



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Programa de doctorado en Medicina
Departamento de Medicina
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Barcelona

TESIS DOCTORAL

**NUEVOS MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE
MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS EN ENFERMEDAD HEPÁTICA
CRÓNICA**

Tesis para optar al grado de doctor de

Teresa García Lezana

Directores de la Tesis

Salvador Augustin

Laia Chavarria

Joan Genescà

Laboratorio de Enfermedades Hepáticas
Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR)

Barcelona 2017

ÍNDICE

ABREVIACIONES.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. ENFERMEDADES HEPÁTICAS CRÓNICAS.....	19
1.1.1. <i>Esteatohepatitis no alcohólica.....</i>	<i>19</i>
1.1.1.1. Definición y fisiopatología.....	19
1.1.1.2. Factores que influyen el desarrollo de NASH	21
1.1.1.2.1. Resistencia a la insulina.....	21
1.1.1.2.2. Lipotoxicidad.....	21
1.1.1.2.3. Microbiota intestinal.....	23
1.2. CIRROSIS E HIPERTENSIÓN PORTAL	23
1.2.1. <i>Hipertensión portal: definición y fisiopatología</i>	<i>23</i>
1.2.2. <i>Factores que influyen el desarrollo de hipertensión portal.....</i>	<i>25</i>
1.2.2.1. Aumento de la resistencia vascular al flujo portal.....	25
1.2.2.1.1. Microcirculación hepática y disfunción endotelial	26
1.2.2.2. Otros factores.....	28
1.3. COMPLICACIONES DE LA CIRROSIS	28
1.3.1. <i>Encefalopatía hepática</i>	<i>29</i>
1.3.1.1. Definición y fisiopatología.....	29
1.3.1.1.1. Metabolismo del amoníaco.....	30
1.3.1.1.2. Inflamación.....	32
1.3.1.2. Clasificación de la encefalopatía hepática	33
1.3.1.3. Alteraciones neurológicas y motoras	35
1.4. PRINCIPALES MODELOS ANIMALES ACTUALES DE NASH Y HE	35
1.4.1. <i>Modelos animales de NASH.....</i>	<i>35</i>
1.4.2. <i>Modelos animales de encefalopatía hepática</i>	<i>37</i>
1.4.2.1. Modelos de fallo hepático agudo	37
1.4.2.2. Modelos de fallo hepático crónico	38
2. OBJETIVO	41
3. ESTUDIO I.....	45
3.1. CONTEXTO	47

3.2.	HIPÓTESIS.....	47
3.3.	OBJETIVOS	48
3.4.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	48
3.5.	RESULTADOS.....	51
4.	ESTUDIO II	69
4.1.	CONTEXTO	71
4.2.	HIPÓTESIS.....	72
4.3.	OBJETIVOS	72
4.4.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	73
4.5.	RESULTADOS	74
5.	DISCUSIÓN	87
6.	CONCLUSIONES.....	101
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	105
7.1.	ESTUDIO I:.....	107
7.1.1.	<i>Intervención dietética.....</i>	<i>107</i>
7.1.2.	<i>Trasplante de microbiota intestinal.....</i>	<i>108</i>
7.1.3.	<i>Análisis de la microbiota</i>	<i>109</i>
7.1.4.	<i>Estudios hemodinámicos.....</i>	<i>111</i>
7.1.5.	<i>Análisis bioquímico de muestras de sangre</i>	<i>111</i>
7.1.6.	<i>Análisis histológico de NASH y fibrosis</i>	<i>112</i>
7.1.7.	<i>Extracción proteica y Western blot.....</i>	<i>113</i>
7.1.8.	<i>Extracción de RNA y PCR a tiempo real.....</i>	<i>115</i>
7.1.9.	<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>116</i>
7.2.	ESTUDIO II:	117
7.2.1.	<i>Anastomosis portocava, cirugía sham e infusiones de amonio y/o LPS</i>	<i>117</i>

7.2.2. Cuantificación de los niveles de amonio y/o citoquinas en plasma.....	118
7.2.3. Examen neurológico.....	119
7.2.3.1. Examen de reflejos.....	119
7.2.3.2. Examen de memoria	119
7.2.4. Morfología cuantitativa.....	120
7.2.4.1. Selección de cortes para morfología cuantitativa	120
7.2.4.2. Inmunohistoquímica (IHQ) y tinción Nissl	121
7.2.4.3. Estereología sustancia negra pars compacta y cerebelo.....	123
7.2.4.4. Análisis estriado	124
7.2.4.5. Análisis de microglía, astrocitos y glía de Bergman	124
7.2.5. Microarray.....	124
7.2.6. Western-blot.....	126
7.2.7. Análisis estadístico.....	127
8. BIBLIOGRAFÍA.....	129
ANEXO	143
AGRADECIMIENTOS.....	147

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1</i>	57
<i>Tabla 2</i>	58
<i>Tabla 3</i>	59
<i>Tabla 4</i>	80
<i>Tabla 5</i>	80
<i>Tabla 6</i>	115
<i>Tabla 7</i>	116
<i>Tabla 8</i>	122
<i>Tabla 9</i>	126

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1</i>	20
<i>Figura 2</i>	22
<i>Figura 3</i>	24
<i>Figura 4</i>	26
<i>Figura 5</i>	31
<i>Figura 6</i>	34
<i>Figura 7</i>	34
<i>Figura 8</i>	49
<i>Figura 9</i>	61
<i>Figura 10</i>	62
<i>Figura 11</i>	63
<i>Figura 12</i>	65
<i>Figura 13</i>	66
<i>Figura 14</i>	68
<i>Figura 15</i>	74
<i>Figura 16</i>	81
<i>Figura 17</i>	82
<i>Figura 18</i>	83
<i>Figura 19</i>	84
<i>Figura 20</i>	85
<i>Figura 21</i>	86
<i>Figura 22</i>	109

ABREVIACIONES

Las abreviaciones aparecen ordenadas alfabéticamente por su término en inglés.

ADMA	Dimetilarginina asimétrica
ALF	Insuficiencia hepática aguda
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
BDL	Ligadura del conducto biliar
CafD	Dieta de cafetería
Ccl-2	Ligando de quimioquinas 2
CD	Dieta control
cDNA	DNA complementario
CLD	Enfermedad hepática crónica
CNS	Sistema nervioso central
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
COL1A1	Colágeno Tipo 1 alfa 1
CRN	<i>NASH-Clinical Research Network</i>
DAB	3.3'-diaminobenzina
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
FGF15	Factor de crecimiento de fibroblastos-15
FGFR-4	Receptor 4 de factor de crecimiento de fibroblastos
FXR	Receptor X farnesoide
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo-1
H&E	Hematoxilina-eosina
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HE	Encefalopatía hepática

Abreviaciones

HFD	Dieta rica en grasa
HFGFD	Dieta rica en grasa suplementada con glucosa y fructosa
HOMA-IR	Índice de resistencia a la insulina
HSC	Célula hepática estrellada
Iba-1	Molécula adaptadora de unión a calcio-1
IHQ	Inmunohistoquímica
IHVR	Resistencia vascular intrahepática
IL-6	Interleuquina 6
IL1 β	Interleuquina 1 β
IM	Microbiota intestinal
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
IR	Resistencia a la insulina
IRS	Sustrato 1 del receptor de insulina
KLF-2	Factor 2 Krüppel-like
Lcn-2	Lipocalina-2
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
LSEC	Célula endotelial del sinusoides hepático
LTM	Memoria a largo plazo
MAP	Presión arterial media
MCD	Dieta deficiente en colina y metionina
MHE	Encefalopatía hepática mínima
mRNA	RNA mensajero
NaCl	Cloruro sódico
NAFLD	Hígado graso no alcohólico
NAS	<i>NAFLD activity score</i>
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica
NGS	Suero normal de cabra

NH ₃	Amoniacó
NH ₄ ⁺	Ión amonio
NO	Óxido nítrico
OCLN	Ocludina
OHE	Encefalopatía hepática manifiesta
P-Akt	Proteína quinasa B fosforilada
P-eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial fosforilada
PBF	Flujo sanguíneo portal
PBS	Tampón fosfato salino
PCA	Anastomosis portocava
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PH	Hipertensión portal
PI3K	Fosfoinositol 3 quinasa
PP	Presión portal
PVL	Ligadura parcial de la vena porta
rRNA	RNA ribosómico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
SEM	Error estándar de la media
Sham	Cirugía ficticia
SHP	Receptor nuclear SHP
SMABF	Flujo sanguíneo de la arteria mesentérica superior
SNpc	Sustancia negra - pars compacta
STM	Memoria a corto plazo
TBS	Tampón tris salino
TGR-5	Receptor de ácido biliar-1 acoplado a proteína G
TH	Tirosina hidroxilasa
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α

Abreviaciones

Ttr	Transtiretina
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
ZO-1	Zonula occludens 1
α -SMA	α -Actina de músculo liso

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDADES HEPÁTICAS CRÓNICAS

La fibrosis hepática resultante de un daño hepático crónico es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Entre las principales etiologías causantes de enfermedad hepática destacan las hepatitis virales (B y C), la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y la enfermedad hepática alcohólica. Otras etiologías menos frecuentes, pero igualmente importantes, son las enfermedades autoinmunes del hígado y las colangiopatías crónicas. En los últimos años el NASH se ha convertido en la enfermedad hepática crónica más común. Esto ha sido debido a, por un lado, la actual epidemia de obesidad en los países occidentales y, por otro, a la gran eficacia de los antivirales de acción directa que hace prever la desaparición del virus de la hepatitis C.

1.1.1. Esteatohepatitis no alcohólica

1.1.1.1. Definición y fisiopatología

La enfermedad hepática por depósito de grasa (NAFLD) es considerada la manifestación hepática del síndrome metabólico, ya que frecuentemente aparece asociada a obesidad, resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión¹. La relevancia clínica de NAFLD radica en su alta prevalencia en la población general (20-30%)² así como en su posible evolución hacia esteatohepatitis no alcohólica (12%)³ y enfermedad hepática terminal. NAFLD se caracteriza por la acumulación de grasa en forma de triglicéridos dentro de los hepatocitos (esteatosis). Su transición a NASH va asociada a la aparición de inflamación y daño hepatocelular (balonización). La progresión a cirrosis o carcinoma hepatocelular se

produce en aproximadamente el 2,5% de los casos de NASH y se estima que el proceso puede prolongarse durante 30 años⁴ (**Figura 1**).

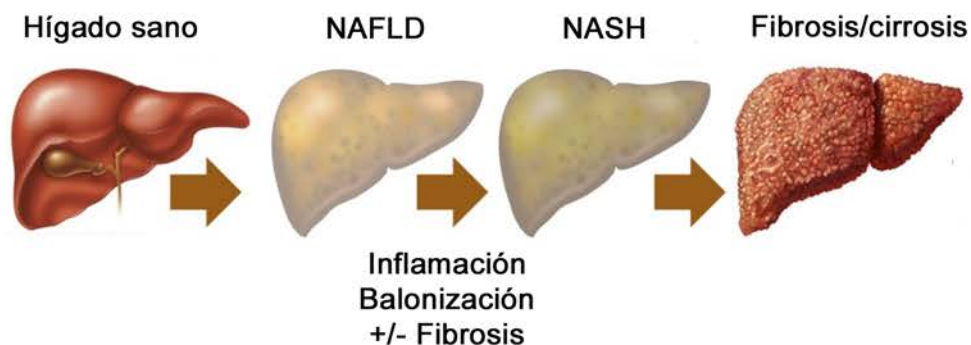


Figura 1. Progresión NASH (Adaptado de Baffy G. *J Clin. Med.* 2015)

La evolución de NAFLD/NASH es el resultado de un conjunto de complejas interacciones que comienzan con la acumulación de grasa en el hígado provocada por una homeostasis lipídica alterada. A este desarrollo de esteatosis contribuyen principalmente una excesiva afluencia de ácidos grasos al hígado y un estado de insulino-resistencia. Así, cuando el metabolismo lipídico está desregulado se genera lipotoxicidad, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y estrés del retículo endoplasmático, que activados de forma prolongada pueden desencadenar mecanismos de inflamación y fibrogénesis. Sin embargo, la fisiopatología del NASH no solo incluye factores intrahepáticos, sino también múltiples componentes extrahepáticos como disfunción del tejido adiposo, una microbiota intestinal (IM) alterada y predisposición genética^{5,6}.

1.1.1.2. Factores que influyen en el desarrollo de NASH

1.1.1.2.1. Resistencia a la insulina

Los principales factores de riesgo en el desarrollo de NAFLD/NASH son la obesidad central y la resistencia a la insulina (IR). El sobrepeso afecta al 39% de la población y la obesidad al 13%, y son la consecuencia directa de un alto consumo de calorías procedentes de alimentos ricos en carbohidratos, grasas saturadas, ácidos grasos trans, colesterol y refrescos con grandes cantidades de fructosa, sumados a un estilo de vida sedentario. La resistencia a la insulina es un componente básico de NAFLD, está presente en la mayoría de los pacientes y puede ser independiente de la presencia de obesidad y/o diabetes tipo II⁷.

La insulina, cuando se une a su receptor, activa a fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa B (Akt), impulsando así múltiples efectos en el hígado y otros órganos (músculo esquelético y tejido adiposo). Se sabe que la insulina regula el metabolismo de la glucosa, inhibiendo por un lado su producción hepática y, por otro, estimulando su consumo, pero también actúa sobre el metabolismo lipídico promoviendo la lipogénesis *de novo* en el hígado en estado postprandial e inhibiendo la lipólisis en el tejido adiposo periférico^{8,9}. En un estado de insulino-resistencia en el hígado se produce un aumento de la gluconeogénesis y la lipogénesis *de novo*¹⁰ mientras que, en tejido adiposo aumenta la lipólisis, generándose así un flujo de ácidos grasos libres hacia el hígado^{11,12} (**Figura 2**).

1.1.1.2.2. Lipotoxicidad

El tejido adiposo además de función metabólica presenta actividad endocrina e inmune, con capacidad de producir adipocitoquinas y

citoquinas. Un desequilibrio en estos mediadores (adipoquinas, leptina, interleuquina-6 [IL-6] y factor de necrosis tumoral [TNF- α]) puede afectar no solo al propio tejido adiposo sino también al hígado. Las adipoquinas son moléculas con función antiinflamatoria, cuya disminución se ha relacionado con estados de obesidad, pudiendo actuar en el aumento de la esteatosis hepática, resistencia a la insulina, estrés del retículo endoplasmático e inflamación¹³⁻¹⁵. Por su parte, la leptina estimula la oxidación de los ácidos grasos, reduciendo el contenido de grasa en órganos periféricos, sin embargo en estados de obesidad esta función está frecuentemente alterada debido a la disfunción del receptor (leptino-resistencia). IL-6 y TNF- α son dos importantes citoquinas pro-inflamatorias que aparecen muy elevadas en pacientes obesos o con resistencia a la insulina¹⁶⁻¹⁹, y se ha descrito que desempeñan un papel clave en el desarrollo de inflamación hepática y tumorigenesis²⁰.

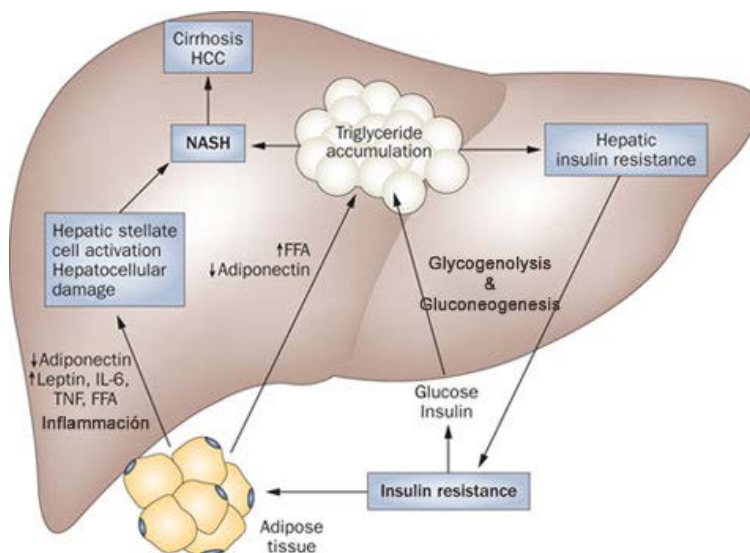


Figura 2. Papel de la resistencia a la insulina y las adipocitoquinas en la patogénesis de NAFLD/NASH (Adaptado de Smith BW y Adams LA, *Nat. Rev. Endocrinol*, 2011)

1.1.1.2.3. Microbiota intestinal

En los últimos años, la relación establecida entre los cambios dietéticos y la transformación de la IM, así como la conocida asociación funcional entre el intestino y el hígado han posicionado a la IM como otro factor significativo en el desarrollo de NASH. En este sentido, existen dos patrones generales de IM descritos, uno de alta diversidad genética asociado con individuos sanos y otro de baja diversidad genética que se asocia con el perfil del síndrome metabólico^{21,22}. Se han propuesto muchos mecanismos por los que la IM podría cooperar en el progreso de la enfermedad: activación de respuestas inflamatorias, disrupción de la barrera intestinal y liberación de diversos productos y metabolitos bacterianos (etanol, ácidos biliares, LPS...).

Todas estas señales procedentes tanto de la desregulación metabólica, endocrina e inmune, como de la IM estimularían a los mecanismos de inflamación intrahepática y fibrosis.

1.2. CIRROSIS E HIPERTENSIÓN PORTAL

La fibrosis hace referencia a la acumulación de fibras de colágeno en el hígado, siendo la cirrosis hepática el resultado final. Esta condición altera la arquitectura normal del hígado, lo que desencadena (en asociación con otros factores) trastornos en la circulación e hipertensión portal.

1.2.1. Hipertensión portal: definición y fisiopatología

La hipertensión portal (PH) es un síndrome clínico en el que diversas condiciones patológicas causan un aumento de la presión en la vena porta. La PH se define como el aumento de la presión portal (PP) por

encima de 5mmHg, considerándose clínicamente significativa por encima de 10mmHg, situación en la que pueden empezar a aparecer las complicaciones clínicas asociadas^{23,24}. La cirrosis es la causa principal de hipertensión portal (90% de los casos), sin embargo otras alteraciones que afectan de manera principal a los vasos del hígado (como la trombosis portal o el síndrome de Budd-Chiari) también la originan.

El establecimiento de la PH desencadena la formación de vasos colaterales como medida dirigida a la reducción de la hipertensión. Otra consecuencia de la PH consiste en el desarrollo de vasodilatación arterial esplácnica. Ésta, por un lado, provoca un aumento del flujo en la vena porta, lo que favorece la hipertensión; y, por otro, provoca una disminución del volumen plasmático eficaz, fenómeno que condiciona la aparición del síndrome hiperdinámico^{25,26} característico de las fases avanzadas de la cirrosis (**Figura 3**).

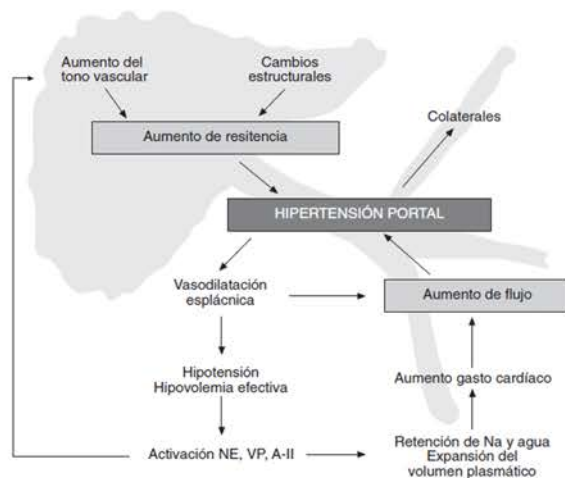


Figura 3. Fisiopatología de la hipertensión portal (Abralde y García-Pagán, *Gastroenterol. Hepatol.* 2006).

1.2.2. Factores que influyen en el desarrollo de hipertensión portal

Como en otros sistemas vasculares, la presión portal viene determinada por la relación entre el flujo sanguíneo portal (Q) y la resistencia vascular del sistema venoso portal (R). Siguiendo la ley de Ohm, el gradiente de presión portal entre dos puntos (ΔP) queda descrito por: $\Delta P = Q \times R$ ²⁷.

Por ello, los mecanismos básicos que pueden aumentar la PH son el aumento del flujo sanguíneo y el aumento de las resistencias vasculares hepáticas (que incluye la resistencia del hígado, de la vena porta y de las venas colaterales).

