencia de encefalopatía hepática. Sin embargo, en presencia de factores precipitantes como la ingesta elevada de proteínas, el sangrado, o el uso de fármacos diuréticos, estos pacientes pueden desarrollar hiperamonemia y encefalopatía hepática. El modelo de rata con ligadura del conducto biliar (LCB) no desarrolla encefalopatía hepática. Con anterioridad se han propuesto modelos de EH crónica combinando el modelo de LCB con ligadura de la vena porta (Maddison *et al.*, 1987), aunque este modelo no ha sido utilizado habitualmente en otros estudios desde su descripción, probablemente

por la mortalidad elevada en los animales de experimentación. Por lo que hasta ahora no existía un modelo satisfactorio de cirrosis con EH y alteraciones del metabolismo del amonio que reflejara la patología existente en humanos (Mullen y McCullough, 1989; Chamuleau, 1996). Otros modelos animales frecuentemente utilizados para el estudio de la EH son las ratas hiperamonémicas (Felipo *et al.*, 1998; Hermenegildo *et al.*, 2000) y las ratas con *shunt* portocava (Lee y Fisher, 1961). El primero reproduce los efectos del amonio, la principal toxina implicada en la patogénesis de la EH, y el segundo modelo parece adecuado para el estudio de la EH mínima (Chamuleau, 1996). Pero estos modelos carecen de un importante factor implicado en la génesis de la EH, como es el daño hepatocelular.

Así pues, en el diseño de este trabajo combinamos el modelo de LCB con el modelo de hiperamonemia, es decir, añadimos a un modelo de cirrosis una dieta rica en amonio como factor precipitante de encefalopatía, y así provocamos una situación de hiperamonemia. Por ello, en una fase preliminar de nuestro estudio, nos ocupamos de validar el modelo de ligadura biliar más dieta con amonio (LCB+DA) frente a no sólo ratas control (sin cirugía), sino también frente a ratas sólo con cirrosis por ligadura biliar (LCB).

En la caracterización bioquímica, tanto el modelo de LCB como de LCB+DA mostraron alteraciones similares del perfil hepático, con alteración de las enzimas de colostasis (GGT y FA) y las enzimas de citolisis (GOT y GPT). El desarrollo de cirrosis hepática se objetivó anatomopatológicamente a las tres semanas de la ligadura del conducto biliar. El análisis histológico de las muestras hepáticas evidenció que el 70% de los animales desarrollaron cirrosis, el 20% fibrosis avanzada y el 10% fibrosis moderada. Si comparamos con otros modelos animales de cirrosis, este modelo permite desarrollar un daño hepático en menor espacio de tiempo que el resto de modelos como el modelo de tetracloruro de carbono que precisa de 12 a 15 semanas para el desarrollo de cirrosis hepática (véase tabla 2).

El modelo de LCB+DA reproduce las alteraciones en el metabolismo del amonio con niveles de amonio elevados en plasma y en corteza cerebral. Respecto a los niveles de amonio, solo el modelo de LCB+DA mostró niveles elevados en cerebro, a diferencia del modelo de LCB. En otros estudios (Jover *et al.*; 2006) se ha objetivado que si se comparan modelos animales de EH, como el modelo de hiperamonemia crónica durante tres o más semanas (Felipo *et al.*, 2002), y el modelo de anastomosis portocava, también existe un aumento del amonio cerebral al igual que se objetiva en la encefalopatía hepática episódica de los humanos; pero estos modelos carecen de daño hepático.

El modelo animal usado en este estudio reproduce la alteración de los parámetros de inflamación en plasma (interleucina 6, factor de necrosis tumoral alfa y niveles de nitritos y nitratos). El grupo de LCB no presentó signos obvios de infección, fiebre, o signos de sepsis en el momento del sacrificio. Sin embargo estos animales mostraron una activación de las citoquinas proinflamatorias, similar a las encontradas en los humanos cirróticos (Genesca *et al.*, 1999; Riordan *et al.*, 2003; Tilg *et al.*, 1992). Los pacientes con cirrosis sin signos de infección activa muestran un aumento en los niveles de nitritos/nitratos que se correlacionan con la endotoxemia (Guarner *et al.*, 1993), así como con los niveles de TNF- α y IL-6 (Genesca *et al.*, 1999; Riordan *et al.*, 2003; Tilg *et al.*, 1992). Estos cambios en las citocinas proinflamatorias pueden estar presentes incluso en estadios iniciales de la enfermedad, y son consecuencia de la cirrosis hepática y el empeoramiento hemodinámico (Genesca *et al.*, 1999; Guarner *et al.*, 1993). Los pacientes cirróticos están frecuentemente en un estado inflamatorio subclínico. En ausencia de signos de infección activa es posible detectar la existencia de fragmentos de ADN bacteriano en el suero de pacientes asintomáticos. Estos fragmentos reflejan episodios repetidos de translocación bacteriana y son capaces de activar la respuesta inmune celular y la producción de óxido nítrico en los macrófagos peritoneales (Such *et al.*, 2002; Frances *et al.*, 2004). El modelo de LCB+DA muestra la posible interacción entre la inflamación y la hiperamonemia en la cirrosis hepática. La importancia de la inflamación en el

desarrollo de la EH en la cirrosis ha sido recientemente descrita (Blei, 2004; Shawcross *et al.*, 2004). Nuestro modelo podría ser útil en el estudio de cómo los mediadores de la inflamación pueden efectos sinérgicos con toxinas, como el amonio, en la patogénesis de la EH.

En otros artículos publicados por nuestro equipo de trabajo (Jover *et al.*, 2006) este modelo se caracterizó a nivel neurológico, evidenciando hallazgos típicos de la encefalopatía hepática episódica en pacientes cirróticos como la presencia de edema cerebral, astrocitos de Alzheimer tipo II y alteración en los osmolitos cerebrales, que no se objetivan en otros modelos experimentales de EH crónica (Felipo *et al.*, 2002; Pilbeam *et al.*, 1983; Cordoba *et al.*, 1996; Haussinger *et al.*, 1994, 2000; Laubenberger *et al.*, 1997; Geissler *et al.*, 1997; Shawcross *et al.*, 2004; Byrd *et al.*, 1993). También se han descrito alteraciones de la conducta en estos animales, como son el empeoramiento en la realización de los test de coordinación y actividad motora (Jover *et al.*, 2006). No obstante, queda pendiente completar la caracterización neurofisiológica del modelo LCB+DA con la realización de electroencefalogramas o potenciales evocados, o estudios de imagen como la resonancia nuclear magnética cerebral (Morgan, 1996). Esta tarea deberá ser acometida en futuros estudios.