1.2.2.1. Aumento de la resistencia vascular al flujo portal

El aumento de la resistencia vascular intrahepática (IHVR) es el resultado de la combinación tanto de factores estructurales (fibrosis, remodelación vascular, oclusión vascular, formación de nódulos y trombosis vascular) como dinámicos. El componente dinámico explica al menos un 25% del aumento de IHVR²⁸, y es la consecuencia de un desequilibrio entre las señales vasoconstrictoras y vasodilatadoras²⁶. Durante la progresión de la cirrosis, las células endoteliales del sinusoides hepático (LSEC) son probablemente las primeras en volverse disfuncionales: incrementan la producción de mediadores vasoconstrictores (endotelina-1, leucotrienos y tromboxano A₂) y reducen la de vasodilatadores (óxido nítrico [NO]). En respuesta a esto, se produce la contracción de las células estrelladas hepáticas (HSC), los miofibroblastos y células de músculo liso vascular. Las HSC además, experimentan importantes cambios morfológicos y funcionales, que incluyen sobreexpresión de α -actina de músculo liso (α -SMA), incremento de la respuesta a vasoconstrictores y actividad fibrogénica²⁹.

1.2.2.1.1. Microcirculación hepática y disfunción endotelial

El endotelio vascular es una monocapa celular que forma el revestimiento interno de los vasos sanguíneos. Dicho endotelio no constituye únicamente una barrera física ya que también participa en procesos fisiológicos y patológicos. Las LSEC son células endoteliales altamente especializadas que forman la pared de los sinusoides hepáticos (**Figura 4**). Se diferencian del resto de células endoteliales por la presencia de fenestras en su citoplasma y ausencia de membrana basal organizada, características que les confieren gran permeabilidad^{30,31}.

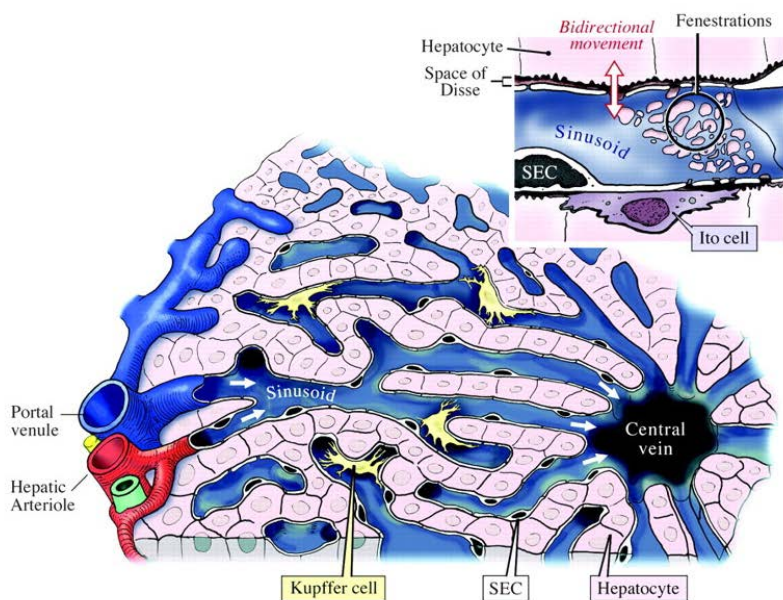


Figura 4. Sinusoides hepático (Adaptado de Aird WC, *Cir. Res.* 2007)

La disfunción endotelial hace referencia al cambio funcional y estructural que experimenta el endotelio vascular durante la enfermedad hepática,

principalmente caracterizado por la disminución de la producción y liberación de moléculas vasoactivas, siendo el NO el más relevante^{32,33}. El NO es posiblemente el vasodilatador más potente, y está implicado en diversas y complicadas funciones en la patogénesis y progresión de las enfermedades hepáticas. En hígados cirróticos se ha observado una disminución de su biodisponibilidad, lo cual contribuye al aumento de la resistencia vascular intrahepática^{34,35}. En general, el NO generado por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en las LSEC ejerce un papel protector, mientras que el generado por la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) contribuye a los procesos patológicos³⁶. La reducción de la biodisponibilidad del NO que se produce en enfermedad hepática crónica puede ser el resultado tanto de una disminución de la producción como de una degradación causada por la interacción con radicales oxidantes³⁷. La síntesis de NO relacionada con la actividad de eNOS hepático puede verse reducida por el efecto de inhibidores como dimetilarginina asimétrica (ADMA)³⁸ o caveolina-1³⁵, así como por procesos que afecten modificaciones post-transcripcionales (ej. fosforilación dependiente de Akt) o cambios en la localización intracelular^{39,40}.

La angiogénesis también desempeña un papel clave en la circulación intrahepática. En hígados cirróticos se ha observado un aumento del número de vasos en los septos fibróticos y los nódulos regenerativos⁴¹. Su desarrollo viene impulsado por la liberación de factores angiogénicos (angiopietina y factor de crecimiento vascular endotelial [VEGF]) por parte de las HSC activadas y las LSEC^{42,43}. Esta formación desorganizada de vasos sanguíneos genera patrones de flujo irregular que contribuyen a la IHVR²⁶.

1.2.2.2. Otros factores

El otro componente implicado en el aumento de la presión portal es el incremento del flujo sanguíneo. Una vez se ha establecido la PH se generan vasos colaterales por los que diverge la sangre procedente del intestino. Estos vasos colaterales se modelan a partir de la abertura de vasos pre-existentes o por procesos de angiogénesis que parecen desencadenados por señales procedentes de la vasculatura intestinal o arterias esplácnicas⁴⁴⁻⁴⁶. Su formación tiene como consecuencia una endotoxemia procedente del intestino que estimula sustancias vasoactivas locales producidas por el endotelio vascular, como son prostaglandinas, monóxido de carbono (CO) y NO. Esta abundante presencia de moléculas vasomoduladoras, también procedentes de células del músculo liso y neuronas, tiene como resultado una reducción de la sensibilidad a los vasoconstrictores²⁶. En este proceso de vasodilatación arterial esplácnica también intervienen factores de regulación neuronal^{47,48} y cambios estructurales en las arterias^{49,50}.

Finalmente, la vasodilatación arterial conduce a hipovolemia y aumento del gasto cardiaco. Así, todos estos trastornos hemodinámicos asociados a la PH constituyen el síndrome hiperdinámico y conducen a un aumento del flujo sanguíneo portal e incremento de PP.

1.3. COMPLICACIONES DE LA CIRROSIS

La hipertensión portal y todos los trastornos hemodinámicos asociados son, en la mayoría de los casos, las causas que desencadenan las complicaciones de la cirrosis. La aparición de complicaciones clínicas define el estadio de cirrosis descompensada, que se asocia con una disminución de la supervivencia y un peor pronóstico a corto plazo. Entre

las complicaciones más comunes destacan: sangrado de varices gastroesofágicas, ascitis, síndrome hepatorenal, peritonitis bacteriana espontánea, síndrome hepatopulmonar y encefalopatía hepática.

1.3.1. Encefalopatía hepática

1.3.1.1. *Definición* y fisiopatología

La encefalopatía hepática (HE) es un síndrome neuropsiquiátrico causado por los efectos que tiene la llegada de sustancias tóxicas, principalmente amoníaco, en el sistema nervioso. Es consecuencia de una insuficiencia hepática aguda (ALF) o crónica (CLD), que impide la metabolización de compuestos tóxicos por parte del hígado y/o de una derivación sanguínea porto-sistémica. La HE se manifiesta como un amplio rango de disfunciones potencialmente reversibles, que abarcan desde alteraciones sub-clínicas de comportamiento o cognición hasta el estado de coma.

La fisiopatología de la encefalopatía hepática es compleja, ya que implica sobreproducción y metabolización reducida de diversas sustancias neurotóxicas⁵¹. El amoníaco (NH₃), que frecuentemente aparece elevado en pacientes con cirrosis y provoca toxicidad celular, parece desempeñar un papel clave en el desarrollo de las alteraciones⁵²⁻⁵⁴. Este metabolito provoca fallos en la neurotransmisión e induce daño astrocitario (edematización astrocitaria) y edema cerebral, implicados en la aparición de las manifestaciones neurológicas. Otros factores como la inflamación, estrés oxidativo, hiponatremia, modificaciones de la barrera hematoencefálica o alteraciones en vías glutamatérgicas y GABAérgicas o de las benzodiazepinas también parecen participar,

independientemente o en sinergia con el amoníaco, en la generación de las perturbaciones neurológicas⁵⁵.

1.3.1.1.1. Metabolismo del amoníaco

El amoníaco es generado en el intestino a partir de tres fuentes diferentes: 1) los componentes nitrogenados de la dieta, 2) la microbiota del colon con actividad enzimática ureasa, que puede descomponer la urea del torrente sanguíneo en amonio y dióxido de carbono (CO₂) y 3) los enterocitos que, como principal fuente de energía, metabolizan la glutamina, a través de la glutaminasa, generando así glutamato y amoníaco⁵⁶. Una vez generado, el amoníaco viaja por el sistema venoso esplácnico hasta el hígado dónde es eliminado principalmente a través del ciclo de la urea o, en menor medida, mediante su conversión a glutamina⁵⁷. Durante la insuficiencia hepática se cree que se produce una disminución de la capacidad metabólica del ciclo de la urea que causa hiperamonemia, efecto que, además, se ve agravado por una derivación de la sangre a través de colaterales porto-sistémicas extrahepáticas o intrahepáticas, espontáneas o quirúrgicas. Otros órganos como los riñones o el músculo esquelético también son importantes en la regulación de los niveles de amoníaco. Los riñones pueden tanto excretar amoníaco, en forma de ión amonio (NH₄⁺) o en forma de urea, como generarlo, metabolizando la glutamina (a través de la glutaminasa) y liberando bicarbonato y glutamato junto con amoníaco⁵¹. Por su parte, el músculo esquelético capta amoníaco incorporándolo a moléculas de glutamina, a través de la glutamina sintetasa (**Figura 5**).

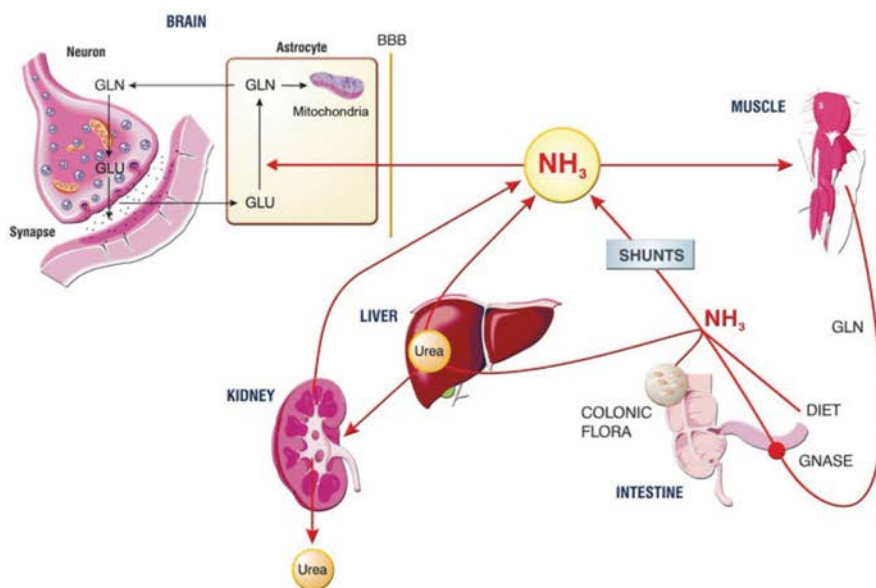


Figura 5. Fisiopatología encefalopatía hepática (Córdoba J y Mínguez B, *Semin. Liver Dis.* 2008)

El mecanismo exacto por el cual el amonio causa disfunción neurológica no se conoce completamente. Sin embargo, se sabe que el NH₃ es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica por difusión pasiva y el NH₄⁺ a través de transportadores específicos⁵⁸ y causar alteraciones mediante 2 mecanismos: 1) alterando la neurotransmisión glutamatérgica y 2) provocando neurotoxicidad por estrés oxidativo. En los astrocitos, el glutamato (aminoácido que actúa como neurotransmisor excitatorio) es transformado, por la incorporación de una molécula de amoniaco, en glutamina, que es transportada a la neurona presináptica dónde vuelve a transformarse en glutamato para ejercer su función como neurotransmisor (**Figura 5**). La hiperamonemia desencadena un aumento de la síntesis de glutamina dentro del astrocito, esta glutamina actúa como osmolito intracelular atrayendo el agua dentro de la célula y provocando la característica edematización astrocitaria de la HE.

También se ha descrito que el NH_3 puede provocar estrés oxidativo, favoreciendo la formación de radicales libres y la nitrotirosinación de proteínas cerebrales, procesos importantes para la función mitocondrial que pueden causar fallos en la neurotransmisión y participar en la edematización del astrocito^{51,59}. Además el NH_3 tendría efectos agonistas sobre la función GABAérgica, principal sistema inhibitorio. Los cambios en el estado de hidratación de las células son responsables de diversas modificaciones en vías metabólicas y serían responsables del edema cerebral y las manifestaciones neurológicas de la HE⁶⁰, que pueden llegar a herniación cerebral y muerte del paciente.

1.3.1.1.2. *Inflamación*

La inflamación es otro factor que concentra gran interés, ya que parece desempeñar un papel destacable en la precipitación de los episodios de HE. En las últimas décadas se ha confirmado una sólida asociación entre la hiperamoniemia y la inflamación en la patogénesis de la HE. Se ha postulado que el NH_3 podría actuar como primer estímulo sobre el que la inflamación desencadenaría el episodio de HE⁶¹. La inflamación puede ser originada por infección, sangrado gastrointestinal, obesidad, desequilibrio de la IM y translocación bacteriana⁵¹. En pacientes con ALF es frecuente y está bien documentada la presencia de inflamación sistémica, que además se correlaciona con la gravedad de las complicaciones en el sistema nervioso central^{62,63}. En esta línea, también se ha descrito la presencia de neuroinflamación en modelos animales de ALF, donde se observa activación de la microglía y expresión génica de citoquinas proinflamatorias⁶⁴, hecho que además aparece correlacionado con la gravedad de la HE y presencia de edema cerebral⁶⁵. Esta evidencia se ha visto reforzada por un estudio que encuentra activación

de la microglía en tejido cerebral procedente de autopsias de pacientes con ALF causado por hepatitis viral⁶⁶.

Los mecanismos que podrían relacionar la insuficiencia hepática con la neuroinflamación incluyen transducción de señales proinflamatorias periféricas, mecanismos derivados de la acción del amoniaco o lactato en el sistema nervioso central (CNS) y también ruptura de la barrera hematoencefálica⁶⁷.

1.3.1.2. Clasificación de la encefalopatía hepática

La encefalopatía hepática se divide en dos categorías principales: HE manifiesta (OHE) y HE mínima (MHE). La OHE se produce en aproximadamente el 30-45% de los pacientes con cirrosis y se diagnostica mediante la coincidencia de un conjunto de signos y síntomas físicos, mientras que la MHE se estima que se presenta en el 60-80% de los pacientes y solo puede ser detectada mediante pruebas diagnósticas específicas.

La nomenclatura de la HE permite definir tres tipos de acuerdo con el origen de la hepatopatía y el tipo de manifestación neurológica relacionada (**Figura 6**). Según la enfermedad hepática se clasifican en: tipo A (asociado con fallo hepático crónico), tipo B (asociado con derivación porto-sistémica y sin enfermedad hepática intrínseca) o tipo C (asociado con cirrosis o PH).

Table 1. Classification of the subtypes			
Type	Description	Subcategory	Subdivision
A	Encephalopathy associated with acute liver failure	-	-
B	Encephalopathy with porto-systemic bypass and no intrinsic hepatocellular disease	Episodic HE	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitated • Spontaneous • Recurrent
C	Encephalopathy associated with cirrhosis or portal hypertension/porto-systemic shunts	Persistent HE	<ul style="list-style-type: none"> • Mild • Severe • Treatment dependent
		Minimal	-

Figura 6. Clasificación clínica de la encefalopatía hepática (Adaptado de Bajaj JS, *Aliment Pharmacol Ther.* 2009)

El tipo B y C pueden subdividirse según las características de las alteraciones neurológicas en episódica, persistente o mínima. La HE episódica permanece clínicamente indetectable entre episodios, es la forma más frecuente y suele estar relacionada con la presencia de factores precipitantes, aunque también puede aparecer de manera espontánea (cuando no se pueden identificar los factores). La HE episódica también puede ser recurrente, término que hace referencia a la aparición de al menos dos episodios al año. La HE persistente, que puede ser leve o grave, se diagnostica cuando las alteraciones neuropsiquiátricas no remiten. La HE mínima como ya se ha mencionado se manifiesta como un deterioro cognitivo leve⁶⁸ (**Figura 7**).

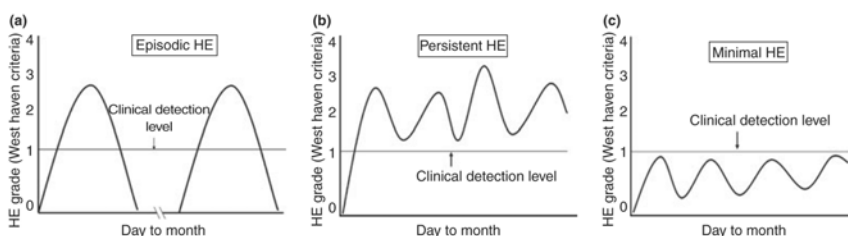


Figura 7. Subtipos de encefalopatía hepática (Bajaj JS, *Aliment Pharmacol Ther.* 2009)

1.3.1.3. Alteraciones neurológicas y motoras

Las manifestaciones clínicas de la HE son muy heterogéneas, pero la sintomatología se puede agrupar en: alteraciones del nivel de conciencia, neuropsiquiátricas y neuromusculares. Los niveles de conciencia abarcan desde un estado de confusión moderado hasta el coma, mientras que las alteraciones neuropsiquiátricas afectan la personalidad, la conciencia, el habla y la capacidad intelectual. Además, esto puede acompañarse de signos neuromusculares, principalmente asterixis y en estados más avanzados flacidez, hiporreflexia, parkinsonismo, distonia, etc.

1.4. PRINCIPALES MODELOS ANIMALES ACTUALES DE NASH Y HE

1.4.1. Modelos animales de NASH

En los últimos años se han desarrollado diversos modelos animales de NAFLD con grados variables de similitud con la patología descrita en pacientes, tanto desde el punto de vista histológico como metabólico. Los modelos actuales pueden clasificarse en genéticos, dietéticos o combinados. Existen numerosos modelos genéticos, pero, sin embargo las mutaciones presentes en estos modelos son raras en humanos. La mayoría de ellos coinciden en provocar alteraciones metabólicas con gran acumulación hepática de lípidos, aunque no es frecuente la presencia de inflamación ni fibrosis. En la mayor parte de los casos es necesario un segundo estímulo, generalmente dietético, para el desarrollo del resto de características histopatológicas⁶⁹.

Por otro lado, los modelos dietéticos de NASH, en general, reproducen mejor la progresión de las características histológicas, aunque la

elección del tipo de dieta es importante para conseguir un perfil metabólico. El objetivo de estos modelos es imitar los malos hábitos alimenticios de las sociedades occidentales y así reproducir el patrón fisiopatológico del NASH. Para la elección del modelo es conveniente tener en cuenta la predisposición natural que confieren algunos factores. Así, el alcance del NASH inducido por dieta puede depender de: la especie (las ratas son más susceptibles que los ratones⁷⁰), el género (lo machos parecen más susceptibles que las hembras⁷¹) y la cepa (siendo la cepa de ratón C57BL/6J y de rata Sprague-Dawley las más propensas⁷²⁻⁷⁴). Las dietas más extendidas son: La dieta deficiente en colina y metionina (MCD), la dieta de cafetería (CafD) y la dieta rica en grasa (HFD).

La dieta MCD altera la liberación hepática de la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) provocando la acumulación de triglicéridos, y también favorece el estrés oxidativo y producción de citoquinas, causando finalmente daño celular. De esta manera, las dietas MCD reproducen las características histopatológicas y la fibrosis en poco tiempo. Sin embargo, crean un perfil metabólico contrario al de la patología humana⁷⁵: Los animales presentan pérdida de peso con niveles bajos de glucosa, insulina y leptina en sangre.

La CafD consiste en comida sabrosa procesada industrialmente que contiene grandes cantidades de grasa, azúcar y sal (galletas, cereales, queso, carne procesada...). Esta dieta es la que mejor imita los hábitos alimenticios humanos actuales. Además, causa obesidad, IR y NASH⁷⁶. El principal inconveniente es la heterogeneidad que se genera entre individuos, ya que los animales presentan preferencias propias por ciertos alimentos⁷⁷.

Existen diversas composiciones de HFD. Simplificando, estas dietas contienen al menos un 30% de grasa⁷⁸ que puede proceder de varios orígenes y contener proporciones variables de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados⁶⁹. Todas estas variables en la composición, sumadas a los diferentes diseños experimentales, hacen que los resultados sean poco reproducibles entre laboratorios. Aún así, estas dietas, en general, coinciden en provocar tanto las alteraciones metabólicas como histológicas, con diferentes niveles de fibrosis.

Finalmente, las dietas también pueden suplementarse con fructosa y/o colesterol que además de estar presentes en grandes cantidades en productos muy consumidos, como son las bebidas azucaradas y los alimentos procesados, promueven la progresión de NASH⁷⁹⁻⁸¹.

1.4.2. Modelos animales de encefalopatía hepática

Los modelos animales de HE deben reproducir dos aspectos esenciales de la patología humana: la insuficiencia hepática y las manifestaciones neurológicas. Los modelos se clasifican en dos grupos, fallo hepático agudo y fallo hepático crónico.

1.4.2.1. Modelos de fallo hepático agudo

Los modelos de ALF deben cumplir unas características básicas que incluyen: 1) la reproducción de las manifestaciones observadas en humanos hasta alcanzar el coma, 2) la aparición de edema cerebral y sus complicaciones, 3) una potencial reversibilidad, 4) un aumento de la hiperamonemia y la glutamina en sangre y CNS, 5) una adecuada caracterización de la patología hepática y cerebral, y 6) un riesgo mínimo hacia el personal. Estos modelos acaban desencadenando hipotermia, hipoglucemia y otras complicaciones que deben ser monitorizadas y

corregidas⁸². Los modelos de ALF se subdividen en dos categorías: los de desvascularización hepática y los tóxicos. La desvascularización hepática puede realizarse por hepatectomía, por anastomosis porto-cava (PCA; ver apartado 7.2.1) seguido de una ligadura de la arteria porta o por PCA seguida de infusiones continuas de amoníaco⁸³. Estos animales, además de reproducir la progresión de la HE, presentan edema cerebral, hiperamonemia y amoníaco en el CNS. También se ha descrito la presencia de astrocitos edematosos^{84,85} y presión intracraneal aumentada. En los modelos tóxicos la insuficiencia hepática se consigue con la administración de compuestos como galactosamina, acetaminofeno, tioacetamida o azoximetano entre otros.

1.4.2.2. Modelos de fallo hepático crónico

Los modelos animales de fallo hepático crónico también deben cumplir unas características esenciales que comprenden: 1) la presencia de colaterales portosistémicas, 2) la manifestación de síntomas que incluyan desde MHE hasta el coma, 3) en estados avanzados astrocitosis tipo II, 3) un aumento de la hiperamonemia y la glutamina en sangre y CNS, 4) episodios desencadenados por factores precipitantes y 5) respuesta clínica a los tratamientos establecidos⁸². Los modelos crónicos se consiguen mediante intervención quirúrgica, realizando una PCA, PCA + amoníaco, ligadura parcial de la vena porta (PVL) o una ligadura del conducto biliar (BDL). La PCA reproduce las alteraciones observadas en pacientes con MHE, causando entre otros, alteraciones de los ritmos circadianos, hipoquinesia, perturbación de la memoria, la capacidad de aprendizaje y los reflejos, mientras que, la administración de amoníaco en estos animales desencadena una HE más grave⁸⁶. Las ratas BDL entre otras características desarrollan PH, colaterales

portosistémicas, hiperamonemia y una HE muy leve (disminución de la actividad motora).

2. OBJETIVO

El objetivo general de la presente tesis consiste en el desarrollo de dos nuevos modelos animales de enfermedad hepática crónica y su aplicación en la investigación de mecanismos fisiopatológicos asociados. Concretamente, el primer estudio tiene como finalidad el desarrollo de un modelo animal de NASH que simule las características metabólicas e histológicas observadas en pacientes y que permita evaluar el papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de la hipertensión portal en ese contexto etiológico. El segundo estudio tiene como propósito el desarrollo de un modelo experimental de encefalopatía hepática episódica que simule el curso de la patología en pacientes y permita explorar en el proceso neurodegenerativo que los episodios repetidos de HE podrían desencadenar.

3. ESTUDIO I

PAPEL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN HIPERTENSIÓN PORTAL Y NASH

3.1. CONTEXTO

La hipertensión portal dirige la mayor parte de las descompensaciones asociadas con la enfermedad hepática avanzada pero su relación con la esteatohepatitis no alcohólica no ha sido todavía muy explorada. En el contexto de NASH se ha detectado que alrededor del 30% de los pacientes presentan hipertensión portal en ausencia de fibrosis o cirrosis destacable⁸⁷, hecho poco frecuente en otras formas de afectación hepática. El mecanismo responsable del aumento de PP en NASH no es conocido pero se ha postulado que podría estar relacionado con cambios estructurales en el hígado asociados con la propia esteatosis y/o con un desarrollo temprano de disfunción endotelial⁸⁸⁻⁹⁰. Por otro lado, en los últimos años la IM ha emergido como un agente importante en la progresión de NAFLD⁹¹. Estudios en modelos animales basados en experimentos de trasplante fecal, han sugerido que la IM participa en el desarrollo de esteatosis, así como en la progresión de la fibrosis^{92,93}. En lo que respecta a la PH se ha observado, empleando un modelo *germ-free* con PVL, que la IM puede contribuir a la PH⁹⁴. Considerando todo lo mencionado la hipótesis y los objetivos del estudio fueron los siguientes:

3.2. HIPÓTESIS

La obtención de un modelo animal de NASH sin fibrosis que reproduzca los cambios histológicos observados en pacientes, así como la hipertensión portal, sería una herramienta muy útil para investigar la fisiopatología de NASH y estudiar nuevas dianas terapéuticas. Por otro lado, se hipotetiza que el

desarrollo de PH en el contexto de NASH podría estar mediado por la alteración de la IM.

3.3. OBJETIVOS

a. Desarrollar un modelo animal de NASH inducido por dieta que reproduzca lo más fielmente posible las alteraciones observadas en pacientes.

a1. Evaluar los mecanismos que conducen a la hipertensión portal en NASH.

a2. Identificar los patrones de IM característicos en cada una de las dos intervenciones dietéticas.

b. Determinar, mediante experimentos de trasplante fecal, si la IM puede, por si misma, modificar la hipertensión portal u otras alteraciones producidas en NASH.

b1. Estudiar los mecanismos que asocian IM, obesidad e hipertensión portal en el contexto de NASH.

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental se dividió en dos etapas, en la primera se caracterizó el modelo animal y se seleccionaron los individuos donantes de IM y en la segunda se realizaron los trasplantes de IM (**Figura 8**).

Etapas 1: Caracterización del modelo

Ratas Sprague-Dawley fueron aleatorizadas en dos grupos, uno fue alimentado durante 8 semanas con una dieta rica en grasa suplementada con una bebida de glucosa y fructosa (HFGFD; n=6) y el otro con una dieta control y agua (CD; n=6). La composición de las dietas aparece detallada en el apartado 7.1.1. En la selección del modelo se tuvieron en cuenta varios factores, por un lado la predisposición natural de las ratas macho de la cepa Sprague-Dawley a desarrollar NASH⁷³. Y por otro, la necesidad de incorporar

una bebida azucarada a la dieta ya que, a pesar de que su uso no está extendido en modelos experimentales, en las últimas décadas se ha incrementado su consumo en las sociedades occidentales y además se sospecha que contribuyen al desarrollo de NAFLD.

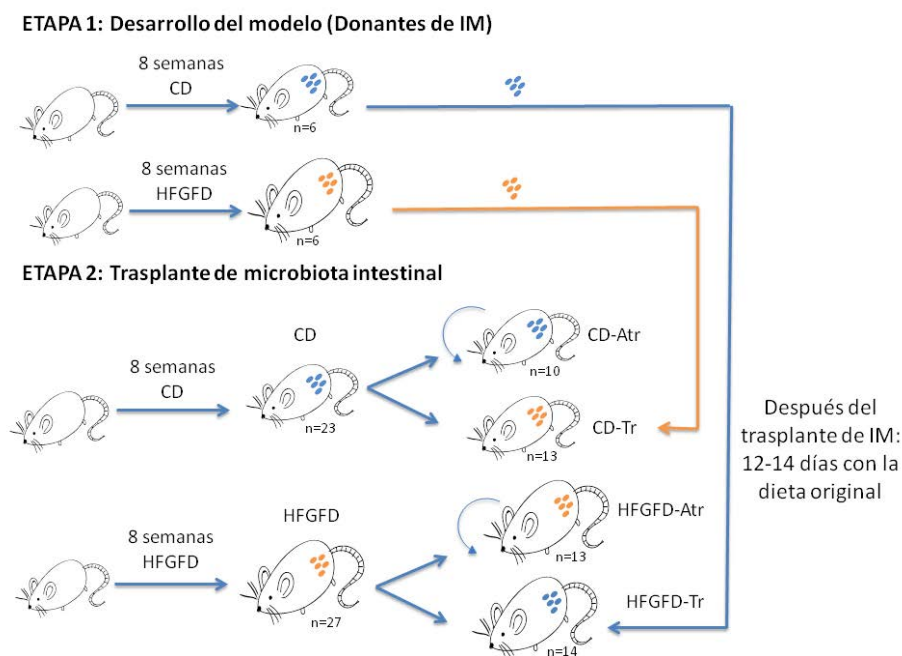


Figura 8. Diseño experimental Estudio I

Al finalizar las 8 semanas de intervención dietética se realizaron estudios hemodinámicos, se recogieron muestras de sangre para su análisis bioquímico y también muestras hepáticas para el análisis histológico y molecular. Por otro lado, también se recogieron muestras de heces en estado basal y después de la intervención dietética. Estas muestras se analizaron para determinar las diferencias en la composición del microbioma intestinal entre ratas CD y HFGFD y también se preservaron para la realización de los trasplantes fecales de la etapa 2.

Como donantes de IM se seleccionaron tres individuos de cada grupo que presentaban la enfermedad completamente desarrollada. Para esta selección se tuvo en cuenta el grado de hipertensión portal, NASH, resistencia a la insulina y perfil de IM. Además, para conseguir unas muestras fecales homogéneas para el trasplante, se mezclaron las heces de los tres individuos seleccionados en cada grupo. Las muestras obtenidas en la etapa 1 se emplearon para los trasplantes heterólogos.

Etapas 2: Trasplante de microbiota intestinal

Dos nuevos grupos de animales fueron alimentados con CD o con HFGFD durante 8 semanas y cuando finalizó este periodo de dieta las ratas se sometieron al trasplante de microbiota intestinal. Todo el procedimiento de descontaminación intestinal y trasplante de IM tiene una duración de una semana y está detallado en el apartado 7.1.2. En el momento de realizar el trasplante las ratas que habían sido alimentadas con CD se subdividieron en los grupos: un subgrupo recibió un trasplante fecal del grupo HFGFD de la etapa 1 (trasplante heterólogo; CD-Tr; n=13) mientras que el otro recibió un autotrasplante (trasplante autólogo; CD-Atr; n=10). Por otro lado, el grupo HFGFD también se dividió en dos subgrupos: uno recibió un trasplante fecal del grupo CD de la etapa 1 (trasplante heterólogo; HFGFD-Tr; n=14) y el otro un autotrasplante (trasplante autólogo; HFGFD-Atr; n=13). Los trasplantes autólogos o autotrasplantes se realizaban con heces del mismo individuo recogidas antes de comenzar el protocolo de descontaminación intestinal. Después del trasplante, los animales mantuvieron la dieta original, es decir, los animales CD-Tr y CD-Atr mantuvieron la dieta control y los animales HFGFD-Tr y HFGFD-Atr la dieta rica en grasa y la bebida azucarada. Entre 12 y 14 días después del trasplante de IM se realizaron los estudios hemodinámicos y se recogieron muestras de sangre para el análisis bioquímico, muestras de hígado para el análisis histológico y molecular y muestras de íleon para el

análisis de la expresión génica. Además se recogieron muestras de heces para el análisis del microbioma intestinal después de la intervención dietética y después de los 12-14 días tras el trasplante.

3.5. RESULTADOS

•La dieta HFGFD provocó obesidad, resistencia a la insulina, NASH e hipertensión portal en ausencia de fibrosis

Para caracterizar el modelo de NASH inducido por dieta se evaluaron las características metabólicas, histológicas y hemodinámicas de los animales. La administración de HFGFD durante 8 semanas condujo a un aumento del 20% en el peso corporal en comparación con la dieta CD ($p < 0.001$, **Tabla 1**). La glucosa, la insulina y el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR), medidos en ayunas, fueron significativamente superiores en el grupo HFGFD en comparación con el grupo CD (**Tabla 1 y Figura 9A**). Las concentraciones en sangre, medidas en ayunas, de albúmina, creatinina, bilirrubina, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), triglicéridos, colesterol, lipoproteína de alta densidad (HDL) y lipoproteína de baja densidad (LDL) no fueron alteradas por la HFGFD (**Tabla 1**).

A las 8 semanas, el 100% de las ratas del grupo HFGFD desarrollaron NASH histológico (es decir, concurrencia de esteatosis, balonización del hepatocito e inflamación lobulillar). La media de actividad de NASH medida por NAS fue de 4.5 ± 0.56 en el grupo HFGFD frente a 1 ± 0.37 en los controles ($p < 0.001$). Sin embargo, la fibrosis en la semana 8 fue leve o estuvo ausente (**Figura 9B**). Esta ausencia de fibrosis a nivel histológico estuvo acompañada, a nivel molecular, por una expresión similar de mRNA de colágeno- $\alpha 1$ (COL1A1) y α -SMA en hígado entre animales HFGFD y controles (**Figura 9C**).

Finalmente, la intervención dietética de 8 semanas indujo un aumento significativo de la presión portal al compararse con los controles (HFGFD: 10.71 ± 0.44 vs CD: 8.75 ± 0.52 mmHg, $p = 0.018$). Este grado de PH es comparable a lo que se puede obtener experimentalmente con una ligadura parcial de la vena porta 16G^{46,95} (**Figura 9D**). Por otro lado, no se observaron cambios en la hemodinámica sistémica (**Tabla 1**).

Para caracterizar más detalladamente las anomalías intrahepáticas que podrían haber llevado al aumento de PP en ausencia de fibrosis, evaluamos la disfunción endotelial analizando la fosforilación de Akt y eNOS. En nuestro modelo, las ratas HFGFD mostraron una reducción de los niveles de P-Akt y P-eNOS en hígado en comparación con los controles, a pesar de niveles más altos de insulina (**Figura 9E,F**), lo que sugiere la presencia de disfunción endotelial insulino-dependiente en estos animales.

•La HFGFD indujo cambios destacables en la IM

Para verificar si los grupos CD y HFGFD desarrollaban cambios en la microbiota intestinal debido a las diferentes dietas, las muestras fecales recogidas al inicio del experimento y después de las 8 semanas de intervención dietética se analizaron mediante la secuenciación del gen 16S del rRNA. La HFGFD provocó una reducción global en la diversidad del microbioma intestinal en comparación tanto a las muestras iniciales como a las del grupo CD (**Figura 10A**). Al comparar el perfil taxonómico a nivel de filo, se observó que la HFGFD se asociaba con un aumento de firmicutes y una disminución de bacteroidetes en comparación con CD (**Figura 10B**). Además, la similitud de las composiciones microbianas entre las muestras, analizadas por UniFrac PCoA, permitió la identificación de tres agrupaciones diferentes: muestras basales, CD y HFGFD (**Figura 10 C**). El análisis PCoA se realizó en

muestras fecales a las 8 semanas de CD y HDGFD tanto de ratas de la etapa 1 como de la etapa 2, obteniéndose los mismos resultados (**Figura 10 C**).

•**El trasplante de IM indujo cambios de IM en ratas HFGFD**

Una vez que se confirmaron las diferencias en la IM entre los grupos CD y HFGFD, se seleccionaron tres ratas representativas de cada grupo como donantes IM en función del peso, HOMA-IR y PP (**Tabla 2**).

Los cambios en la IM desencadenados por los trasplantes fecales se analizaron comparando muestras de heces recogidas después de las 8 semanas de intervención dietética y 12-14 días después de los trasplantes (autólogos y heterólogos). La microbiota intestinal presente en el grupo HFGFD-Tr (ratas HFGFD trasplantadas con heces de ratas CD) fue significativamente diferente a la del grupo HFGFD-Atr (ratas HFGFD que recibieron un autotrasplante), pero también de la IM previa al trasplante (**Figura 11A**). No se encontraron diferencias entre HFGFD-Atr y HFGFD. En ratas CD, el trasplante con IM de HFGFD (CD-Tr) no indujo cambios significativos en la composición de la IM en comparación con CD-Atr o con la microbiota presente en las muestras CD recogidas a las 8 semanas de intervención dietética (**Figura 11A**). Un análisis posterior de la IM reveló una estrecha correlación entre la abundancia de *Clostridium* y *Adlercreutzia* y la presión portal, concretamente, la reducción de estas especies se relacionó con el aumento de PP (**Figura 11 B y C**), lo que sugiere que podrían ejercer un papel protector.

•El trasplante fecal con microbiota intestinal sana normalizó la hipertensión portal, mejorando la resistencia vascular intrahepática y la disfunción endotelial

Después del trasplante de IM, evaluamos la IR, la histología y la hemodinámica sistémica y portal para dilucidar el posible papel de la microbiota intestinal en la regulación de la hipertensión portal. Los principales efectos del trasplante de IM en estos parámetros se muestran en la **Tabla 3** y en la **Figura 12**. Como se puede ver, en el grupo CD el trasplante con IM de donantes HFGFD no fue capaz de inducir cambios relevantes en la IR, la histología de NASH o la hemodinámica portal en el período de 14 días entre el trasplante de IM y el análisis final. Sin embargo, el efecto del trasplante de una IM eubiótica (de donantes CD) a animales con NASH indujo cambios relevantes, incluso manteniendo la HFGFD. Como se muestra en la **Tabla 3**, el trasplante de IM del grupo CD a animales HFGFD (HFGFD-Tr) se asoció con una reducción de la glucemia en ayunas y el HOMA-IR en comparación con los controles (animales HFGFD autotrasplantados, HFGFD-Atr), aunque estos cambios no alcanzaron significancia estadística (**Tabla 3, Figura 12A**). Sin embargo, los animales HFGFD-Tr mostraron un aumento significativo de los niveles intrahepáticos de P-Akt en comparación con los animales HFGFD-Atr (**Figura 12E**), lo que indica una restauración de la sensibilidad hepática a la insulina tras el trasplante de IM de individuos sanos.

En términos de histología hepática, las características histológicas individuales de NASH y la actividad de la enfermedad (medida por NAS) permanecieron sin cambios tras trasplante de IM (**Figura 12B**). Ni la fibrosis a nivel histológico ni la expresión hepática de α -SMA y COL1a1 se modificaron mediante trasplante de IM (**Figura 12C**).

En cuanto a la hemodinámica sistémica y portal, el trasplante con la microbiota HFGFD a ratas alimentadas con CD (CD-Tr) no indujo cambios hemodinámicos en comparación con los correspondientes controles (CD-Atr), lo que sugiere que la IM por sí sola no es capaz de inducir hipertensión portal en un hígado sano. Sin embargo, el trasplante de IM de controles sanos a ratas HFGFD con NASH fue capaz de reducir significativamente la PP (en comparación con sus correspondientes controles HFGFD-Atr) hasta niveles similares al grupo CD (**Tabla 3 y Figura 12D**), incluso manteniendo la dieta HFGFD. Este cambio se debió principalmente a una reducción significativa, del 31%, de la IHVR en animales HFGFD-Tr en comparación con sus correspondientes controles HFGFD-Atr (**Tabla 3**). Otros parámetros hemodinámicos no se alteraron (**Tabla 3**). Esta reducción de la PP y la IHVR en animales HFGFD-Tr se asoció con una mejoría significativa de los marcadores moleculares de disfunción endotelial. Como se observa en la **Figura 12F**, los niveles intrahepáticos de P-eNOS aumentaron significativamente después del trasplante con la IM sana hasta niveles comparables a los controles CD. Esta mejoría de la disfunción endotelial se asoció con una restauración de los niveles intrahepáticos de P-Akt en el grupo HFGFD-Tr, como ya se ha mencionado previamente (véase también la **Figura 12E**). Además, para evaluar los posibles mecanismos de regulación transcripcional de eNOS, se estudió la expresión del factor 2 Krüppel-like (KLF2), considerado esencial para mantener un fenotipo endotelial funcional⁹⁶. En nuestro estudio, las ratas HFGFD-Tr experimentaron un aumento significativo de la proteína hepática KLF2 en comparación con sus controles (HFGFD-Atr, **Figura 12G**). También evaluamos la expresión de mRNA de eNOS y KLF2, pero no se observaron diferencias entre los grupos (**Figura 14A**).