En resumen, el modelo animal propuesto en este trabajo cuenta con varios puntos a favor. En primer lugar, es un modelo reproducible, es decir, la mayoría de los animales alcanzan el estado deseado de daño hepático e hiperamonemia, un 90% desarrollan cirrosis o fibrosis hepática avanzada. La intervención quirúrgica no es compleja. Es además un modelo animal seguro ya que el animal y el método de inducción de la enfermedad no deben suponer un riesgo para el personal de investigación. Tiene como ventaja frente a otros modelos animales de EH crónica, que produce daño hepático y alteración de los parámetros de inflamación. Por todo ello, el modelo animal que proponemos de LCB+DA ofrece la oportunidad de estudio de factores claves en la patogénesis de la EH en la cirrosis y podría ser útil en el desarrollo de un mayor conocimiento acerca de la

fisiopatología, diagnóstico y tratamiento de esta complicación tan frecuente de la cirrosis. En este sentido hemos validado el modelo en el estudio de las alteraciones que se producen en las enzimas colinesterasas y en el sistema colinérgico en la situación de cirrosis hepática y encefalopatía, como se expone más adelante.

Tabla 2: Comparación entre modelos animales de cirrosis y EH crónica, y la EH episódica en humanos.

	LCB+DA	LCB	CCl ₄	DA (1 s)	PC (4s)	EH episódica humanos
Amonio cerebro	↑	=	=/↑	=	↑	↑
Activación del sistema inflamatorio	Sí	Sí	Sí	No	No publicado	Sí ⁽²⁾
Cirrosis hepática	Sí (3s)	Sí (3s)	Sí (12s)	No	No	Sí
AChE periférica	Sí ⁽¹⁾	Sí	Sí	No	No ⁽¹⁾	Sí
AChE central	Sí ⁽¹⁾	Sí	Sí	No	No ⁽¹⁾	Sí

(1) García-Ayllón *et al.*, 2008. (2) Shawcross *et al.*, 2004. Abreviaturas: s (semana), CCl₄ (tetracloruro de carbono), PC (*shunt* portocava)

6.2 Actividades enzimáticas y formas moleculares de BuChE y AChE en hígado y plasma del modelo experimental de cirrosis en la rata mediante LCB.

Como ocurre en otros trastornos metabólicos y degenerativos del sistema nervioso central, la EH se caracteriza por la afectación de varios sistemas de neurotransmisores. Las alteraciones más significativas encontradas hasta ahora son las que afectan al sistema glutamatérgico (Felipo y Butterworth, 2002; Michalak *et al.*, 1997), cuyo deterioro está directamente ligado al exceso en el cerebro del principal tóxico involucrado en la patogénesis de la EH, el amonio. No obstante hay otros sistemas también afectados, y cuya importancia no está del todo bien establecida como son el serotoninérgico, el gabaérgico, el dopaminérgico y el sistema opioide (Butterworth, 1996; Felipo y Butterworth, 2002; Lozeva *et al.*, 2004). Sin embargo, hasta los estudios de nuestro grupo prácticamente se carecía de información sobre una la posible afectación del sistema colinérgico en la EH. Se ha documentado desde hace décadas la particular afectación del sistema colinérgico en la demencia de Alzheimer y otras demencias degenerativas, y el papel que la acetilcolina desempeña en tareas de cognición (Davies y Maloney, 1976). Pero, como se ha comentado, su potencial afectación no se ha abordado experimentalmente en la EH, y hasta el momento no existen suficientes datos que permitan descartar alteraciones a este nivel.

En este estudio hemos caracterizado una disminución de los niveles de AChE en hígado y plasma en el grupo de ratas cirróticas por LCB. Este cambio es específico para la AChE, porque la BuChE hepática, cuya actividad enzimática está disminuida en el plasma humano y se ha relacionado con enfermedad crónica hepática (Brown *et al.*, 1981), no está aparentemente afectada. Una disminución similar se observa en otros modelos experimentales de daño hepático como el modelo animal de cirrosis inducida por CCl₄ (García-Ayllón *et al.*, 2006). Las dos colinesterasas, AChE y BuChE, comparten actividad sobre sustratos como la acetilcolina, están presentes en casi todos los tejidos y con un

patrón de formas moleculares semejantes; no obstante parecen reguladas por mecanismos diferentes (Edwards y Brimijoin, 1982; Weber *et al.*, 1999). La extrapolación de los resultados obtenidos respecto a las dos colinesterasas a humanos cuenta con limitaciones que deben ser reseñadas. En humanos la abundancia de AChE y BuChE, y la distribución de sus formas moleculares, son distintas respecto a la rata. En la rata la colinesterasa más abundante en plasma e hígado es la G₄ AChE, que a su vez es la más afectada por la condición cirrótica; pero en el plasma humano prácticamente no existe esta forma, siendo la G₄ BuChE la más abundante con diferencia (García-Ayllón *et al.*, 2010), y la que disminuye en el plasma de individuos con cirrosis (García-Ayllón *et al.*, 2012). Por lo tanto, salvando la importante consideración del cambio de proteína la diferencia entre humano y rata no es tan manifiesta. Sigue siendo una incógnita el papel fisiológico de AChE y BuChE en el plasma, pero no es tan descabellado presuponer que el “cambio” de colinesterasa mayoritaria entre rata y humano sea una simple divergencia entre proteínas que pueden cumplir actividades similares, y que en la condición cirrótica lo relevante es la pérdida específica de esa forma G₄ de colinesterasa. Cual es la función de este G₄ de AChE o de BuChE y el porqué de su asociación al daño hepático son cuestiones que requieren ser descifradas.