•El trasplante de IM y el eje intestino-hígado: la HFGFD indujo una activación selectiva de la vía del receptor X farnesoide (FXR) intestinal que fue parcialmente revertida al restaurarse una IM sana

Después de 8 semanas de HFGFD se observó un aumento significativo en la expresión de mRNA de los genes canónicos de la vía de FXR intestinal (factor de crecimiento de fibroblastos-15 [FGF15] y el receptor nuclear SHP) en comparación con los controles (**Figura 13A**). Sin embargo, cuando se evaluó el estado de la vía FXR a nivel hepático, no se observaron cambios entre los grupos (**Figura 13B**). Cabe destacar que el trasplante con una IM sana en ratas alimentadas con HFGFD (HFGFD-Tr) indujo una reducción en la expresión de mRNA de FGF15 intestinal hasta niveles comparables a los controles CD. La expresión de mRNA de FXR permaneció inalterada en todos los grupos trasplantados (**Figura 13C**) y no se observaron cambios en la vía de FXR en hígado (**Figura 13D**). La expresión intestinal de TGR5 (receptor de ácido biliar-1 acoplado a proteína G) y su gen diana GLP-1 (péptido similar al glucagón tipo-1) no se modificó sustancialmente por el trasplante de IM (**Figura 14B,C**).

Finalmente, en íleon se evaluó la expresión de genes que codifican para proteínas de las uniones estrechas del intestino (zonula occludens [ZO-1] y ocludina [OCLN], **Figura 14D**). Inicialmente, la expresión de mRNA de ZO-1 y OCLN fue similar entre el modelo de NASH y los controles. El proceso de descontaminación y trasplante de IM produjo alteración en la expresión de mRNA de ZO-1 y OCLN en comparación con los controles no trasplantados, pero similar en todos los grupos trasplantados, lo que sugiere que estos cambios fueron probablemente debidos al procedimiento de descontaminación.

Tabla 1. Características bioquímicas y hemodinámicas de los grupos CD y HFGFD después de las 8 semanas de dieta.

	CD (n=6)	HFGFD (n=6)	p
Ingesta (g/rata/día)	23.75 ± 0.55	16.93 ± 0.58	<0.001
Ingesta calórica (Kcal/rata/día)	69.17 ± 1.19	119.16 ± 3.15	<0.001
Peso	467.53 ± 5.35	511.24 ± 6.90	<0.001
Ganancia de Peso	222.05 ± 4.63	265.98 ± 6.34	<0.001
Bioquímica			
Glucosa (mg/dL)	101.25 ± 8.72	185.2 ± 27.78	0.036
Insulina (ng/mL)	1.72 ± 0.41	5.29 ± 0.75	0.007
Albúmina (g/dL)	2.70 ± 0.12	2.76 ± 0.05	0.634
Creatinina (mg/dL)	0.54 ± 0.04	0.69 ± 0.07	0.129
Bilirrubina (mg/dL)	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.801
AST (IU/L)	107.50 ± 5.52	175.80 ± 27.52	0.067
ALT (IU/L)	39.00 ± 4.00	41.80 ± 3.60	0.679
Triglicéridos (mg/dL)	43.00 ± 2.68	54.60 ± 4.76	0.089
Colesterol(mg/dL)	91.00 ± 8.80	73.60 ± 3.50	0.085
Colesterol HDL (mg/dL)	47.73 ± 1.82	45.00 ± 1.59	0.295
Colesterol LDL (mg/dL)	34.68 ± 7.57	17.68 ± 2.88	0.055
Parámetros hemodinámicos			
MAP (mmHg)	108.56 ± 5.02	112.54 ± 5.08	0.595
PP (mmHg)	8.75 ± 0.52	10.71 ± 0.44	0.018
SMABF (mL/[min*100g])	3.94 ± 0.72	3.54 ± 0.36	0.612
SMAR (mmHg/mL*min*100g)	27.78 ± 3.98	30.69 ± 4.19	0.632

Tabla 1. Los valores están expresados como media ± SEM. CD, dieta control; HFGFD, dieta rica en grasa con glucosa y fructosa; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; PP, presión portal; MAP, presión arterial media; SMABF, flujo sanguíneo de la arteria mesentérica superior; SMAR, resistencia de la arteria mesentérica superior.

Tabla 2. Principales características de los donantes de microbiota intestinal

	Peso (g)	Glucosa (mg/dL)	Insulina (ng/ml)	HOMA-IR	PP (mmHg)
CD	432 ± 15.63	98.33 ± 11.62	1.42 ± 0.39	0.37 ± 0.13	8.58 ± 0.73
HFGFD	488.67 ± 20.44	223.33 ± 24.34	4.17 ± 1.23	2.25 ± 0.56	11.52 ± 0.55

Tabla 2. Los valores se expresan como media ± SEM (n=3). CD, dieta control; HFGFD, dieta rica en grasa y glucosa-fructosa; HOMA-IR, índice de resistencia a la insulina; PP, presión portal.

Tabla 3. Características bioquímicas y hemodinámicas de los grupos CD y HFGFD después del trasplante (Tr) o el autotrasplante fecal (Atr)

	Bioquímica			
	CD-Atr n=10	CD-Tr n=12	HFGFD-Atr n=12	HFGFD-Tr n=14
Glucosa (mg/dL)	180.70 ± 14.00	166.00 ± 10.11	210.83 ± 8.09	188.93 ± 11.11
Insulina (ng/mL)	4.64 ± 0.83	7.88 ± 1.37	5.95 ± 2.45	6.05 ± 2.18
HOMA-IR	2.06 ± 0.42	2.87 ± 0.48	4.64 ± 1.22	3.77 ± 0.77
Albúmina (g/dL)	2.75 ± 0.02	2.77 ± 0.06	2.91 ± 0.05	2.80 ± 0.05
Creatinina (mg/dL)	0.66 ± 0.03	0.72 ± 0.05	0.78 ± 0.03	0.75 ± 0.05
Bilirrubina (mg/dL)	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.01
AST (IU/L)	132.80 ± 12.05	154.17 ± 21.18	131.17 ± 7.62	129.14 ± 8.68
ALT (IU/L)	35.30 ± 2.14	47.64 ± 7.14	47.92 ± 3.38	42.31 ± 2.26
Triglicéridos (mg/dL)	37.60 ± 2.90	34.42 ± 4.04	44.00 ± 5.31	35.57 ± 4.07
Colesterol (mg/dL)	78.00 ± 3.50	83.50 ± 5.53	78.58 ± 5.18	72.93 ± 4.36
Colesterol HDL (mg/dL)	45.10 ± 2.18	52.92 ± 6.87	47.17 ± 3.87	45.93 ± 3.29
Colesterol LDL (mg/dL)	25.20 ± 2.15	33.50 ± 4.23	25.33 ± 3.71	20.00 ± 1.59

La tabla continúa en la siguiente página

Parámetros hemodinámicos				
	CD-Atr n=9	CD-Tr n=8	HFGFD-Atr n=10	HFGFD-Tr n=10
MAP (mmHg)	111.15 ± 9.50	114.40 ± 7.28	103.79 ± 6.83	117.12 ± 6.90
PP (mmHg)	8.64 ± 0.24	8.48 ± 0.34	10.04 ± 0.53*	8.78 ± 0.32 [#]
SMABF (mL/[min*100g])	2.71 ± 0.22	2.86 ± 0.33	1.77 ± 0.21 *	2.42 ± 0.25
SMAR (mmHg/mL*min*100g)	42.56 ± 4.35	46.73 ± 5,45	49.86 ± 4.88	48.50 ± 5.20
PBF (mL/[min*100g])	2.29 ± 0.28	2.11 ± 0.18	1.64 ± 0.26	2.14 ± 0.27
IHVR (mmHg/mL*min*100g)	3.53 ± 0.25	4.25 ± 0.40	5.31 ± 0.62 *	3.67 ± 0.28 [#]

Tabla 3. Los valores están expresados como media ± SEM. CD-Atr, dieta control-autotrasplante; CD-Tr, dieta control-trasplante HFGFD-Atr, dieta rica en grasa con glucosa y fructosa-autotrasplante; HFGFD-Tr, dieta rica en grasa con glucosa y fructosa-trasplante; HOMA-IR, índice de resistencia a la insulina; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; MAP, presión arterial media; PP, presión portal; SMABF, flujo sanguíneo de la arteria mesentérica superior; SMAR, resistencia de la arteria mesentérica superior; PBF, flujo sanguíneo portal; IHVR, resistencia vascular intrahepática. * $p \leq 0.05$ vs CD-Atr; [#] $p \leq 0.05$ vs HFGFD-Atr.

Figura 9

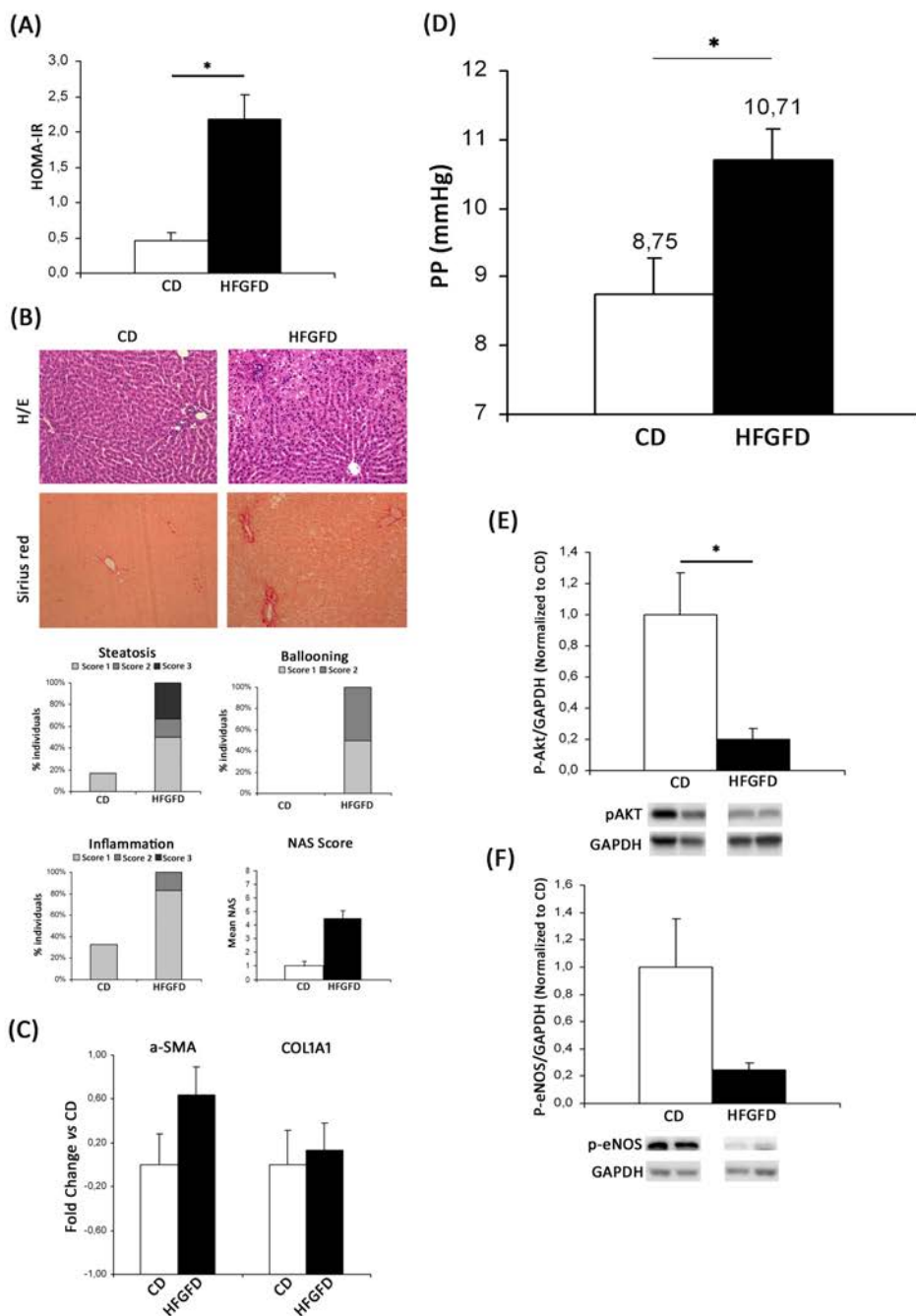


Figura 9. Caracterización del modelo de NASH inducido por dieta (después de las 8 semanas de intervención dietética). (A) Índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) en ratas CD y HFGFD en ayuno. (B) Evaluación histológica de NASH siguiendo el sistema NASH-Clinical research network. Los tres primeros diagramas de barras representan el porcentaje de individuos que presentan esteatosis, balonización e inflamación en los grupos CD y HFGFD. Cada barra incluye el porcentaje de individuos con puntuación de 1 (gris claro), de 2 (gris oscuro) o de 3 (negro) y el último diagrama de barras representa la puntuación media de la actividad de NAFLD (NAS). Las imágenes representativas muestran el parénquima hepático, teñido con hematoxilina-eosina, o la fibrosis hepática, teñida con picrosirio rojo, en CD y HFGFD (40X). (C) Expresión relativa de mRNA de α -SMA y COL1a1 por qRT-PCR, expresada como ratio de expresión (fold change). La expresión de GAPDH se usó como control endógeno y los resultados se normalizaron con respecto al grupo CD. (D) Presión portal (PP) en ratas CD y HFGFD. (E-F) Análisis por Western-blot de marcadores intrahepáticos de disfunción endotelial. Los diagramas de barras muestran la cuantificación de P-Akt y P-eNOS usando GAPDH como control de carga y normalizado con el grupo CD. Debajo se muestran Western blots representativos. Los datos representan la media \pm SEM; * $P < 0.05$ vs CD. CD, dieta de control; HFGFD, dieta rica en grasa con glucosa y fructosa; α -SMA, α -actina del músculo liso; COL1a1, colágeno α -1; P-Akt, proteína quinasa B fosforilada; P-eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial fosforilada; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

Figura 10

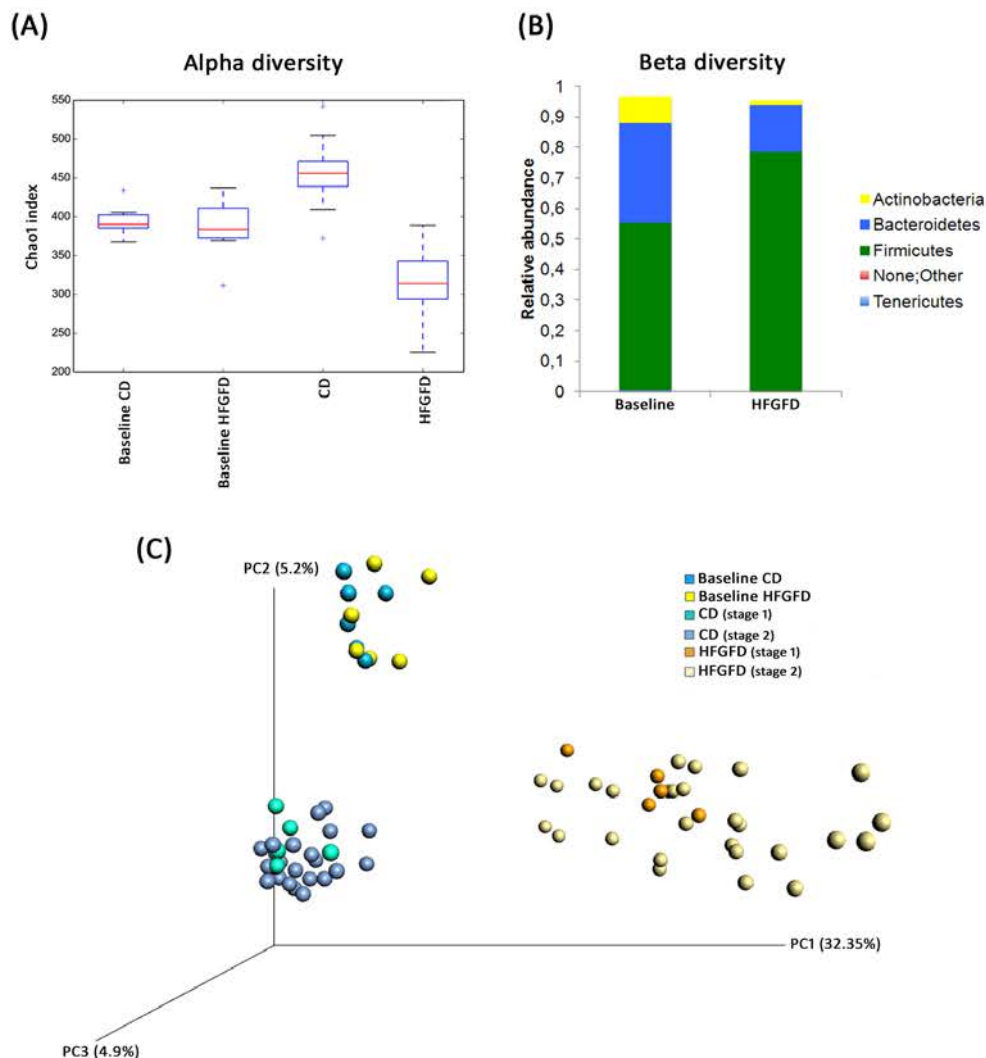


Figura 10. Caracterización de la microbiota intestinal (IM) en el grupo dieta control (CD) y dieta rica en grasa con glucosa y fructosa (HFGFD), al inicio y 8 semanas después de la intervención dietética. (A) Diversidad alfa, basada en el índice Chao1, en muestras de heces al inicio y después de la intervención dietética, en ratas CD y HFGFD. (B) Perfil taxonómico a nivel de filo en muestras de heces al inicio y después de 8 semanas de HFGFD. (C) Análisis PCoA basado en UniFrac no ponderado de la composición microbiana en muestras de heces basales, después de 8 semanas de CD o HFGFD en las etapas 1 y 2 del diseño experimental. CD, dieta control; HFGFD, dieta rica en grasa con glucosa y fructosa.

Figura 11

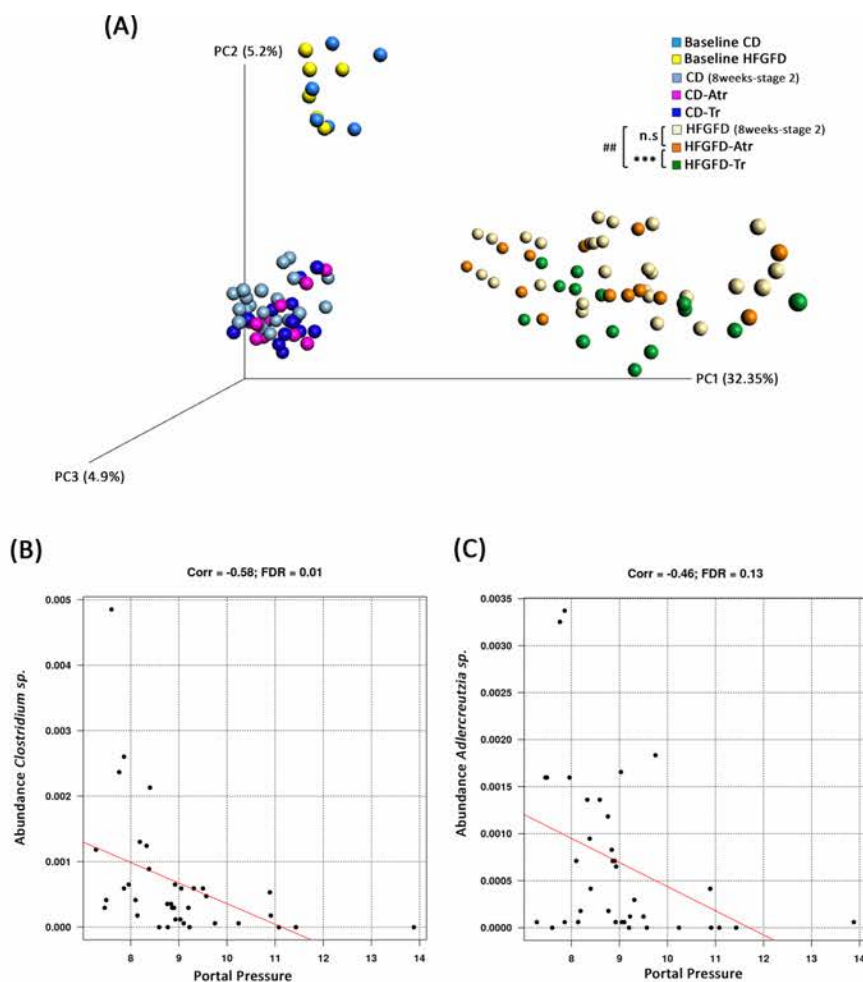


Figura 11. Efectos del trasplante de microbiota intestinal (IM) en la composición bacteriana de las muestras de heces. Correlación entre la abundancia de *Clostridium* y *Adlercreutzia* y presión portal (PP). (A) Análisis PCoA basado en UniFrac no ponderado de la composición microbiana en muestras de heces al inicio, después de 8 semanas de CD o HFGFD en la etapa 2 del diseño experimental y a punto final (12-14 días después de los trasplantes de IM: CD-Atr, CD-Tr, HFGFD-Atr, HFGFD-Tr). *** $p < 0.001$ vs HFGFD-Atr; ## $p < 0.001$ vs HFGFD (NPMANOVA) (B) Correlación entre la abundancia de la especie *Clostridium* y la PP. (C) Correlación entre la especie *Adlercreutzia* y la PP. La correlación entre la composición del microbioma y la PP se evaluó mediante la prueba de correlación de Spearman. Un FDR < 0.05 se consideró estadísticamente significativo. CD, dieta control; HFGFD, dieta rica en grasa con glucosa y fructosa; CD-Atr, dieta control-autotrasplante; CD-Tr, dieta control-trasplante; HFGFD-Atr, dieta rica en grasa con glucosa y fructosa-autotrasplante; HFGFD-Tr, dieta rica en grasa con glucosa y fructosa-trasplante

Figura 12

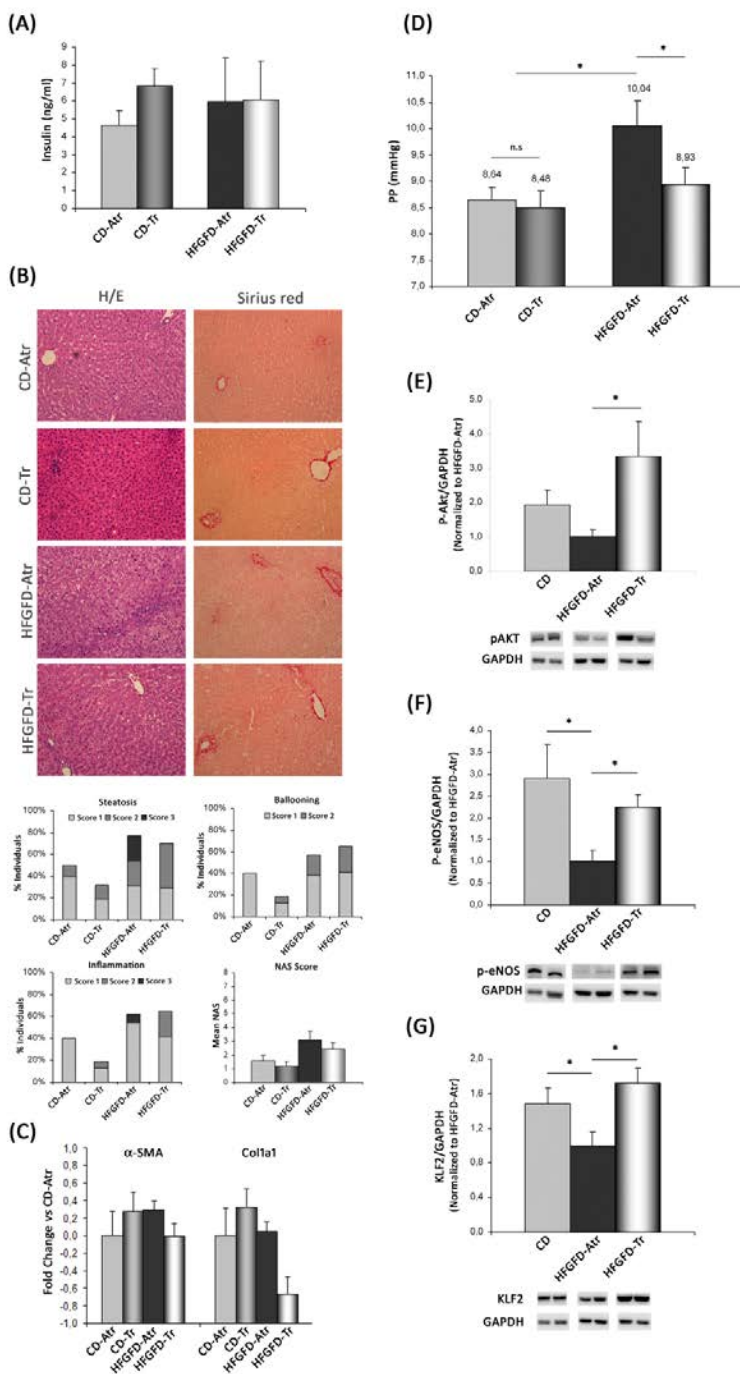


Figura 12. Efectos en el hígado del trasplante de microbiota fecal en el modelo NASH inducido por la dieta. (A) Niveles de insulina en suero en ayunas tras los trasplantes fecales. (B) Evaluación histológica de NASH después de los trasplantes fecales siguiendo el sistema NASH-Clinical research network. Los tres primeros diagramas de barras representan el porcentaje de individuos que presentan esteatosis, balonización e inflamación, en los grupos CD y HFGFD, trasplantados y autotrasplantados. Cada barra incluye el porcentaje de individuos con puntuación 1 (gris claro), 2 (gris oscuro) o 3 (negro) y el último diagrama de barras representa la media de actividad de NAFLD (NAS). Las imágenes representativas muestran el parénquima hepático, teñido con hematoxilina y eosina, o la fibrosis hepática, teñida con picosirio rojo. (C) Expresión de mRNA relativa de alfa-SMA y COL1A1 por qRT-PCR, expresada como ratio de expresión (fold change). La expresión de β -actina se utilizó como control endógeno y los resultados se normalizaron respecto al grupo CD-Atr. (D) Presión portal (PP) después del trasplante fecal. (E-G) Análisis mediante Western-blot de marcadores intrahepáticos de disfunción endotelial. Los diagramas de barras muestran la cuantificación de P-AKT, P-eNOS y KLF2, usando GAPDH como control de carga y normalizado respecto al grupo HFGFD-Atr. Debajo se muestran Western blots representativos. Los datos representan la media \pm SEM; * $P < 0.05$ vs CD. CD, dieta control; HFGFD, dieta rica en grasa y glucosa-fructosa; CD-Atr, dieta control-autotrasplante; CD-Tr, dieta control-trasplante; HFGFD-Atr, dieta rica en grasa y glucosa-fructosa-autotrasplante; HFGFD-Tr, dieta con alto contenido de grasa de glucosa-fructosa-trasplante; α -SMA, α -actina de músculo liso; COL1a1, colágeno α -1; P-Akt, proteína quinasa B fosforilada; P-eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial fosforilada; KLF2, factor 2 Krüppel-like; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

Figura 13

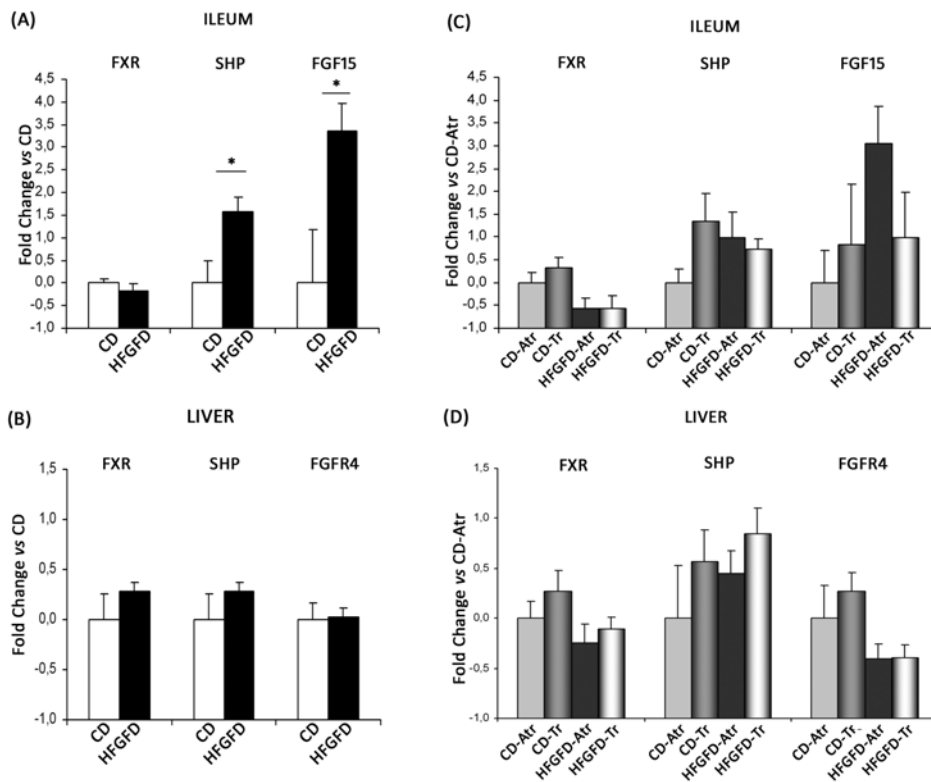


Figura 13. Análisis de la expresión génica en hígado e íleon medido por qRT-PCR. (A) Expresión de mRNA de la vía de FXR en íleon, en grupos CD y HFGFD, después de 8 semanas de dieta. Los resultados se normalizaron respecto al grupo CD. (B) Expresión de mRNA de la vía de FXR en hígado, en los grupos CD y HFGFD, después de 8 semanas de dieta. Los resultados se normalizaron respecto al grupo CD. (C) Expresión de mRNA de la vía de FXR en íleon después de los trasplantes fecales. Los resultados se normalizaron respecto al grupo CD-Atr. (D) Expresión de mRNA de la vía de FXR en hígado después de los trasplantes fecales. Los resultados se normalizaron respecto al grupo CD-Atr. La expresión de β -actina se utilizó como control endógeno en todos los casos. Los datos se expresaron como ratio de expresión (fold change) y están representados como media \pm SEM; * $P < 0.05$ vs CD-Atr. CD, dieta control; HFGFD, dieta rica en grasa con glucosa y fructosa; CD-Atr, dieta control-autotrasplante; CD-Tr, dieta control-trasplante; HFGFD-Atr, dieta rica en grasa con glucosa y fructosa-autotrasplante; HFGFD-Tr, dieta rica en grasa con glucosa y fructosa-trasplante; FXR, receptor X farnesoide; SHP, receptor nuclear SHP; FGF15, factor de crecimiento de fibroblastos-15.

Figura 14

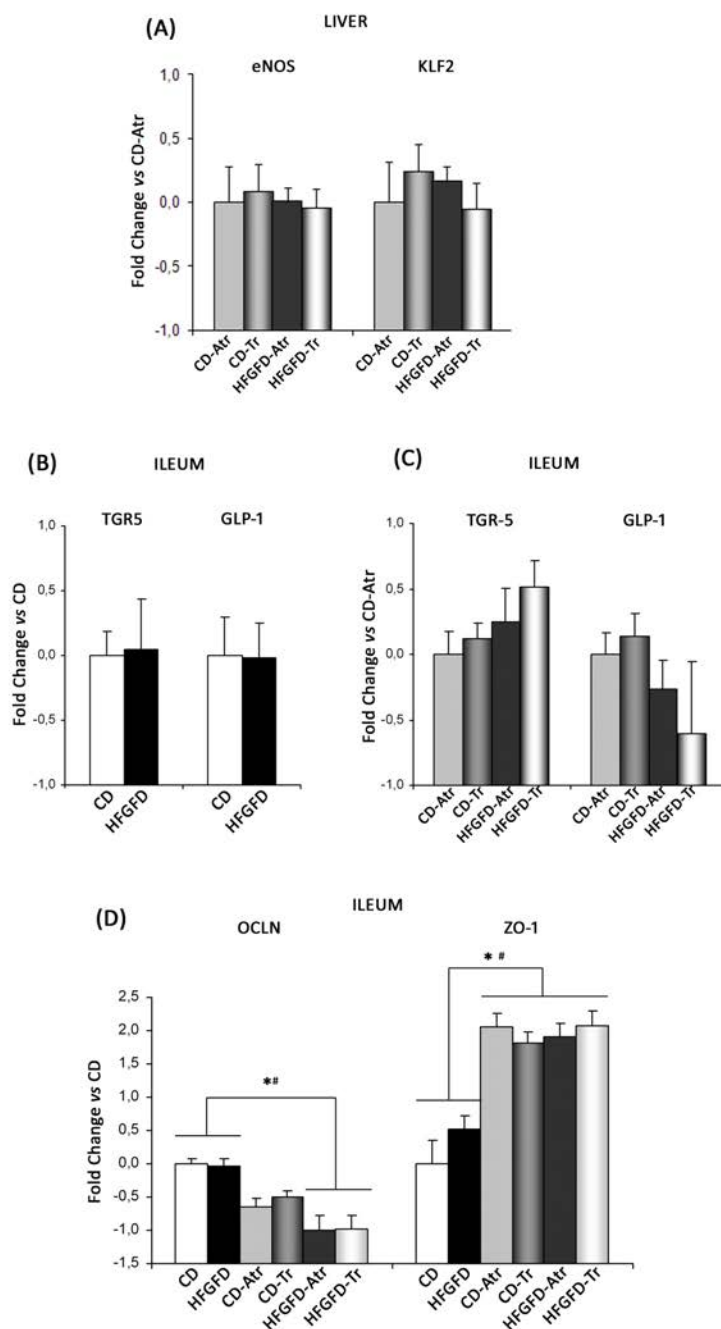


Figura 14. Análisis de expresión génica en hígado e íleon por qRT-PCR. (A) Expresión de mRNA de eNOS y KLF2 en hígado después de los trasplantes fecales. Los resultados se normalizaron con el grupo CD-Atr. (B) Expresión de mRNA de la vía de TGR5-GLP1 en íleon, en los grupos CD y HFGFD, después de las 8 semanas de dieta. Los resultados se normalizaron respecto al grupo CD. (C) Expresión de mRNA de la vía de TGR5-GLP1 en íleon después de los trasplantes fecales. Los resultados se normalizaron respecto al grupo CD-Atr. (D) Expresión de mRNA que codifica para las proteínas de las uniones estrechas en íleon, en los grupos CD y HFGFD, después de 8 semanas de dieta y después de los trasplantes fecales. Los resultados se normalizaron con el grupo CD. La expresión de β -actina se utilizó como control endógeno en todos los casos. Los datos están expresados como ratio de expresión (fold change) y aparecen representados como media \pm SEM; * $P < 0.05$ vs CD-Atr. CD, dieta control; HFGFD, dieta rica en grasa con glucosa y fructosa; CD-Atr, dieta control-autotrasplante; CD-Tr, dieta control-trasplante; HFGFD-Atr, dieta rica en grasa con glucosa y fructosa-autotrasplante; HFGFD-Tr, dieta rica en grasa con glucosa y fructosa-trasplante; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; KLF2, factor 2 Krüppel-like; TGR 5, receptor de ácido biliar 1 acoplado a proteína G; GLP - 1, péptido -1 similar al glucagón; OCLN, ocludina; ZO-1, Zonula occludens.

4. ESTUDIO II

NEURODEGENERACIÓN EN ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA EPISÓDICA

4.1. CONTEXTO

La encefalopatía hepática se ha considerado tradicionalmente como un trastorno metabólico que afecta a los astrocitos pero no a la arquitectura neuronal. Sin embargo está documentada la pérdida neuronal en algunas regiones del sistema nervioso central (ganglios basales, tálamo y cerebelo) en la degeneración hepatocerebral adquirida, la forma más extrema de HE^{97,98}. Varios estudios han demostrado que los episodios de encefalopatía hepática conducen a alteraciones cognitivas⁹⁹ que persisten incluso después del trasplante hepático¹⁰⁰. Siguiendo esta línea, se ha detectado mediante resonancia magnética una disminución de la señal del marcador neuronal N-Acetil Aspartato después del trasplante hepático en pacientes que habían sufrido episodios de HE, sugiriéndose así la presencia de daño neuronal persistente¹⁰¹.

La neurodegeneración es un proceso de pérdida progresiva de sinapsis y neuronas del CNS que afecta a la cognición y el movimiento. Este proceso dirige la progresión de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson, y se cree que está estrechamente relacionado con, entre otros, la activación de mecanismos neuroinflamatorios en los que la microglía desempeña un papel clave. En modelos animales de insuficiencia hepática aguda se ha demostrado la activación de la microglía y la producción de citoquinas proinflamatorias⁶⁴. Al mismo tiempo, en ratas con anastomosis porto-cava se ha evidenciado un incremento de la concentración de citoquinas en el CNS, lo que se ha asociado con alteraciones neurológicas que revirtieron tras la administración de un anti-inflamatorio¹⁰². Diversos

estudios en modelos experimentales apuntan a un efecto sinérgico entre hiperamonemia e inflamación^{61,103,104} que comprometerían la activación tanto de astrocitos como de microglía en la generación de las lesiones neuronales.

Considerando todo lo mencionado, la hipótesis y los objetivos del estudio fueron los siguientes:

4.2. HIPÓTESIS

Dado que hasta el momento no existen modelos animales de EH episódica, el desarrollo un modelo que reproduzca el curso de la patología en pacientes sería una buena herramienta para estudiar la fisiopatología de esta complicación. Por otro lado, se hipotetiza que los episodios repetidos de encefalopatía hepática podrían desencadenar procesos de neurodegeneración.

4.3. OBJETIVOS

a. Desarrollar un modelo animal de HE episódica en el que se combine insuficiencia hepática crónica con los principales factores precipitantes, la hiperamonemia y/o inflamación, y que reproduzca las alteraciones observadas en pacientes.

a1. Comprobar la validez del modelo. Verificar la aparición de los episodios mediante el aumento transitorio de amonio y/o citoquinas en sangre y un test de reflejos.

b. Estudiar la relación entre metabolismo nitrogenado, inflamación y neurodegeneración.

b1. Identificar evidencias de neurodegeneración secundarias a la HE episódica.

4.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Al inicio del experimento las ratas fueron aleatorizadas en dos grupos experimentales: uno fue sometido a una anastomosis porto-cava y el otro a una cirugía ficticia (sham). Los procedimientos quirúrgicos aparecen detallados en el apartado 7.2.1. Después de 4 semanas de reposo comenzó la simulación de los episodios de HE. Para ello, los animales PCA se sub-dividieron en 4 grupos:

- PCA: recibió administraciones periódicas de suero salino
- PCA+NH₃: recibió administraciones periódicas de acetato de amonio
- PCA+LPS: recibió administraciones periódicas de lipopolisacárido (LPS)
- PCA+NH₃+LPS: recibió administraciones periódicas de acetato de amonio y lipopolisacárido

Como control, después de las 4 semanas de reposo, los animales sham recibieron administraciones repetidas de suero salino. Las dosis y el protocolo de administración están descritos en el apartado 7.2.1.

Las infusiones, que tenían como objetivo simular episodios repetidos de HE en animales con HE mínima, se efectuaron una vez cada dos semanas desde la semana 4 hasta la 22, lo que supone un total de 10 infusiones a lo largo de 5 meses (**Figura 15**).

Durante el desarrollo del modelo se registró el peso de los animales, así como los niveles de amonio y citoquinas en sangre antes y después de las infusiones. Durante este periodo también se realizó un examen de reflejos después de los episodios para comprobar el estado neurológico de los animales. Finalmente, en la semana 23 (una semana después de la última infusión), se valoró la memoria a corto y largo plazo. Los animales fueron eutanasiados al concluir la semana 24. En 8 animales de cada grupo se fijaron los tejidos con paraformaldehído (PFA) para el

análisis morfológico-cuantitativo de diferentes estructuras del sistema nervioso motor y en otros 8 se recogieron muestras para el análisis molecular.