La rata es un buen modelo animal experimental para el estudio del efecto de la enfermedad hepática en los niveles de AChE plasmática ya que en comparación con el plasma humano la actividad de colinesterasas en general, y de BuChE en particular, en la rata es mucho menor; y los cambios pueden ser evidenciados con mayor facilidad. Algunos autores han descrito previamente la distribución de las colinesterasas en el hígado de la rata (Wheeler *et al.*, 1972; Satler *et al.*, 1974; Perelman y Brandan, 1989; Berninsone *et al.*, 1989), ratón (Gómez *et al.*, 2000), conejo (Ballantyne, 1978; Jbilo *et al.*, 1994) y pollo (Smucker *et al.*, 1990). Sin embargo no se han obtenido conclusiones significativas acerca del papel fisiológico de la AChE en el hígado y si el hígado es una fuente importante de producción de AChE plasmática.

Como se ha explicitado, en humanos la cantidad de BuChE plasmática es mayor que la de AChE (Sorensen *et al.*, 1986; Atack *et al.*, 1987; Brimijoin y Hammond, 1988; García-Ayllón *et al.*, 2010, 2012) mientras que hay niveles aparentemente similares de ambas enzimas en el hígado (George y Balasubramanian, 1981; García-Ayllón *et al.*, 2012). Este estudio demuestra que la enfermedad hepática tiene un efecto en la expresión y los niveles de colinesterasas tanto en hígado como en plasma, y específicamente sobre la forma G₄ de la misma, de AChE en el caso de la rata.

Como comentábamos, el significado fisiológico de la actividad colinesterasa en el hígado y en el plasma todavía no ha sido bien dilucidado. La AChE de los hepatocitos y otras células epiteliales podría tener una función de inactivación de la acetilcolina plasmática (Gómez *et al.*, 2000). Sin embargo la AChE también podría estar implicada en algunos mecanismos de regulación intercelular e intracelular (Satler *et al.*, 1974). Pero además hay que tener en cuenta que se han atribuido otras funciones a la AChE, además de su actividad proteolítica sobre acetilcolina, funciones como la regulación del crecimiento y adhesión celular (Massoulié *et al.*, 1993; Layer, 1995; Soreq y Seidman, 2001). En este sentido, la existencia de diferentes formas moleculares de colinesterasas reflejaría esas diferentes funciones fisiológicas, con formas específicas para funciones específicas y con diferentes mecanismos de regulación. Así, en nuestro modelo encontramos una disminución particular de formas tetraméricas en el hígado, mientras que las formas G₁ y G₂ fueron levemente afectadas. Una afectación específica de una forma molecular de AChE asociada al progreso de una patología se ha descrito antes, por ejemplo en la enfermedad de Alzheimer, donde la G₄ cerebral disminuye, mientras la G₁ está preservada o incluso aumenta (Arendt *et al.*, 1992; Sáez-Valero *et al.*, 1999). La prevalencia de formas ligeras de AChE en determinadas condiciones patológicas, incluyendo la cirrosis, parece reflejar un patrón embriológico de expresión, con funciones no relacionadas con hidrólisis de acetilcolina, ya que la forma G₁ se expresa en estados embrionarios antes incluso de establecerse sistema colinérgico alguno

(Massoulié *et al.*, 1993; Layer, 1995; Soreq y Seidman, 2001; Arendt *et al.*, 1992). En este mismo sentido, la pérdida de formas oligoméricas puede reflejar la pérdida patológica del control de la diferenciación celular o un cambio en la expresión como respuesta a la agresión.

Nuestro estudio muestra también una disminución de la AChE plasmática en las ratas con LCB que se correlaciona con la pérdida de actividad observada en el hígado. Este dato proporciona una clara evidencia que una importante fracción plasmática de AChE se sintetiza en el hígado. Además la disminución de los niveles plasmáticos de AChE y los hallazgos bioquímicos como las formas moleculares pueden ser un marcador de cirrosis hepática, al menos en rata.

6.3 Actividades enzimáticas y formas moleculares de BuChE y AChE en cerebro y LCR en el modelo animal de EH en la rata cirrótica.

Este es el primer estudio que describe la alteración cerebral de la actividad de la AChE en ratas como consecuencia de un fallo hepático (cirrosis), al igual que se describe en muestras de cerebro humano de pacientes cirróticos con EH (García-Ayllon *et al.*, 2008).

En el modelo animal de LCB el aumento de la actividad AChE, y en concreto de su forma colinérgica G₄, conllevaría una disminución en los niveles del neurotransmisor acetilcolina, el cual tiene un papel fundamental en las funciones cognitivas y de la conducta (Bartus *et al.*, 1982). Nuestros datos sugieren que el desbalance de las enzimas colinérgicas, con aumento de AChE sin cambios en la enzima sintetizadora de acetilcolina, ChAT, inducida por la cirrosis hepática puede estar asociado a fallos en la regulación de funciones de aprendizaje y memoria.

La hiperamonemia está considerada como uno de los principales factores responsables de las alteraciones neurológicas de la EH (Felipo y Butterworth., 2002). Sin embargo, nuestros hallazgos sugieren que los niveles elevados de amonio no son un factor precipitante de los cambios de AChE a nivel cerebral.

No hay una correlación entre el aumento de los niveles de amonio y el aumento de la actividad de AChE a nivel cerebral en los modelos animales estudiados, asociándose el cambio al daño hepático y no al nivel de hiperamonemia. Así, las ratas con LCB mostraron el mismo grado de alteración en los niveles de AChE que el modelo de LCB+DA; mientras que sólo el modelo de LCB+DA mostró niveles elevados de amonio a nivel de corteza cerebral. Según García-Ayllon *et al.*, 2008, ni los modelos de DA y de anastomosis portocava (que presentaba unos niveles de amonio elevados a nivel cerebral) mostraron cambios en los niveles de AChE (ver Tabla 2). De igual forma, solo los animales cirróticos, independientemente del grado de hiperamonemia, presentaron un aumento en los niveles cerebrales de AChE, y al igual que los pacientes con cirrosis alcohólica (García-Ayllón *et al.*, 2008). Pero si el amonio no es el factor desencadenante de dichos cambios, falta por determinar el mismo y el mecanismo que lleva a dicha alteración.