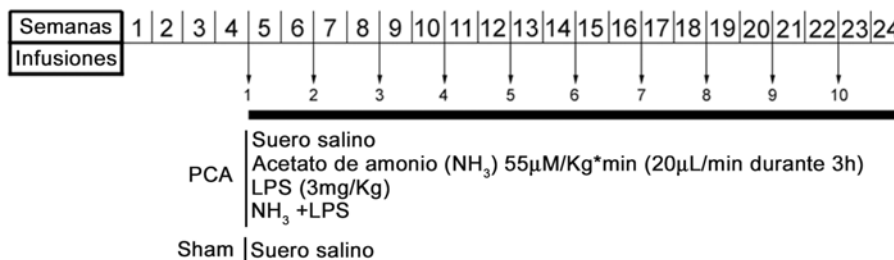


Figura 15. Diseño experimental Estudio II

4.5. RESULTADOS

El peso de los animales se registró durante el desarrollo de todo modelo y no se encontraron evidencias de desnutrición en ningún grupo. El peso fue aumentando progresivamente en todos los grupos durante el período en el que se simularon los episodios de HE (Figura 16).

•Las infusiones de amoníaco y LPS en ratas PCA indujeron, respectivamente, hiperamonemia aguda y producción de citoquinas

Los niveles de amoníaco y citoquinas se midieron antes y después de las infusiones para comprobar el incremento agudo de sus niveles en sangre después de las infusiones. Como era de esperar, los grupos en los que el amoníaco actuó como factor precipitante mostraron, 3h después de las infusiones, niveles de NH₃ en sangre significativamente más elevados que los otros grupos (p < 0.001, **Tabla 4**). Cabe destacar

que el grupo PCA+NH₃ mostró niveles de amoníaco superiores a los del grupo combinado PCA+NH₃+LPS ($p = 0.003$). De la misma manera, los niveles plasmáticos de citoquinas (IL-6, interleuquina 1- β [IL-1 β] y TNF- α) aumentaron, de forma destacable, sólo después de las inyecciones de LPS, en comparación con los grupos que no recibieron LPS ($P \leq 0.001$, **Tabla 4**). Por otro lado, el grupo PCA+NH₃+LPS mostró niveles significativamente inferiores de IL1- β ($P = 0.003$) y TNF- α ($P < 0.001$) al compararse con el grupo PCA+LPS.

•La hiperamonemia indujo pérdida de reflejos en ratas PCA

La evaluación neurológica evidenció una pérdida significativa de reflejos en el grupo PCA+NH₃ entre la etapa basal y 3h después de las infusiones (basal = 12 y post-infusión = 9; $p = 0.003$, **Tabla 4**). Se observó que el amoníaco desencadenaba un deterioro reversible de la capacidad motora en ratas PCA, por lo que, durante la simulación de los episodios las ratas tratadas con amoníaco mostraron una manifestación leve de encefalopatía.

Durante la evaluación de la memoria a corto plazo (STM) se observó que todas las ratas mostraban un ratio de discriminación entre el objeto conocido y el nuevo (ver sección 7.2.3.2) superior a 0.5 y sin diferencias entre los grupos (**Tabla 4**). Esto significa que los animales eran perfectamente capaces de reconocer y diferenciar entre el objeto conocido y el nuevo, por lo tanto mantenían intacta la memoria a corto plazo. En la sesión de evaluación de la memoria a largo plazo, el grupo PCA+LPS no fue completamente capaz de reconocer el objeto familiar y mostró un ratio de discriminación inferior a 0.5, exactamente de 0.32 ± 0.26 , pero sin alcanzar significancia estadística con el resto de grupos.

•**La hiperamonemia provocó la degeneración de las neuronas de Purkinje probablemente a través de la apoptosis de la glía de Bergman**

La evaluación de los cuerpos neuronales dopaminérgicos en la pars compacta de la sustancia negra (SNpc), cuantificados mediante recuento estereológico, no evidenció una reducción del número de neuronas positivas para tirosina hidoxilasa (TH) en ninguno de los grupos PCA al compararlos con el grupo sham. El análisis de la integridad de los axones de estas neuronas TH-positivas en el estriado tampoco señaló signos de degeneración, lo cual respalda el resultado obtenido del recuento de los cuerpos neuronales en la SNpc (**Figura 17A**). La evaluación de las neuronas de Purkinje en el cerebelo reveló la presencia de células con características propias de neuronas en proceso degenerativo en todos los grupos. Estas neuronas se identificaban por una reducción de tamaño y un citoplasma y un núcleo más oscuros y deformados (**Figura 17B,C**), como ya se ha detectado en otras enfermedades. El recuento de las neuronas de Purkinje, tanto funcionales como degenerativas, mediante estereología, mostró una reducción significativa en el número de células de Purkinje funcionales en todos los grupos PCA (con o sin factor precipitante) en comparación con el grupo sham ($p = 0.018$, **Figura 17D**). Por otro lado, se contabilizó un menor número de neuronas de Purkinje totales (incluyendo normales y degenerativas) en los grupos PCA y PCA+NH₃ en relación al grupo sham ($p = 0.045$). Finalmente, para dilucidar el posible mecanismo implicado en la muerte de las neuronas de Purkinje en este modelo, se evaluó la apoptosis midiendo los niveles de caspasa-3 activa mediante inmunohistoquímica. El análisis inmunohistoquímico mostró un aumento

de la tinción de caspasa-3 activa en la glía de Bergman (**Figura 18F**) en todos los grupos con hiperamonemia (PCA, PCA+NH₃ y PCA+NH₃+LPS), excepto en PCA+LPS, comparado con los animales sham ($p = 0.005$; **Figura 18**).

•**El amoníaco, como factor precipitante de los episodios de HE, provocó cambios en el tamaño de los astrocitos**

Las diferencias en el tamaño de los astrocitos en el cerebelo, estimadas como el porcentaje de área marcada por inmunohistoquímica contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) dividido por el número de astrocitos, fueron estadísticamente significativas entre el grupo en el que los episodios fueron precipitados por amoníaco (PCA+NH₃) y el grupo sham ($p = 0.033$, **Figura 19F**). Además, la presencia de astrocitos reactivos se observó en todos los grupos PCA (**Figura 19B-E**).

•**Los episodios desencadenados por amoníaco y/o LPS indujeron la activación de la microglía en ratas PCA**

El grado de activación de la microglía se calculó cuantificando el área marcada mediante inmunohistoquímica con la molécula adaptadora de unión a calcio-1 (Iba-1). De esta manera identificamos, después de la precipitación de los episodios de HE con amoníaco y/o LPS, un aumento en la población de las células de la microglía en el cerebelo en comparación a lo observado en el grupo sham (**Figura 20F**). Paralelamente observamos que varias de estas células presentaban un fenotipo activado, caracterizado por un soma más grande y ramificaciones más cortas ($P \leq 0.001$, **Figura 20C-E**). En ratas sham las células de la microglía poseían ramificaciones largas y numerosas, características del estado de reposo (**Figura 20A**). Los niveles de

amoniaco generados por el grupo PCA parecieron ser insuficientes para producir cambios sustanciales en la microglía (**Figura 20B**).

•Los episodios de HE precipitados por amoniaco y/o LPS indujeron cambios en genes relacionados con la neurodegeneración en ratas PCA

Con la finalidad de encontrar posibles vías implicadas en el proceso neurodegenerativo realizamos un *array* de expresión génica en el cerebelo y, aunque no se encontró ninguna vía canónica afectada, detectamos cambios de expresión en varios genes que podrían estar relacionados con el proceso de muerte neuronal (**Tabla 5**). Identificamos una gran sobreexpresión de transtiretina (Ttr) en el grupo PCA+NH₃ (ratio de expresión [fold Change] Ttr = 17.4). La posterior validación de los resultados obtenidos por PCR a tiempo real (RT-PCR) mostró que el 50% de los animales presentaban una más que notable sobreexpresión de Ttr (ratio de expresión [fold Change] Ttr = 200), mientras que el resto de individuos mantenía niveles similares a los detectados en los controles sham. Estos resultados, además, fueron confirmados al analizar los niveles de la proteína Ttr por Western blot. En general, los niveles de la proteína Ttr fueron significativamente superiores en el grupo PCA y el grupo PCA+NH₃ (**Figura 21**). Destacar también que aquellos animales tratados con amoniaco que sobreexpresan el mRNA de Ttr también mostraron niveles significativamente más altos de la proteína Ttr al ser comparados con la otra mitad de animales tratados con amoniaco pero que tenían niveles de Ttr normales, similares al grupo sham ($p = 0.025$). Por su parte, la administración de LPS también provocó una modulación de la expresión génica, destacando el gen de la lipocalina 2 (Lcn-2) y del ligando de quimioquinas 2 (Ccl-2) (**Tabla 5**)

Tabla 4. Características del modelo animal

	Basal	Post-infusión (3h)	Diferencias Intragrupo
Amoniaco en plasma (nM)			
Sham	114 ± 40	159 ± 141♦	
PCA	329 ± 112 *	219 ± 47♦	
PCA+NH ₃	368 ± 116 *	714 ± 414*	P<0.001
PCA+LPS	292 ± 99 *	171 ± 43 ♦	
PCA+NH ₃ +LPS	242 ± 115	427 ± 96*♦	P=0.042
Citoquinas en plasma (pg/ml)			
IL-6			
Sham	119 ± 16	163 ± 82	
PCA	238 ± 11	662 ± 325	
PCA+NH ₃	255 ± 86	424 ± 208	
PCA+LPS	249 ± 51	3024 ± 4090*	P<0.001
PCA+NH ₃ +LPS	230 ± 19	4197 ± 4182*	P<0.001
IL-1β			
Sham	16 ± 11	56 ± 22	
PCA	27 ± 21	64 ± 37	
PCA+NH ₃	17 ± 10	28 ± 27	
PCA+LPS	20 ± 22	255 ± 171*	P<0.001
PCA+NH ₃ +LPS	12 ± 12	168 ± 124*†	P<0.001
TNF-α			
Sham	-2 ± 4	-2 ± 5	
PCA	-1 ± 4	21 ± 20	
PCA+NH ₃	-1 ± 4	16 ± 17	
PCA+LPS	-1 ± 4	73 ± 16*	P<0.001
PCA+NH ₃ +LPS	-1 ± 4	52 ± 6* †	P<0.001

La tabla continua en la siguiente página

Estudio II

	Basal	Post-infusión (3h)	Diferencias intragrupo
Puntuación test de reflejos			
PCA	12	12	
PCA+NH ₃	12	9	P=0.003
PCA+LPS	12	12	
PCA+NH ₃ +LPS	12	11	
Memoria de reconocimiento de objetos (Ratio de discriminación)			
	STM	LTM	
Sham	0.54 ± 0.30	0.66 ± 0.16	
PCA	0.65 ± 0.15	0.61 ± 0.19	
PCA+NH ₃	0.62 ± 0.32	0.50 ± 0.29	
PCA+LPS	0.61 ± 0.11	0.33 ± 0.26	
PCA+NH ₃ +LPS	0.54 ± 0.29	0.51 ± 0.30	

Tabla 4. PCA, anastomosis portocava; LPS, lipopolisacárido; IL-6, interleuquina-6; IL-1β: interleuquina 1-β; TNF-α, factor de necrosis tumoral-α; STM, memoria a corto plazo; LTM, memoria a largo plazo. *P≤0.05 vs. Sham; †P≤0.05 vs. PCA+NH₃; ‡P≤0.05 vs. PCA+LPS; Diferencias intragrupo: ANOVA / t vs post-infusión (3h)

Tabla 5: Lista de los genes sobre- o infraexpresados en cerebelo por la hiperamonemia y/o por la inflamación y asociados con procesos neurodegenerativos.

Nombre	Símbolo	Comparación vs. Sham (Fold Change)			
		PCA	PCA+NH ₃	PCA+LPS	PCA+NH ₃ +LPS
Lipocalin-2	<i>Lcn-2</i>	2.64	1.52	3.38 (8.04)*	3.15
Chemokine ligand-2	<i>Ccl-2</i>	1.86	1.41	2.66	1.44
OrthodenticleHomeobox 2	<i>Otx-2</i>	-1.19	1.93	-2.74 (-1.84)	1.00
Transthyretin	<i>Ttr</i>	2.65	17.45 (23.34)	2.51	3.15
5-hidroxytryptamine receptor 2C	<i>Htr2C</i>	-1.07	3.02 (6.08)	2.67	1.71

Tabla 5. PCA: anastomosis portocava; LPS, lipopolisacárido; fold change, ratio de expresión. En paréntesis los valores correspondientes al fold change de la comprobación por RT-PCR.

Figura 16

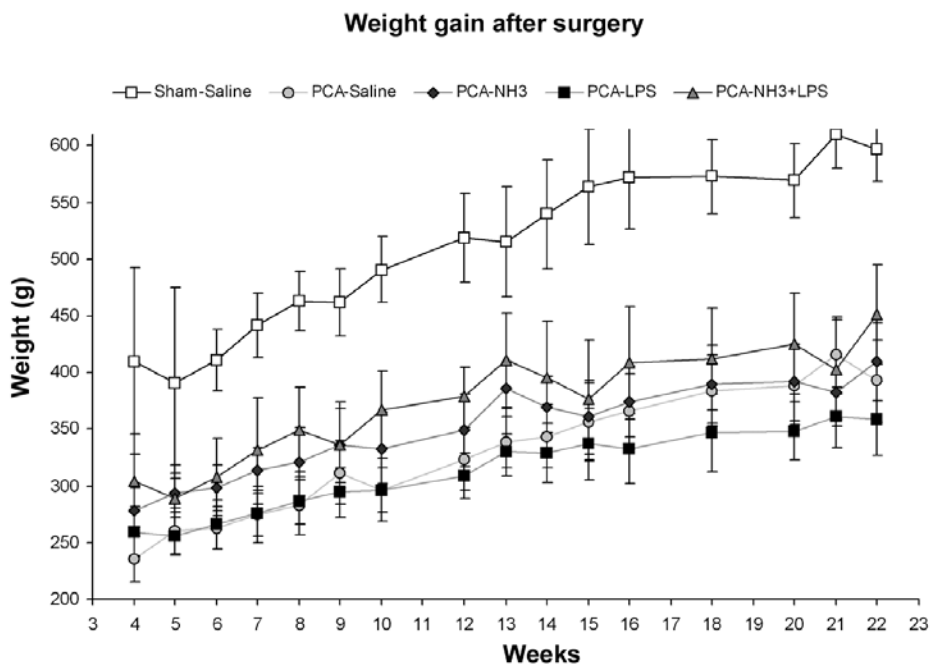


Figura 16. Evolución del peso durante el período en el que se simularon los episodios.

Figura 17

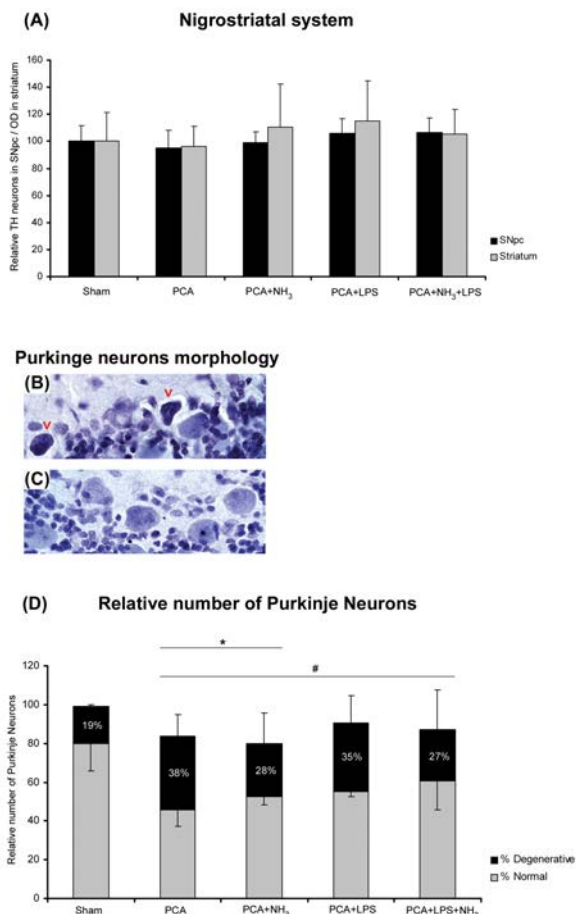


Figura 17. Análisis estereológico de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y las neuronas de Purkinje en cerebelo. (A) Número relativo de neuronas dopaminérgicas en SNpc (barra negra) y densidad óptica de prolongaciones dopaminérgicas en estriado (barra gris). (B) Imagen representativa de las neuronas de Purkinje normales en el grupo PCA+NH₃. (C) Imagen representativa de neuronas de Purkinje con características degenerativas (flechas rojas) en el grupo PCA+NH₃. (D) El diagrama de barras representa el número relativo de neuronas de Purkinje. La barra gris corresponde a las neuronas de Purkinje normales y la barra negra a las células degenerativas (expresadas en relación al número total de células de Purkinje). * $P \leq 0.05$ número total de neuronas de Purkinje vs sham. # $P \leq 0.05$ neuronas de Purkinje normales vs sham. PCA, anastomosis portocava; LPS, Lipopolisacárido; SNpc, pars compacta de la sustancia negra; TH, tirosina hidroxilasa.

Figura 18

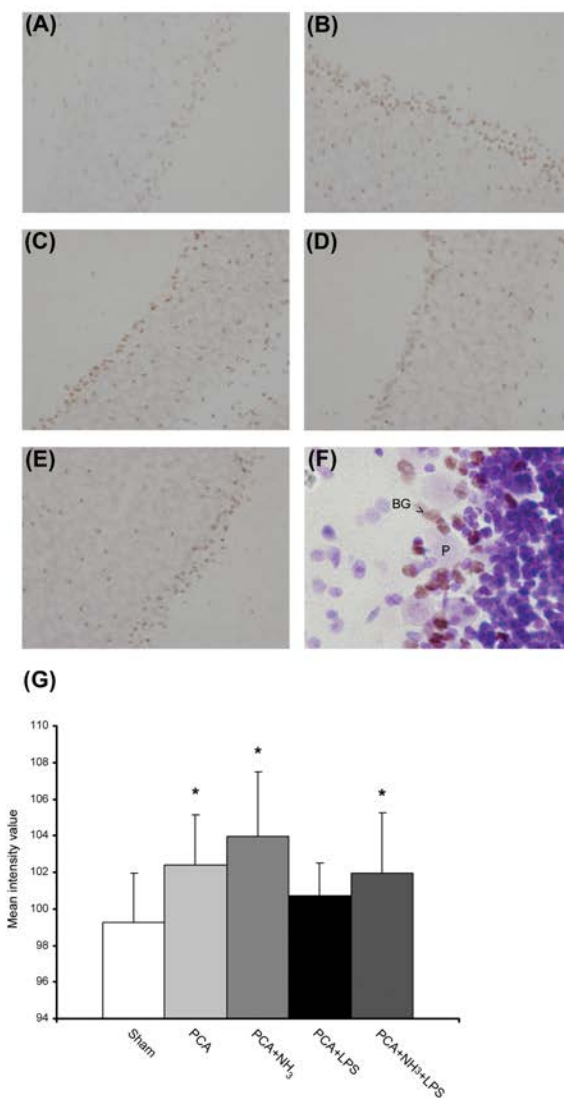


Figura 18. Apoptosis de la glía de Bergman (A-G) Imágenes representativas del marcaje inmunohistoquímico de la caspasa-3 activa (20x) (A) Sham. (B) PCA (C) PCA+NH₃ (D) PCA LPS (E) PC +NH₃+LPS. (F) Imagen representativa del inmunomarcaje de caspasa-3 activa y contrateñido con Nissl, la tinción doble muestra la muerte celular de la glía de Bergman (flecha BG) en la capa de células de Purkinje (P), objetivo 60x. (G) El diagrama de barras representa el valor medio de intensidad de marcaje de la caspasa-3 activa. * $P \leq 0,05$ vs sham. PCA, anastomosis portocava; LPS, lipopolisacárido.

Figura 19

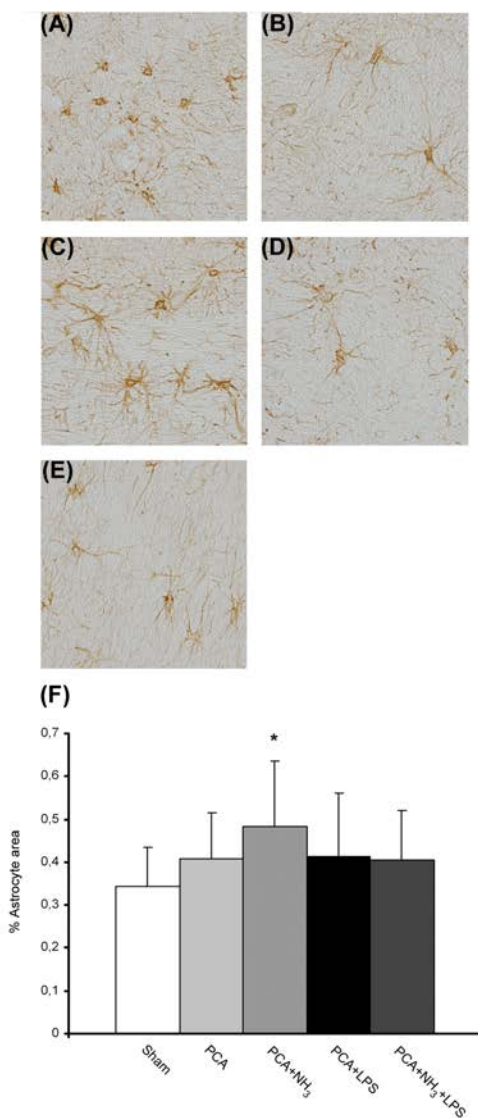


Figura 19. Astrocitos reactivos en el cerebelo en el modelo de HE episódica (A-E) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica con GFAP (40x) (A) Sham (B) PCA (C) Fenotipo activado PCA+NH₃ (flecha) (D) PCA+LPS (E) PCA+NH₃+LPS (F) Cuantificación de la superficie marcada con GFAP dividida entre el número de astrocitos por imagen (a lo largo de todo el cerebelo). *P ≤ 0.05 vs sham. PCA, anastomosis portocava; LPS, lipopolisacárido.

Figura 20

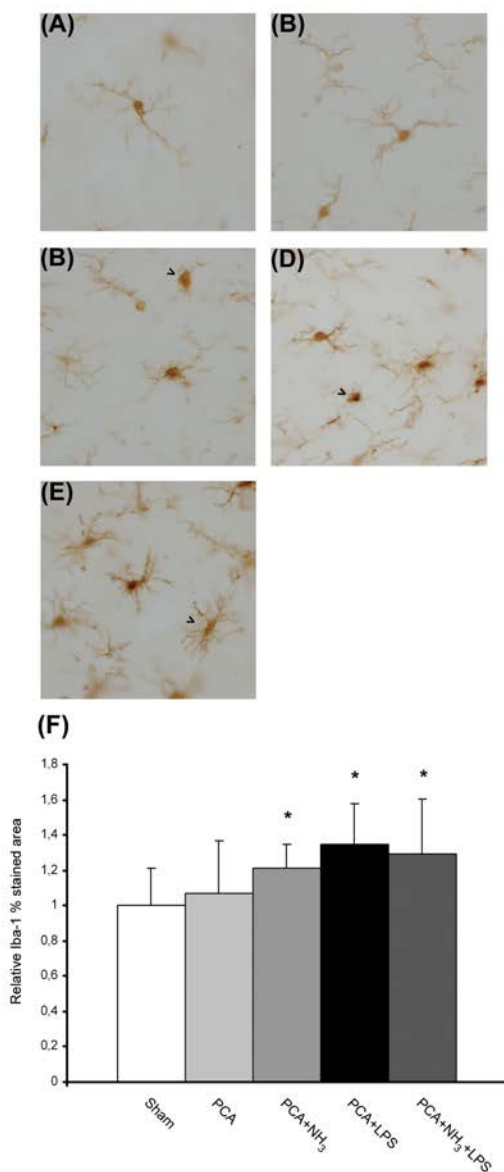


Figura 20. Activación de la microglía en el cerebelo en el modelo de HE episódica. (A-E) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica con Iba-1(40x). (A) Sham (B) PCA (C) Fenotipo activado en el grupo PCA+NH₃ (flecha) (D) Fenotipo activado en el grupo PCA + LPS (flecha). (E) Fenotipo activado en el grupo PCA+NH₃+LPS (flecha) (F) Cuantificación del área marcada contra Iba-1 (a lo largo de todo el cerebelo) * $P \leq 0.05$ vs sham. PCA, anastomosis portocava; LPS, lipopolisacárido.

Figura 21

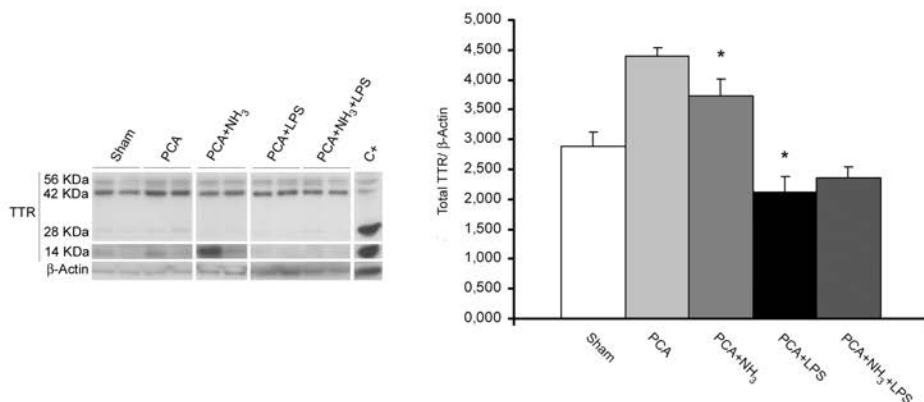


Figura 21. Western blot de Ttr total en el cerebelo La proteína Ttr total se cuantificó como la suma de los monómeros (14 kDa), los tetrámeros (56 kDa) y las formas intermedias (28 kDa; 42 kDa) se usó β-actina como control de carga. Como control positivo se empleó un extracto de proteína total de hígado El diagrama de barras representa la media de la cuantificación de los niveles de proteína Ttr total del western-blot por triplicado. * $P \leq 0,05$ vs sham; PCA, anastomosis portocava; LPS, lipopolisacárido; Ttr, transtiretina.

5. DISCUSIÓN

La enfermedad hepática crónica es un proceso de destrucción progresiva del parénquima hepático que desencadena fibrosis y cirrosis. El avance de la patología está frecuentemente asociado con la aparición de hipertensión portal, fallo hepático y el desarrollo de las complicaciones de la cirrosis. Mejorar el conocimiento de la fisiopatología de la CLD y las complicaciones asociadas, así como de los mecanismos subyacentes, es esencial para el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y terapéuticas, y esto depende en gran medida del desarrollo de modelos animales sólidos y reproducibles.

El uso animales como modelos para el estudio de la anatomía y la fisiología humana comenzó ya en la antigua Grecia¹⁰⁵. Aristóteles, por ejemplo, ya estudió la embriogénesis y la ontogenia en pollos¹⁰⁵. Desde entonces las técnicas en el campo de la biomedicina han experimentado una gran evolución, sin embargo, el uso de modelos animales, especialmente roedores, sigue siendo imprescindible. Las principales ventajas de los modelos animales son la posibilidad de controlar o reducir variables que no pueden ser controladas en humanos y permitir el estudio del órgano completo en interacción con todo el organismo¹⁰⁶. Sin embargo, cuestiones éticas y las diferencias que ocasionalmente existen en la patogénesis entre animales y humanos limitan su uso para el estudio de algunas enfermedades. En el campo de la hepatología, hasta el momento, no existe ningún modelo que recapitule todas las características de la patogénesis en humanos y los modelos actuales se basan en simular características concretas de la enfermedad hepática humana¹⁰⁷.

Esta tesis doctoral consiste en el desarrollo de dos nuevos modelos animales y su aplicación en la investigación de mecanismos fisiopatológicos asociados con la enfermedad hepática crónica. En el

primer estudio se evalúa el papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de la hipertensión portal en NASH. En este se muestra por primera vez que la IM tiene un papel clave en la patogénesis de la PH, independientemente de la fibrosis. En el segundo estudio exploramos el proceso neurodegenerativo consecuencia de la encefalopatía hepática. En él se aporta la primera evidencia de que los episodios de encefalopatía desencadenan procesos, no reversibles, de degeneración y muerte de las neuronas de Purkinje en el cerebelo.

Nuevo modelo animal para el estudio de hipertensión portal y la disbiosis en NASH

En los últimos años la creciente prevalencia de NASH ha potenciado la necesidad de desarrollar nuevos modelos animales capaces de reflejar, en periodos cortos de tiempo, tanto los cambios metabólicos como los cambios histológicos característicos de las diferentes etapas de los pacientes con NASH. Sin embargo, y a pesar de la gran disponibilidad de modelos de NASH, la mayoría no han sido caracterizados para su uso en el estudio de la hipertensión portal y la disbiosis. Los estudios experimentales previos que evalúan PH en NAFLD/NASH se basan en modelos dietéticos no fisiológicos (dieta MCD) que no presentan resistencia a la insulina^{88,89} o en modelos cortos que no consiguen desarrollar completamente las características histológicas del NASH⁹⁰.

Desde este punto de vista, nosotros hemos generado, un modelo dietético que tras 8 semanas siguiendo una dieta rica en grasa suplementada con una bebida de glucosa y fructosa desarrolla obesidad, resistencia a la insulina y NASH histológico. Además, los animales sometidos a esta intervención dietética presentaban hipertensión portal de grado similar al obtenido con un modelo PVL-16G^{46,95} sin cambios en

otros parámetros hemodinámicos. La dieta, sin embargo, no provocó fibrosis ni activó mecanismos pro-fibrogénicos (α -SMA, colágeno tipo 1 alfa1 [COL1A1]). Esta ausencia de fibrosis limita el uso del modelo al estudio de NASH en sus etapas más tempranas, lo cual presenta la ventaja de permitir el estudio de la PH y sus mecanismos sin la interferencia de los cambios estructurales provocados por la fibrosis o los factores extrahepáticos de los modelos clásicos de PH. Por otro lado, la HFGFD provoca una disminución de la diversidad de especies bacterianas asociada con una disminución de la abundancia de *Firmicutes* y un aumento de la de *Bacteroidetes*. Estos datos confirman que nuestro modelo reproduce también el patrón de IM disbiótica encontrado en pacientes obesos¹⁰⁸ y otros modelos animales^{109,110}, y lo valida para su uso en los posteriores experimentos de trasplante fecal.

Los mecanismos que podrían dirigir la PH en estas etapas tempranas de NASH se desconocen, pero se hipotetiza que podría ser debido a los cambios estructurales provocados por la propia esteatosis^{87,88} y/o la disfunción endotelial^{89,90}. Nuestros resultados sugieren que el aumento de presión portal en ratas HFGFD podría ser debido a cambios en el fenotipo vascular hepático mediados por el efecto de la resistencia a la insulina. La disfunción endotelial y la resistencia hepática a la insulina se evidenciaron por la reducción de los niveles de P-eNOS y P-Akt, respectivamente. P-eNOS se considera un marcador secundario de disfunción endotelial que, como señalan diversos estudios, correlaciona con la respuesta *ex vivo* a señales vasodilatadoras^{90,111-114}. Por otro lado, también se ha descrito que una de las vías reguladoras de la actividad de eNOS es la cascada de señalización intrahepática de la insulina (sustrato 1 del receptor de insulina [IRS] - PI3K - Akt), un mecanismo frecuentemente alterado en pacientes con NASH¹¹¹ y que

también lo está en nuestro modelo. Estos resultados destacan la relevancia de la disfunción endotelial frente a otros factores, como la fibrosis, en el desarrollo de PH en las etapas tempranas de NASH y abre la posibilidad de considerar la disfunción endotelial y la PH como biomarcadores o dianas terapéuticas en NASH precoz.

Una vez desarrollado y caracterizado el modelo, evaluamos, a través de experimentos de trasplante fecal, el papel que podía ejercer la microbiota intestinal en el desarrollo de la hipertensión portal en el contexto específico de NASH. Se sabe que la IM tiene gran importancia en la patogénesis de las enfermedades hepáticas. En concreto, en NAFLD/NASH se ha visto como tiene gran influencia en el desarrollo de esteatosis, inflamación o fibrosis^{92,93,115,116}. Nuestros resultados muestran como el trasplante de una microbiota intestinal sana (procedente del grupo control) en el grupo HFGFD provoca la normalización de la PH y una reducción de la IHVR. Esta mejoría parece ser independiente del grado de esteatosis, inflamación y/o fibrosis, ya que estos parámetros no se vieron modificados tras el trasplante. Por el contrario, sí que se observaron variaciones en marcadores moleculares que sugieren una recuperación de la respuesta vasodilatadora en el endotelio vascular hepático en el grupo HFGFD después del trasplante (restablecimiento de los niveles de P-eNOS). Esta recuperación, además, parece estar mediada por la sensibilización intrahepática a la insulina, caracterizada por el incremento en los niveles de P-Akt. Así, este estudio constituye una prueba de concepto que muestra por primera vez que la disbiosis tiene una influencia directa en el desarrollo de PH en el contexto específico de NASH y destaca el papel de la IM en la modulación de la resistencia a insulina hepática y el fenotipo vascular. Una de las limitaciones más claras del trasplante de IM es su improbable efecto a

largo plazo, dado que mantener la dieta original acabaría provocando de nuevo disbiosis.

Un mecanismo por el que la IM podría modular la capacidad vasodilatadora del endotelio hepático es la regulación del metabolismo los ácidos biliares. Por ello exploramos la vía de FXR. La vía de FXR se considera actualmente como una de dianas terapéuticas más relevantes en NASH¹¹⁶⁻¹¹⁸. En modelos de enfermedad hepática avanzada (BDL) se ha demostrado como el uso de agonistas de FXR puede reducir la PP y la disfunción endotelial¹¹⁹. Nosotros observamos que el grupo HFGFD presentaba activación intestinal de esta vía, activación que se veía parcialmente revertida después del trasplante fecal eubiótico. El papel de los ácidos biliares en NASH es complejo y todavía controvertido. Algunos estudios han identificado que la inhibición selectiva de FXR intestinal mejora la resistencia a la insulina en modelos de NASH¹¹⁶, lo cual va en la línea de los resultados de este estudio. Todos estos datos permiten inferir que el trasplante de IM, a través de modificaciones en los ácidos biliares, habría podido activar la vía de FXR a nivel intestinal, que a su vez podría haber actuado directamente sobre la modulación del fenotipo vascular hepático o, indirectamente, a través de la regulación de la resistencia a la insulina intrahepática. Paralelamente observamos que no había alteraciones en los marcadores moleculares de integridad de la barrera intestinal, sugiriéndose que los cambios son independientes a la translocación bacteriana. Estos datos abren nuevas perspectivas en la relación entre la IM y la PH y dan pié a seguir investigando para conocer el mecanismo exacto y otros posibles moduladores del efecto.

Nuevo modelo animal para el estudio de neurodegeneración en encefalopatía hepática episódica.

En las etapas más avanzadas de la CLD es común la aparición de episodios múltiples de HE desencadenados por diferentes factores precipitantes. Los modelos animales disponibles para el estudio de la encefalopatía hepática simulan diferentes características de la HE aguda o mínima, pero no existe ningún modelo experimental que simule la HE episódica, la forma más frecuente en pacientes. Para simular esta condición realizamos administraciones periódicas de NH_3 y/o LPS, dos de los factores precipitantes más importantes, en ratas previamente sometidas a una cirugía PCA.

La validación de los episodios se hizo basándose en el análisis de los niveles de amonio y/o citoquinas alcanzados en sangre 3h después de las administraciones, así como de una evaluación neurológica basada en un test de reflejos motores innatos. Las infusiones de NH_3 provocaron un aumento transitorio de este compuesto en sangre, incremento que alcanzó proporciones comparables a las observadas en pacientes con HE^{120,121}. Además, la hiperamonemia producida tras las infusiones estuvo acompañada de alteraciones, también intermitentes, de los reflejos motores. Estas características confieren al modelo la capacidad de simular las anomalías en la función motora observada en el curso de los episodios de HE en humanos, convirtiéndolo en una herramienta potencial para el estudio fisiopatológico de la HE episódica. Por otro lado, la administración combinada de NH_3 y LPS no fue capaz de reproducir los efectos sinérgicos que la hiperamonemia y la inflamación provocan en pacientes¹²². En este grupo el aumento de NH_3 y citoquinas fue inferior al observado en las infusiones independientes y resultaron

incapaces de desencadenar alteraciones motoras. La falta de sinergia en los efectos de los dos factores precipitantes supone una de las principales limitaciones de este estudio. Hemos hipotetizado que la ausencia de efecto sinérgico podría ser debida a que dosis bajas de LPS parecen activar la síntesis de urea en ratas¹²³, pudiendo reducirse así los niveles y los efectos tóxicos del NH₃ en sangre. Esto apoyaría lo que algunos estudios apuntan y es que los niveles de amonio correlacionan con el grado de encefalopatía¹²⁴.

Una vez caracterizado el modelo, examinamos la presencia de neurodegeneración en estructuras motoras mediante técnicas estereológicas. De esta manera, cuantificamos el número de neuronas en la sustancia negra y el cerebelo, dos estructuras relacionadas con el control motor que presentan especial susceptibilidad al estrés oxidativo y la hiperamonemia^{125,126}. Identificamos una reducción del número total de neuronas de Purkinje en el cerebelo en los grupos PCA y PCA+NH₃. Al mismo tiempo, detectamos la presencia de neuronas en proceso degenerativo. Las neuronas en estado degenerativo era inidentificables porque presentaban una morfología similar a las encontradas en la ataxia espinocerebelar tipo 31: tamaño reducido, citoplasma oscuro y núcleo deformado y oscuro¹²⁷. Esto nos llevó a contar de manera independiente las neuronas con morfología normal y las degenerativas, observando que todos los grupos con cirugía PCA presentaban una reducción significativa de neuronas de Purkinje funcionales. Al mismo tiempo encontramos algunas neuronas de Purkinje con una morfología similar a la del proceso degenerativo en el grupo sham. Este hecho inesperado es atribuible a un fenómeno denominado *dark neuron*¹²⁸. Este artefacto afectaría de igual manera a todos los grupos por lo que los resultados permanecerían inalterados. Estos datos evidencian que la

hiperamonemia originada en el curso de la HE podría desencadenar un proceso de neurodegeneración y muerte en las neuronas de Purkinje del cerebelo. Sin embargo, no encontramos correlación entre el grado de hiperamonemia y el de daño neuronal, lo que podría ser debido a una excesiva duración de la PCA que, como hemos visto, por sí misma ya causa degeneración y parece haber enmascarado el efecto que las infusiones de amonio podrían tener en etapas más tempranas.

Al analizar posibles mecanismos involucrados en la degeneración cerebelosa observamos sobreactivación de la microglía y edema astrocitario. La presencia de microglía activada es un componente conocido y común en la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas^{129,130} y que también podría participar en el proceso degenerativo observado en este modelo. En HE la sobreactivación de la microglía, acompañada de disfunción astrocitaria se ha demostrado en diferentes modelos de fallo hepático agudo^{131,132} y crónico^{133,134}. Específicamente en modelos PCA a 6 meses el estado de la microglía en el cerebelo no se había analizado, aunque sí se habían identificado astrocitos reactivos y vacuolización¹³⁵. En nuestro modelo parece confirmarse que no sólo un estímulo inflamatorio, sino que también la hiperamonemia es capaz de activar a la microglía¹³². Paralelamente, detectamos presencia de apoptosis en la glía de Bergman en los grupos con hiperamonemia (PCA, PCA+NH₃, PCA+NH₃+LPS). La glía de Bergman es un tipo de astrocito estrechamente relacionado con las neuronas de Purkinje que participa en el mantenimiento de las sinapsis^{136,137}. Estudios anteriores también han observado como la glía de Bergman sufre alteraciones (aumento de inmunoreactividad frente a GFAP) durante las etapas más avanzadas de la CLD^{138,139}. Todos estos resultados permiten inferir que la hiperamonemia, mediante la activación

tanto de la microglía como de los astrocitos, podría promover mecanismos de muerte celular capaces de afectar a la glía de Bergman y las células de Purkinje.

La degeneración cerebelosa, incluyendo tanto pérdida de neuronas de Purkinje como gliosis, es detectada frecuentemente en pacientes cirróticos con enfermedad hepática alcohólica como consecuencia de las deficiencias nutricionales asociadas a la enfermedad. En nuestro modelo los animales mantienen una dieta equilibrada y su peso evoluciona favorablemente a lo largo de los 6 meses, por lo que la neurodegeneración no parece asociada a este factor. Además, esta degeneración cerebelosa no ha sido únicamente detectada en pacientes alcohólicos sino que también lo ha sido, con prevalencia similar, en otros pacientes cirróticos con enfermedad avanzada. Esto apunta a que otros mecanismos, independientes a las deficiencias nutricionales, podrían contribuir en esta neurodegeneración¹⁴⁰.