Recientemente se ha publicado que el etanol puede causar alteraciones del sistema colinérgico (Jamal *et al.*, 2007). Además se han descrito alteraciones en las propiedades cinéticas de la AChE en el modelo de tioacetamida induciendo EH (Swapna *et al.*, 2007). Se ha observado aumento significativo de AChE después de la exposición aguda a etanol en el cerebro del pez cebra mientras que la exposición *in vitro* no muestra alteraciones en la actividad enzimática (Rico *et al.*, 2007). Existen más estudios que sugieren la existencia de otros factores precipitantes como el manganeso (Krieger *et al.*, 1995) que pueden contribuir a las alteraciones del sistema colinérgico, incluso modular la actividad de la AChE (Finkelstein *et al.*, 2007). Sigue quedando pendiente descifrar en nuestro modelo de rata que factor es el responsable primigenio de los aumentos

de AChE cerebral, y si este es el mismo de la disminución de la G₄ hepática. La alteración en ambos órganos es en dirección opuesta. No podemos descartar la posibilidad de mecanismos sistémicos de regulación donde una bajada de la enzima a nivel periférico promueva el aumento de la expresión a nivel cerebral.

La disminución de los niveles séricos de G₄ en las ratas con LCB se correlaciona con una disminución de las formas tetraméricas en el LCR. Así, el LCR refleja la condición periférica y no la central. Nuestra primera interpretación es que esta disminución podría ser indicativa y consecuencia de cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, fenómeno asociado al daño hepático. Este aspecto requiere un ulterior estudio específico. También en el terreno especulativo, podemos hipotetizar que esta bajada de actividad AChE en el LCR sería detectada de algún modo a nivel cerebral y esto provocar una respuesta central compensatoria dando como resultado un aumento de la AChE en el cerebro. De nuevo esta hipótesis requiere ser comprobada experimentalmente, pero cabe reseñar que tratamientos con inhibidores de AChE promueven un aumento en los niveles proteicos de la misma (García-Ayllón *et al.*, 2007; Silveyra *et al.*, 2012).

Hasta la publicación de nuestros estudios no se habían observado alteraciones en la actividad de AChE en cerebros humanos de pacientes cirróticos, ni en modelos experimentales de EH como el *shunt* portocava (Rao *et al.*, 1994). Las discrepancias en los estudios en humanos se pueden deber a diferencias en los protocolos de extracción o en los ensayos de medida de las muestras obtenidas. En el estudio de Rao *et al.*, 1994, tanto la extracción como el ensayo en los tampones estaban libres de detergentes. La homogenización de las muestras cerebrales sin detergentes libera actividad AChE, pero no toda, ya que gran parte de la AChE cerebral, y en concreto la de la forma G₄, se corresponde con especies anfifílicas que necesitan de incubación con detergentes, como el Triton X-100, para una extracción óptima y expresión de toda la actividad catalítica (Massoulié *et al.*, 1993; Sáez-Valero *et al.*, 1993). Por

esta razón creemos que el uso de tampones libres de detergentes en estos estudios puede haber contribuido a la obtención de discrepancias en los resultados. Según García-Ayllón *et al.*, 2008, tanto en las muestras de pacientes cirróticos como en las muestras del modelo animal de EH, el aumento de actividad de AChE se asocia con un aumento paralelo de la mayor forma molecular tetramérica y anfifílica.

La AChE tiene una amplia distribución en diferentes regiones del cerebro y se expresa de diversas formas moleculares con un patrón específico que se altera en algunos procesos patológicos (Massoulié *et al.*, 1993). Como se ha comentado con anterioridad las diferentes formas moleculares de la AChE pueden reflejar funciones fisiológicas específicas de la enzima con diferentes mecanismos de regulación. Pero es a la forma G₄ cerebral a la que se le atribuye la actividad colinérgica de hidrolizar acetilcolina en la sinapsis, por lo que los niveles elevados de G₄ en el cerebro de pacientes cirróticos pueden tener consecuencias fisiológicas directas produciendo una disminución en los niveles de acetilcolina extracelular en el cerebro, como se demostró en García-Ayllón *et al.*, 2008. No conocemos otras publicaciones más allá de la de Kabatnik *et al.*, (1999) donde se documente el uso de inhibidores de AChE para tratar parte de los déficits neurológicos presentes en la HE, pero este estudio, junto a nuestros datos, sugieren que esta es una alternativa médica que requiere ser explorada.

CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES.

1. El modelo animal de ligadura del conducto biliar y dieta rica en amonio es un modelo adecuado para el estudio de la encefalopatía hepática episódica que se produce en la cirrosis hepática de los humanos ya que reproduce una situación de cirrosis e hiperamonemia.
2. Respecto al estudio de enzimas colinesterásicas en nuestros modelos animales, la LCB promueve una disminución de la actividad enzimática de la AChE hepática y plasmática, en concreto de la forma molecular G₄.
3. La correlación entre la afectación de los niveles de AChE hepática y plasmática sugiere que al menos una parte relevante de la G₄ AChE plasmática se sintetiza en el hígado.
4. En el modelo de rata LCB los niveles de BuChE permanecen sin cambios significativos.
5. Asociado a la LCB la actividad de AChE en la corteza cerebral, y en concreto de la forma molecular G₄, aumenta significativamente, mientras que no ocurre lo mismo para la enzima sintetizadora de acetilcolina, la ChAT, lo que sugiere un desbalance colinérgico.
6. En el líquido cefalorraquídeo tanto la actividad AChE como la particular afectación de formas moleculares se correlacionan con los cambios que ocurren a nivel periférico y no con los cerebrales.

7. La falta de correlación entre el aumento de los niveles de amonio y el aumento de la AChE cerebral en los modelos animales estudiados LCB y LCB+DA sugiere que el amonio no es el factor desencadenante de los cambios en la enzima.

BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abraldes JG, García-Pagan JC. Modelos animales en el estudio de la hipertensión portal. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29(1):51-59.
- Allderdice PW, Gardner HA, Galutira D, Lockridge O, LaDu BN, McAlpine PJ. The cloned butyrylcholinesterase (BChE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics* 1991 Oct; 11(2):452-454.
- Arendt T, Bruckner MK, Lange M, Bigl V. Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development: a study of molecular forms. *Neurochem Int* 1992; 21:381-396.
- Arpagaus M, Kott M, Vatsis KP, Bartels CF, La Du BN, Lockridge O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry* 1990; 29(1):124-131.
- Atack JR, Perry EK, Bonham JR, Perry RH. Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in human plasma and cerebrospinal fluid. *J Neurochem* 1987; 48:184-185.
- Atack JR, Perry EK, Bonham JR, Perry RH, Tomlinson BE, Blessed G y Fairbairn A. Molecular forms of acetylcholinesterase in senile dementia of Alzheimer type: selective loss of the intermediate (10S) form. *Neurosci. Lett* 1983; 40:199-204.
- Atack JR, Perry EK, Bonham JR, Candy JM y Perry RH. Molecular forms of acetylcholinesterase in the aged human central nervous system. *J. Neurochem* 1986; 47:263-277.
- Azorin I, Minana MD, Felipe V, Grisolia S. A simple animal model of hyperammonemia. *Hepatology* 1989; 10(3):311-314.
- Ballantyne B. Neuronal and non neuronal choline ester hydrolases in the rabbit liver. *Cytobios* 1978; 22:75-87.
- Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 1982; 217: 408-414.
- Berninsone P, Katz E, Napp M, Azcurra J. Acetylcholinesterase and nonspecific cholinesterase activities in rat liver: subcellular localization, molecular forms, and some properties. *Biochem Cell Biol* 1989; 67:817-822.
- Blei AT. Infection, inflammation and hepatic encephalopathy, synergism redefined. *J Hepatol* 2004; 40:327-330.
- Bon S, Vigny M y Massoulié J. Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. *Proc. Natl. Sci. USA* 1979; 76:2546-2550.
- Brimijoin S, Hammond P. Butyrylcholinesterase in human brain and acetylcholinesterase in human plasma: trace enzymes measured by two-site immunoassay. *J Neurochem* 1988; 51:122-123.
- Brown SS, Kalow W, Pilz W, Whittaker M, Woronick CL. The plasma cholinesterases: a new perspective. *Adv Clin Chem* 1981; 22:1-123.
- Butterworth RF. The neurobiology of hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 1996; 16:235-244.
- Butterworth RF. Images of the brain in chronic liver failure. *J. Hepatol.* 2001; 35(5): 661-662.

Butterworth RF, Norenberg MD, Felipo V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. Review article. *Liver Int.* 2009 Jul; 29(6): 783-788.

Cavanagh JB, Kyu MH. Type II Alzheimer change experimentally produced in astrocytes in the rat. *J Neurol Sci* 1971; 12:63-75.

Chamuleau RA. Animal models of hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 1996; 16(3):265-270.

Chan CY, Huang SW, Wang TF, Lu RH, Lee FY, Chang FY, Chu CJ, Chen YC, Chan CC, Huang HC, Lee SD. Lack of detrimental effects of nitric oxide inhibition in bile duct-ligated rats with hepatic encephalopathy. *Eur. J. Clin. Invest* 2004; 34(2):122-128.

Chatonnet A, Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J* 1989; 260:625-634.

Clària J, Jiménez W. Experimental models of cirrhosis and ascites. In: Ginès P, Arroyo V, Rodés J, Schrier RW, eds. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease*, 2nd ed. Malden, MA Blackwell Science 2005:215-226.

Conjeevaram HS, Mullen KD, May EJ, McCullough AJ. Gender-dependent reduction of spontaneous motor activity and growth in rats subjected to portacaval shunt. *Hepatology* 1994; 19 (2):381-388.

Corbalan R, Chatauret N, Behrends S, Butterworth RF, Felipo V. Region selective alterations of soluble guanylate cyclase content and modulation in brain of cirrhotic patients. *Hepatology* 2002; 36(5):115-116.

Cordoba J, Gottstein J, Blei AT. Glutamine, myo-inositol, and organic brain osmolytes after portocaval anastomosis in the rat: Implications for ammonia-induced brain edema. *Hepatology* 1996; 24 (4):919-923.

Coy DL, Srivastava A, Gottstein J, Butterworth RF, Blei AT. Postoperative course after portacaval anastomosis in rats is determined by the portacaval pressure gradient. *Am. J. Physiol* 1991; 261(6):1072-1078.

Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 1976; 2: 1403.

Dikshit BB. Action of acetylcholine on the brain and its occurrence therein. *J Physiol.* 1934 Feb 28; 80 (4): 409-21.

Dixit V, Chang TMS. Brain edema and the blood brain barrier in galactosamine-induced fulminant hepatic failure rats. *ASAIO Trans* 1990; 36:21-27.

Dunn CW, Horton JW, Megison SM, Vuitch MF. Contribution of portal systemic shunt to Kupffer cell dysfunction in obstructive jaundice. *J. Surg. Res* 1991; 50(3):234-239.
Edwards JA, Brimijoin S. Divergent regulation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in tissues of the rat. *J Neurochem* 1982; 38:1393 -1403.

- Ehrlich G, Viegas-Pequignot E, Ginzberg D, Sindel L, Soreq H, Zakut H. Mapping the human acetylcholinesterase gene to chromosome 7q22 by fluorescent in situ hybridization coupled with selective PCR amplification from a somatic hybrid cell panel and chromosome-sorted DNA. *Genomics* 1992; 13(4):1192-1197.
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res* 2000; 25(9):1439-1451.
- Felipo V, Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. *Prog. Neurobiol* 2002; 67(4):259-279.
- Felipo V, Hermenegildo C, Montoliu C, Llansola M, Minana MD. Neurotoxicity of ammonia and glutamate: molecular mechanisms and prevention. *Neurotoxicology* 1998; 19:675-681.
- Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy-Definition, nomenclature, diagnosis and quantification. Final report of the Working Party at the 11th World Congresses of Gastroenterology. Vienna, 1998. *Hepatology* 2002; 35(3):716-721.
- Ferenci P, Pappas SC, Jones EA. L-Leucine prevents ammonia-induced changes in glutamate receptors in the brain and in visual evoked potentials (abstract). *Hepatology* 1982; 2:708.
- Finkelstein Y, Milatovic D, Aschner M. Modulation of cholinergic systems by manganese. *Neurotoxicology* 2007; 28:1003-1014.
- Fishman EB, Siek GC, McCallun RD, Bird ED, Volicer L, Marquis JK. Distribution of the molecular forms of acetylcholinesterase in human brain: alterations in dementia of the Alzheimer's type. *Ann. Neurol* 1986; 19:246-252.
- Francavilla A, Makowka L, Polimeno L, et al. A dog model for acetaminophen-induced fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989; 96:470-478.
- Frances R, Muñoz C, Zapater P, Uceda F, Gascon I, Pascual S, et al. Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut* 2004; 53:860-864.
- García-Ayllón MS, Silveyra MX, Candela A, Compañ A, Clària J, Jover R, Pérez-Mateo M, Felipo V, Martínez S, Galcerán J, Sáez-Valero J. Changes in Liver and Plasma Acetylcholinesterase in Rats With Cirrhosis Induced by Bile Duct Ligation. *Hepatology* 2006; 43(3):444-453.
- García-Ayllón MS, Caulí O, Silveyra M, Rodrigo R, Candela A, Compañ A, Jover R, Pérez-Mateo M, et al. Brain cholinergic impairment in liver failure. *Brain* 2008; 1:1-11.
- García-Ayllón MS, Gómez JL, Vidal CJ. Amphiphilic properties of acetylcholinesterase monomers in mouse plasma. *Neurosci Lett* 1999; 265(3):211-214.
- García-Ayllón MS, Silveyra MX, Andreasen N, Brimijoin S, Blennow K, Sáez-Valero J. Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase changes after treatment with donepezil in patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2007 Jun; 101(6):1701-1711.
- García-Ayllón MS, Riba-Llena I, Serra-Basante C, Alom J, Boopathy R, Sáez-Valero J. Altered levels of acetylcholinesterase in Alzheimer plasma. *PLoS One*. 2010 Jan 14;5(1):e8701.
- García-Ayllón MS, Small DH, Avila J, Sáez-Valero J. Revisiting the Role of Acetylcholinesterase in Alzheimer's Disease: Cross-Talk with P-tau and B-Amyloid. *Front Mol Neurosci* 2011; 4:22.

García-Ayllón MS, Millán C, Serra-Basante C, Bataller R, Sáez-Valero J. Readthrough acetylcholinesterase is increased in human liver cirrhosis. *PLoS One*.2012;7(9):e44598.

Gaughan G, Park H, Priddle J, Craig I, Craig S. Refinement of the localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. *Genomics* 1991; 11(2):455-458.

Geissler A, Lock G, Frund R, Held P, Hollerbach S, Andus T, *et al.* Cerebral abnormalities in patients with cirrhosis detected by proton magnetic resonance spectroscopy and magnetic resonance imaging. *Hepatology* 1997; 25:48-54.

Genesca J, Gonzalez A, Segura R, Catalan R, Marti R, Varela E, *et al.* Interleukin-6, nitric oxide, and the clinical and hemodynamic alterations of patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:169-177.

George ST, Balasubramanian AS. The aryl acylamidases and their relation-ship to cholinesterases in human serum, erythrocyte and liver. *Eur J Biochem* 1981; 121:177-186.

Getman DK, Eubanks JH, Camp S, Evans GA, Taylor P. The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *Am J Hum Genet* 1992; 51(1):170-177.

Gómez JL, García-Ayllon MS, Campoy FJ, Vidal CJ. Muscular dystrophy alters the processing of light acetylcholinesterase but not butyrylcholinesterase forms in liver of Lama2 (dy) mice. *J Neurosci Res* 2000; 62:134-145.

Grassi J, Vigny M y Massoulié. Molecular forms of acetilcholinesterase in bovine caudate nucleus and superior cervical ganglion: solubility properties and hydrophobic character. *J Neurochem* 1982; 38:457-469.

Green SJ, Nacy CA, Meltzer MS. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. *J Leukoc Biol* 1991; 50: 93-103.

Greve JW, Gouma DJ, Soeters PB, Buurman WA. Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: A study with germ-free rats. *Gastroenterology* 1990; 98(2):478-485.

Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bullbena O, Novella MT, Balanzo J, *et al.* Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993; 18:1139-1143.

Hajos F, Kalman M. Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain.II. Mesencephalon, rhombencephalon and spinal cord. *Exp Brain Res* 1989; 78:164-173.

Haussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom DS. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol* 2000; 32:1035-1038.

Haussinger D, Laubenberger J, vom DS, Ernst T, Bayer S, Langer M, *et al.* Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myoinositol in hypo-osmolarity and hepatic

encephalopathy. *Gastroenterology* 1994; 107:1475-1480.

Hawkins RD. NO honey, I don't remember. *Neuron* 1996; 16 (3):465-467.

Hazell AS, Butterworth RF. Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med* 1999; 222(2):99-112.

Hermegildo C, Montoliu C, Llansola M, Muñoz MD, Gaztelu JM, Minana MD, Felipo V. Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo. *Eur. J. Neurosci* 1998; 10(10):3201-3209.

Hermenegildo C, Monfort P, Felipo V. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology* 2000; 31:709-715.

Hernández-Muñoz R, Az-Muñoz M, Suarez-Cuenca JA, Trejo-Solis C, Lopez V, Sanchez-Sevilla L, *et al.* Adenosine reverses a preestablished CCl₄-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology* 2001; 34:677-687.

Huang LT, Hsieh CS, Chou MH, Chuang JH, Liou CW, Tiao MM, Lai MC. Obstructive jaundice in rats: Cause of spatial memory deficits with recovery after biliary decompression. *World J. Surg.* 2004; 28(3):283-287.

Jamal M, Ameno K, Ameno S, Morishita J, Wang W, Kumihashi M, *et al.* Changes in cholinergic function in the frontal cortex and hippocampus of rat exposed to ethanol and acetaldehyde. *Neuroscience* 2007; 144:232-238.

Jbilo O, L'Hernite Y, Talesa V, Tourant JP, Chatonnet A. Acetylcholinesterase and butirilcholinesterase expression in adult rabbit tissues and during development. *Eur J Biochem* 1994; 225:115-124.

Jenkins SA, Grandison A, Baxter JN, Day DW, Taylor I, Shields R. A dimethylnitrosamine-induced model of cirrhosis and portal hypertension in the rat. *J Hepatol* 1985; 1:489-499.

Jimenez W, Claria J, Arroyo V, Rodes J. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1992; 7(90):90-97.

Jiménez W. Cirrosis hepática experimental producida por tetracoloruro de carbono: técnicas utilizadas y características histológicas, hemodinámicas y hormonales. *Gastroenterol Hepatol* 1988; 11:531-538.

Jover R, Rodrigo R, Felipo V, Insausti R, Sáez-Valero J, García-Ayllón MS, *et al.* Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: a model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43:1257-1266.

Jover Rodrigo, de Madaria Enrique, Felipo Vicente, Rodrigo Regina, Candela Asunción, Compañ Antonio. Animal Models in the Study of Episodic Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis. *Metabolic Brain Disease* 2005; 20(4):399-408.

Kabatnik M, Heist M, Beiderlinden K, Peters J. Hepatic encephalopathy, a physostigmine-reactive central anticholinergic syndrome?. *Eur J Anaesthesiol* 1999; 16:140-142.

Kalman M, Hajos F. Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. I. Forebrain. *Exp Brain Res* 1989; 78:147-163.

Kamada Y, Tamura S, Kiso S, Matsumoto H, Saji Y, Yoshida Y, *et al.* Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice adiponectin. *Gastroenterology* 2003; 125:796-807.

Katz B. Nerve, muscle and synapse 1966.

Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: A new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br. J. Exp. Pathol* 1984; 65(3):305-311.

Krieger D, Krieger S, Jansen O, Gass P, Theilmann L, Lichtnecker H. Manganese and chronic hepatic encephalopathy. *Lancet* 1995; 346:270-274.

Laubenberger J, Haussinger D, Bayer S, Guffler H, Hennig J, Langer M. Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in symptomatic and asymptomatic patients with liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1997; 112.

Layer PG. Nonclassical roles of cholinesterases in the embryonic brain and possible links to Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1995; 9:29-36.

Lee SH, Fisher B. Portocaval shunt in the rat. *Surgery* 1961; 50:668-672.

Lewis PR y Shute CCD. The cholinergic limbic system: proyections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and the supraoptic crest. *Brain* 1967; 90:541-542.

Lewis PR y Shute CCD. The distribution of cholinesterase in cholinergic neurons demonstrated with the electron microscope. *J. Cell Sci* 1966; 1:381-390.

Li X, Benjamin IS, Alexander B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *J Hepatol* 2002; 36:488-493.

Lleó A, Greenberg SM, Growdon JH. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 2006; 57:513-533.

Lozeva V, Montgomery JA, Tuomisto L, Rocheleau B, Pannunzio M, Huet PM, *et al.* Increased brain serotonin turnover correlates with the degree of shunting and hyperammonemia in rats following variable portal vein stenosis. *J Hepatol* 2004; 40:742-748.

Maddison JE, Dodd PR, Morrison M, Johnston GA, Farrell GC. Plasma GABA, GABA-like activity and the brain GABA-benzodiazepine receptor complex in rats with chronic hepatic encephalopathy. *Hepatology* 1987; 7(4):621-8.

Massoulié J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. Review. *Neurosignals* 2002; 11(3):130-43.

Massoulié J, Sussman J, Bon S, Silman I. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Prog Brain Res* 1993; 98:13-146.

Michalak A, Knecht K, Butterworth RF. Hepatic encephalopathy in acute liver failure: Role of the glutamate system. *Adv. Exp. Med. Biol* 1997; 420:35-43.

Morgan MY. Noninvasive neuroinvestigation in liver disease. *Semin Liver Dis* 1996; 16:293-314.

Mullen KD, McCullough AJ. Problems with animal models of chronic liver disease: suggestions for improvement in standardization. *Hepatology* 1989; 9(3): 500-503.

Mullen KD, Schafer DF, Cuchi P, *et al.* Evaluation of the suitability of galactosamine-induced fulminant hepatic failure as a model of hepatic encephalopathy in the rat and the rabbit. In: Soeters PB, Wilson JHP, Meijer AJ, Holm E, eds. *Advances in Ammonia Metabolism and Hepatic Encephalopathy*. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier, 1988; 205-211.

Muñoz-Torrero D. Acetylcholinesterase inhibitors as disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. *Curr Med Chem*.2008; 15(24):2433-2455.

Nachmansohn D y Neumann E. *Chemical and molecular basis of nerve activity* 1975.

Norenberg MD. The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol* 1987; 6:13-33.

Norenberg MD. Astrocytic-ammonia interactions in hepatic encephalopathy. *Semin.Liver Dis* 1996; 16(3):245-253.

Perelman A, Abeijon C, Hirschberg CB, Inestrosa NC, Brandan E. Differential association and distribution of acetyl- and butyrylcholinesterases within rat liver subcellular organelles. *J Biol Chem* 1990; 265:214-220.

Perelman A, Brandan E. Different membrane-bound forms of acetylcholinesterase are present at the cell surface of hepatocytes. *Eur J Biochem* 1989; 182:203-207.

Pilbeam CM, Andersathal PS. The brain in experimental portal-systemic encephalopathy.II.Water and electrolyte changes. *J Pathol* 1983; 140:347-355.

Pilbeam CM, Anderson RM, Bhathal PS. The brain in experimental portal-systemic encephalopathy: Water and electrolyte changes. *J. Pathol* 1983; 140(4):347-355.

Potvin M, Morrison H, Finlayson E, *et al.* Cerebral abnormalities in hepatectomized rats with acute hepatic coma. *Lab Invest* 1984; 50:560-564.

Prior RL, Visek WJ. Effects of urea hydrolysis on tissue metabolite concentrations in rats. *Am. J. Physiol* 1972; 223(5):1143-1149.

Rao VL, Therrien G, Butterworth RF. Choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities are unchanged in brain in human and experimental portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 1994; 9:401-407.

Rico EP, Rosemberg DB, Días RD, Bogo MR, Bonan CD. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicol Lett* 2007; 174:25-30.

Riordan SM, Skinner N, Nagree A, McCallum H, Mclver CJ, Kurtovic J, *et al.* Peripheral blood mononuclear cell expression of toll-like receptors and relation to cytokine levels in cirrhosis. *Hepatology* 2003; 37:1154-1164.

Rodrigo R, Jover R, Candela A, Compañ A, Sáez-Valero J, Erceg S, Felipe V. Bile duct ligation plus hyperammonemia in rats reproduces the alterations in the modulation of soluble

guanylate cyclase by nitric oxide in brain of cirrhotic patients. *Neuroscience* 2005; 130(2):435-443.

Roughneen PT, Gouma DJ, Kulkarni AD, Fanslow WF, Rowlands BJ. Impaired specific cell-mediated immunity in experimental biliary obstruction and its reversibility by internal biliary drainage. *J. Surg. Res* 1986; 41(2):113-125.

Sáez-Valero J, Barquero MS, Marcos A, McLean CA, Small DH. Altered glycosylation of acetylcholinesterase in lumbar cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 69(5):664-667.

Sáez-Valero J, Sberna G, McLean CA, Masters CL, Small DH. Glycosylation of acetylcholinesterase as diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Lancet* 1997; 27(350):908-929.

Sáez-Valero J, Sberna G, McLean CA, Small DH. Molecular isoform distribution and glycosylation of acetylcholinesterase are altered in brain and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1999; 72(4):1600-1608.

Sáez-Valero J, Tornel P.L, Muñoz-Delgado E y Vidal C.J. Amphiphilic and hydrophilic forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in human brain. *J. Neurosci. Res* 1993; 35:678-689.

Satler JJ, Pedran S, Brzin M. The activity and citochemical localization of acetylcholinesterase and butirilcholinesterase in the rat liver. *Histochemistry* 1974; 39:65-70.

Sberna G, Sáez-Valero J, Li QX, Czech C, Beyreuther K, Masters CL, McLean CA, Small DH. Acetylcholinesterase is increased in the brains of transgenic mice expressing the C-terminal fragment (CT100) of the beta-amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1998; 71(2): 723-731.

Shawcross DL, Davies NA, Williams R, Jalan R. Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J Hepatol* 2004; 40:247-254.

Shute CC, Lewis PR. The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections. *Brain* 1967 Sept; 90(3):497-520.

Silver A. Cholinesterase of central nervous system with special reference to the cerebellum. *Int. Rev. Neurobiol* 1967; 10:57-109.

Silveyra MX, García-Ayllón MS, Serra-Basante C, Mazzoni V, García-Gutierrez MS, Manzanares J, Culvenor JG, Sáez-Valero. Changes in acetylcholinesterase expression are associated with altered presenilin-1 levels. *Neurobiol Aging*.2012 Mar;33(3):627.

Skau KA. Acetylcholinesterase molecular forms in serum and erythrocytes of laboratory animals. *Comp Biochem Physiol C* 1985; 80(1): 207-210.

Small DH, Michaelson S, Sberna G. Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 1996 May-Jun; 28(5-6):453-483.

Smucker SJ, Wilson BW. Multiple molecular forms and lectin interactions of organophosphate-sensitive plasma and liver esterases during development of the chick. *Biochem Pharmacol*

1990; 40:1907-1913.

Sobel RA, DeArmond SJ, Forno LS, Eng LF. Glial fibrillary acidic protein in hepatic encephalopathy. An immunohistochemical study. *J.Neuropathol.Exp.Neurol* 1981 Nov; 40(6):625-632.

Sorensen K, Brodbeck U, Rasmussen AG, Norgaard-Pedersen B. Normal human serum contains two forms of acetylcholinesterase. *Clin Chim Acta* 1986; 158:1-6.

Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2(4):294-302.

Steindl PE, Gottstein J, Blei AT. Disruption of circadian locomotor activity in rats after portacaval anastomosis is not gender dependent. *Hepatology* 1995; 22(6):1763-1768.

Such J, Frances R, Muñoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A, et al. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* 2002; 36:135-141.

Swapna I, SathyaSaikumar KV, Murthy CHR, Gupta AD, Senthilkumaran B. Alterations in kinetic and thermotropic properties of cerebral membrane-bound acetylcholinesterase during thioacetamide-induced hepatic encephalopathy: correlation with membrane lipid changes. *Brain Res* 2007; 153:188-195.

Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nolchen B, Judmaier G, et al. Serum levels of cytokines in chronic liver disease. *Gastroenterology* 1992; 103:264-274.

Tornel PL y Vidal CJ. CSF acetyl and butyrylcholinesterase activities in children with bacterial meningitis. *Lancet* 1991; 337:440.

Tornel PL, Sáez-Valero J y Vidal CJ. Ricinus communis agglutinin I reacting and non-reacting butyrylcholinesterase in human cerebrospinal fluid. *Neurosci. Lett* 1992; 145:59-62.

Traber P, Dal Canto M, Ganger D, Blei AT. Effect of body temperatura on brain edema and encephalopathy in the rat alter hepatic devascularization. *Gastroenterology* 1989; 96:885-891.

Tsakamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin Liver Dis* 1990; 10:56-65.

Vidal CJ. Glycosylation of cholinesterases and its alteration in some pathological states. *Recent Res. Devel. Neurochem* 1996; 1:37-54.

Weber U, Brank M, Grubic Z. Glucocorticoids differentially control synthesis of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in rat liver and brain. *Chem Biol Interact* 1999; 119(120):341-347.

Weisdorf SA, Freese DK, Radmer WJ, Dehner LP, Cerra FB. Plasma amino acids in long-term models for obstructive versus toxic liver injury in developing rats. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr* 1990; 108(3):371-379.

Wheeler GE, Coleman R, Finean JB. Cholinesterase activities in subcellular fractions of rat liver: association of acetylcholinesterase with the surface membrane and other properties of the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1972; 255:917-930.

Younkin SG, Goodridge B, Katz J, Lockett G, Natziger D, Usiak MF, Younkin L. Molecular forms of acetylcholinesterases in Alzheimer's disease. Federation proceedings 1986; 45(13): 2982-2988.

Zimmerman C, Ferenci P, Pifl C, *et al.* Hepatic encephalopathy in thioacetamide- induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission. Hepatology 1989; 9:594-601.