Finalmente, intentamos identificar alguna de las vías que podría estar mediando el proceso de degeneración cerebelosa y su posible relación con la gliosis. El *array* de expresión génica no evidenció ninguna vía canónica afectada, pero, sin embargo, sí que observamos modulación de diversos genes relacionados con procesos de inflamación, neurotransmisión y neurodegeneración. Entre estos genes afectados aparece el receptor de la serotonina 2C (Htr2c), sobre-expresado en el grupo PCA+NH₃ y relacionado con la transmisión serotoninérgica. Alteraciones en la expresión de este gen podrían asociarse con fallos de la neurotransmisión entre glía de Bergman y neuronas de Purkinje. Otros de los genes afectados son Lcn-2 y Ccl-2, sobreexpresados durante procesos inflamatorios y relacionados con las células gliales. Lcn-2 es secretado principalmente por los astrocitos y su sobreexpresión parece

promover muerte neuronal, movilidad y cambios morfológicos^{141,142}. Por su parte, Ccl-2 se ha asociado con declive neuronal en HE¹⁴³. Ambos podrían mediar en la muerte neuronal asociada a la gliosis en este modelo. En este análisis de expresión génica destacó la gran sobreexpresión de Ttr en el grupo PCA+NH₃. Ttr es una proteína transportadora homotetramérica a la que se le han establecido funciones opuestas. Por un lado, es conocido que los monómeros o pequeños oligómeros forman depósitos amiloides causantes de alteraciones neurológicas¹⁴⁴ y por otro lado se cree que podría tener un papel protector en Alzheimer¹⁴⁵. En este sentido, otros estudios han detectado la formación de agregados insolubles, en este caso de α -sinucleína, en ratas hiperamonémicas¹⁴⁶. Sin embargo, en nuestro modelo en los animales con sobreexpresión de Ttr no se detectan agregados ameloides (ni de α -sinucleína) por lo que se sugiere que ejecuta un papel protector, posiblemente como detoxificador del amonio.

Futuro de los modelos animales

Los modelos animales clásicos han permitido un gran avance en el conocimiento de las CLD. Sin embargo, han sido insuficientes para investigar todos los componentes implicados en su patogénesis. En este sentido, estos dos nuevos modelos son herramientas que nos han permitido investigar factores y mecanismos poco explorados hasta el momento en CLD y que podrían convertirse en un futuro en nuevas dianas terapéuticas. La dificultad de desarrollar modelos animales en enfermedades hepáticas viene dada por la complejidad del hígado y la falta de transferabilidad de los estudios a la enfermedad humana. De ahí que el futuro de los modelos animales pase por desarrollo de modelos humanizados que simulen mejor las condiciones del órgano humano. De

hecho, estas aproximaciones ya incluyen la expresión de genes humanos en animales transgénicos¹⁴⁷, la creación de órganos humanos artificiales¹⁴⁸ o la inoculación de microbiota humana en animales¹⁴⁹. Estos modelos suponen una herramienta muy atractiva para el estudio de las CLD y un avance en medicina translacional.

6. CONCLUSIONES

- En ratas, la ingesta de una dieta rica en grasa suplementada con una bebida de glucosa y fructosa durante 8 semanas es capaz de provocar las alteraciones metabólicas e histológicas observadas en pacientes con NASH, así como hipertensión portal y disbiosis.
- La IM ejerce una influencia directa en la patogénesis de hipertensión portal en NASH. En concreto, el trasplante fecal eubiótico es capaz de mejorar la PH.
- La resolución de la hipertensión portal podría estar mediada por el efecto que la IM sana tiene en el restablecimiento de la sensibilidad hepática a la insulina y la disfunción endotelial.
- En ratas, las administraciones periódicas de amoníaco consiguen desencadenar una pérdida transitoria de las capacidades neurológicas similares a las producidas durante el curso de la encefalopatía hepática episódica en pacientes.
- Los episodios repetidos de encefalopatía hepática y la hiperamonemia se asocian directamente con degeneración y muerte de las neuronas de Purkinje del cerebelo y la apoptosis de la glía de Bergman.
- Los dos nuevos modelos animales desarrollados y caracterizados constituyen herramientas útiles que permiten, por un lado, el estudio de mecanismos fisiopatológicos no explorados previamente y, por otro, abren nuevas perspectivas terapéuticas.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Los modelos experimentales se desarrollaron en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, L'Arbresle Cedex, France) que al inicio de los experimentos pesaban entre 200 y 220 g. Los animales fueron alojados en jaulas de policarbonato en condiciones de estabulación estándar: ciclo 12h/12h de luz/oscuridad, temperatura constante de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad del 50%. La dieta seguida en el Estudio I: papel de la microbiota intestinal en PH y NASH, aparece detallada en el apartado 7.1.1. Los animales del Estudio II: neurodegeneración en HE, se alimentaron *ad libitum* con pienso estándar (Teklad 2014, Harlan laboratories, Indianapolis, IN, USA) y agua. Todos los procedimientos siguen las guías éticas establecidas por la comisión Europea para el uso de animales en experimentación y otros fines científicos. Los experimentos fueron aprobados por el comité de experimentación animal del Instituto de investigación de Vall d'Hebron (VHIR, Barcelona) y desarrollados en las instalaciones del VHIR.

7.1. ESTUDIO I:

PAPEL DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN HIPERTENSIÓN PORTAL Y NASH

7.1.1. Intervención dietética

Durante 8 semanas los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta rica en grasa suplementada con una bebida de glucosa y fructosa o con una dieta control y agua. La dieta HFGFD (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) tiene un aporte calórico de 5.3 Kcal/g y está compuesta por un 30% de grasas, la mayor parte saturadas (mantequilla, aceite de coco, aceite de palma y grasa de vaca), también

contiene colesterol añadido a la formulación original (1g/kg) y esta suplementada con una bebida con alto contenido en glucosa y fructosa (42g/L, 45% glucosa-55% fructosa) que aporta 157.72 Kcal/L. La dieta control aporta 2.89 Kcal/g y está compuesta por pienso a base de grano con un 4% de grasas (Teklad 2014, Harlan laboratories, Indianapolis, IN, USA) y como bebida agua.

7.1.2. Trasplante de microbiota intestinal

El trasplante de microbiota intestinal se realizó después de las 8 semanas de intervención dietética. Los grupos experimentales aparecen detallados en el apartado 3.4. El protocolo de trasplante comienza con la administración oral de Omeprazol® (50 mg/Kg/día) una vez al día durante los tres días previos a la descontaminación intestinal. La preparación de Omeprazol® para la administración oral en ratas requiere de la trituración y filtrado del contenido de las cápsulas comerciales. El cuarto día, se somete a los animales a un vaciado intestinal (descontaminación intestinal), para ello se les mantiene individualizados en jaulas con rejillas de ayuno para evitar la coprofagia y se les administra por vía oral dos dosis del laxante citrafleet® (picosulfato de sodio, 0.16mg/mL), la primera de 1ml 24h antes del trasplante y la segunda de 2ml 12h antes. Las dos administraciones de citrafleet se acompañan de 2ml de agua para asegurar la hidratación. Durante las 24h que dura el proceso de descontaminación intestinal los animales se mantienen en ayuno pero con acceso a agua. La recolonización intestinal se realiza por vía oral con una sonda desechable (Biochrom Ltd, Cambridge, UK), para ello se resuspenden 100mg de heces en 2ml de tampón fosfato salino (PBS) estéril (**Figura 22**). Las heces se

mantiene congeladas a -80°C hasta su resuspensión, que se hace evitando el uso del vórtex.

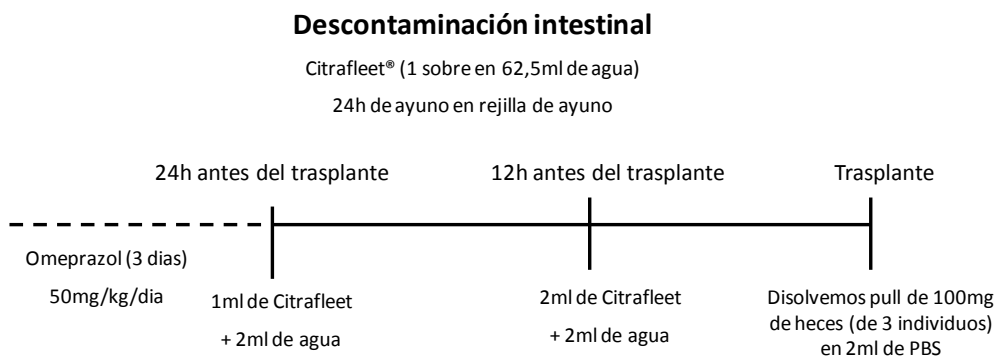


Figura 22. Diagrama temporal del proceso de descontaminación intestinal y trasplante.

7.1.3. Análisis de la microbiota

El análisis de la microbiota intestinal se realizó en muestras basales (de la etapa 1), después de la intervención dietética (de las etapas 1 y 2) y a punto final (12-14 días después del trasplante, etapa 2). Para la extracción de DNA se siguió el método Godon. Cada muestra fue resuspendida en $250\mu\text{l}$ de guanidina tiocianato (Tris 0.1 M, pH 7.5), $40\mu\text{l}$ de N-lauroilsarcosina al 10% y $500\mu\text{l}$ de N-lauroilsarcosina al 5%. El RNA se eliminó añadiendo $2\mu\text{l}$ de solución de *RNase* 10 mg/ml y el DNA se extrajo mediante disrupción mecánica de la pared bacteriana y recuperación a través de la precipitación con alcoholes. Una vez recogido el DNA se cuantificó con nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA) y se examinó la integridad utilizando Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

El DNA genómico extraído se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región hipervariable V4 del gen 16S rRNA de bacteria y arquea. El análisis realizado con el software Primer Prospector predijo que el cebador (*primer*) V4 utilizado en este estudio puede amplificar casi el 100% de los dominios bacteria y arquea. El extremo 5' del sentido (*forward*, V4F_515_19: 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') y del antisentido (*reverse*, V4R_806_20: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') de los cebadores dirigidos al gen 16S fueron etiquetados con las siguientes secuencias específicas:

- 5'-{AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATGGTAATTGT}
{GTGCCAGCMGCCGCGGTAA}-3'
- 5'-{CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT} {Golay barcode}
{AGTCAGTCAGCC}{GGACTACHVGGGTWTCTAAT}-3'

Los identificadores de *multiplex* conocidos como Códigos de Golay están formados por 12 pares de bases que hibridan específicamente en la dirección 3' (*downstream*) con respecto a la secuencia antisentido del cebador (V4R_806_20).

La PCR se realizó utilizando 0.75 unidades de la Taq polimerasa (Roche, Basel, Switzerland) y 20 pmol/ μ l de los cebadores sentido y antisentido y el termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). El programa de amplificación fue: 3min a 94°C seguido de 35 ciclos de 94°C durante 45sec, 56°C durante 60sec, 72°C durante 90sec y un ciclo final de 72°C durante 10min. Los amplicones se purificaron con QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Venlo, Nederland), se cuantificaron con NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer

y se mezclaron a concentraciones iguales. La mezcla de amplicones (2nM) se secuenció con Illumina MiSeq technology (San Diego, CA, USA) en la unidad de soporte técnico de la Universidad Autónoma de Barcelona siguiendo los protocolos estándar.

7.1.4. Estudios hemodinámicos

El registro de las medidas hemodinámicas se realizó bajo anestesia intraperitoneal con ketamina (100 mg/Kg) y midazolam (5 mg/kg), manteniendo la temperatura corporal del animal constante a 37°C. Las medidas se registraron a través de la unidad de adquisición de datos PowerLab (Harvard apparatus, Holliston, MA, USA) y el software Chart 5.0. La presión arterial media (MAP) se midió mediante la canulación de la arteria femoral y la PP mediante la canulación de la vena ileocólica, en ambos casos se emplearon catéteres de polietileno PE50 conectados a transductores de presión de alta sensibilidad (Harvard apparatus, Holliston, MA, USA). El flujo sanguíneo de la arteria mesentérica superior (SMABF, mL/[min*100g]) y el flujo sanguíneo portal (PBF, mL/[min*100g]) se midieron a través de una sonda perivascular ultrasónica de 1mm de diámetro (transonic systems Inc, Ithaca, NY, USA) recubierta de gel ecográfico para facilitar la transmisión de la señal. La resistencia de la arteria mesentérica superior (SMAR) se calcula como $[MAP-PP]/SMABF$ (mmHg/mL*min*100g) y la IHVR mediante la fórmula PP/PBF (mmHg/mL*min*100g).

7.1.5. Análisis bioquímico de muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron recogidas en ayunas, inmediatamente después del registro de los parámetros hemodinámicos, por la vena cava. Una de las muestras de sangre se recogía en tubo de plástico sin

anticoagulante (Plus BD Vacutainer[®], Franklin Lakes, NJ, USA) para ser analizada mediante técnicas estándar en el laboratorio CORE de Vall d'Hebron. Los parámetros analizados fueron: glucosa, creatinina, bilirrubina, ALT, AST, colesterol, HDL, LDL, triglicéridos y albúmina. Otra muestra se recogía en un tubo eppendorf y se centrifugaba a 4000g a 4°C durante 10 min. De aquí se recogía el suero y se almacenaba a -20°C para el análisis posterior de los niveles de insulina. La insulina se cuantificó siguiendo el protocolo del kit comercial de Elisa (EMD Millipore, Billerica, MA, USA), las lecturas de la placa se realizaron a 450 nm y 590 nm con el espectrofotómetro Synergy MX (Biotek, Winooski, Vermont, USA) y software Gen 5 v2.0 utilizando una función logística de 4 parámetros, tal y como sugiere el fabricante. La resistencia a la insulina se estimó aplicando el HOMA-IR que se calcula con la siguiente fórmula: $\text{Insulina en ayunas (ng/ml)} * \text{glucosa en ayunas (mg/dl)} / 405$.

7.1.6. Análisis histológico de NASH y fibrosis

Las muestras de hígado, dentro de un casete, se fijaron en PFA 4% durante 24h y se pasaron a una solución de etanol 50%. Los siguientes pasos de deshidratación, la inclusión en bloques de parafina, los cortes histológicos (4 μ m) y la tinción de hematoxilina-eosina (H&E) fueron realizados por la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron. En estas secciones histológicas también se realizó la tinción de picrosirio rojo que, resumidamente, consiste en la tinción de las muestras con rojo picrosirio 0.1% durante 1h en agitación suave a temperatura ambiente, seguido de dos lavados de 5 min con agua acidificada, secado de los portaobjetos y montaje con DPX. La tinción H&E permite la evaluación del parénquima hepático mientras que la tinción de rojo picrosirio se utiliza para evaluar la fibrosis. Todas las

muestras fueron evaluadas por un patólogo experto en hígado y ciego a la intervención realizada en los animales. El patólogo estableció el diagnóstico de NASH en función de la presencia del patrón característico de la enfermedad, que incluye la coexistencia de esteatosis, balonización hepatocitaria e inflamación de predominio lobulillar. Se puntuó el grado de esteatosis, balonización e inflamación de acuerdo con el sistema *NASH-clinical research network (CRN)*¹⁵⁰. La suma de puntuaciones estos tres componentes, denominada *NAFLD activity score (NAS)*, nos clasifica la patología según su severidad, siendo imprescindible para el diagnóstico de NASH no sólo que la suma de puntuaciones sea superior a tres sino también que se dé la presencia de los tres componentes. La fibrosis fue clasificada de F0 (no fibrosis) a F4 (cirrosis) según el sistema NASH-CRN.

7.1.7. Extracción proteica y Western blot

Para el análisis de proteínas hepáticas se perfundió hígado con suero salino para eliminar la sangre. Las muestras se congelaron directamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Estas muestras se trituraron en frío, evitando su descongelación, hasta convertirlas en polvo, se homogeneizaron en tampón de lisis con tritón, se sonicaron en 3 ciclos de 10seg a máxima potencia y finalmente se centrifugaron a 14.000 rpm y 4°C durante 10min. El sobrenadante se recogió y la proteína total se cuantificó con el kit de ensayo BCA (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA), leyendo la reacción colorimétrica con nanodrop.

La electroforesis se realizó utilizando el sistema *XCell SureLock®* en geles de SDS-poliacrilamida 10%, cargando 40µg de proteína por muestra. La transferencia se realizó con el módulo *blot XCell II™* en

membranas de PVDF con poro de 0.45 μ m (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA). Al finalizar la transferencia las membranas se bloquearon durante 1h a temperatura ambiente con leche desnatada 5% o con *phosphoblocker* 5% (Cell biolabs, San Diego, CA, USA) para proteger las proteínas fosforiladas. Los anticuerpos primarios y secundarios empleados, así como las diluciones y tiempos de incubación aparecen detallados en la **Tabla 6**. Las membranas se revelaron con el kit *ECL prime* (GE Healthcare; Little Chalfont, UK) en el sistema de imagen Odyssey®Fc (LI-COR, Lincoln, NE, USA) y se cuantificaron con *Image Studio Lite* (Lincoln, NE, USA). En los casos en los que se analizó la proteína fosforilada y la total o en los que se reveló en la misma membrana dos proteínas con peso molecular similar, las membranas se incubaron con Restore™ WB Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) durante 30 min a 55 °C, para eliminar los anticuerpos previos. Después de éste proceso la membrana se debe bloquear de nuevo.

Anticuerpos primarios					
Proteína	PM (KDa)	Especie AC	Fabricante	Dilución	Incubación*
eNOS	140	Ratón	BD Transduction Labs.	1/500	O/N
P-eNOS	140	Conejo	Cell Signaling	1/250	O/N
Akt	60	Ratón	Cell Signaling	1/1000	O/N
P-Akt	60	Conejo	Cell Signaling	1/500	O/N
KLF2	37	Cabra	Santa Cruz	1/200	1h o O/N
GAPDH**	36	Ratón	Ambion	1/5000	1h o O/N

La tabla continua en la siguiente página

Anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa			
Anticuerpo	Fabricante	Dilución	Incubación*
Anti-cabra IgG	GE Healthcare	1/30000	1h
Anti-conejo IgG	Cell Signaling	1/30000	1h
Anti-ratón IgG	Cell Signaling	1/30000	1h

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en Western-Blot en el Estudio 1. AC, Anticuerpo; O/N (overnight), durante la noche; Akt, proteína quinasa B; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; KLF2, factor 2 Krüppel-like; GAPDH, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.*La incubación de 1h se realiza a temperatura ambiente y O/N a 4°C. **Control de carga

7.1.8. Extracción de RNA y PCR a tiempo real

Para el análisis del RNA mensajero (mRNA) las muestras de hígado e íleon se mantuvieron en *RNAlater* (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA) al menos 24h y después se almacenaron a -80°C. La lisis del tejido (aprox. 30mg) previa a la extracción de RNA se hizo con tubos *Fastprep lysis matrix D* (MP Biomedical, Santa Ana, CA, USA) y el sistema FastPrep FP120. El RNA total fue extraído usando el kit *RNeasy mini* (QIAGEN, Venlo, Nederland) y la retrotranscripción a DNA complementario (cDNA) se realizó con el kit *High capacity cDNA reverse transcription* (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR a tiempo real se desarrollo en placas de 384 pocillos con todas las muestras por triplicado. Para cada reacción se añadió:

- a) Una mezcla de 4.5µl de *Taqman universal PCR master mix* más 0.5µl de la sonda específica, todas detalladas en la **Tabla 7**.
- b) 5µl de la muestra cDNA (40ng).

Para la cuantificación de la reacción se utilizó el sistema 7900HT Fast Real-Time PCR (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA) y para el análisis la aplicación on-line *ThermoFisher Cloud*.

Símbolo	Nombre completo	Otras nomenclaturas	Código
Actb*	<i>actin, beta</i>	Actx	Rn00667869_m1
Acta2	<i>Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta</i>	-	Rn01759928_g1
Col1a1	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>	COLIA1	Rn01463848_m1
Nos3	<i>nitric oxide synthase 3, endothelial cell</i>	eNos	Rn02132634_s1
Fgf19	<i>Fibroblast growth factor 19</i>	Fgf15	Rn00590708_m1
Fgfr4	<i>Fibroblast growth factor receptor 4</i>	-	Rn01441815_m1
Gapdh*	<i>GliceraldHEyde-3-phosphate</i>	BARS-38, Gapd	Rn99999916_s1
Gcg	<i>Glucagon</i>	GLP-1	Rn00562293_m1
Gpbar1	<i>G protein-coupled bile acid receptor 1</i>	Tgr5	Rn01400316_s1
Klf2	<i>Kruppel-like factor 2</i>	Lklf	Rn01420496_gH
Nr0b2	<i>Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2</i>	SPH	Rn00589173_m1
Nr1h4	<i>Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4</i>	Fxr	Rn00572658_m1
Ocln	<i>Occludin</i>	-	Rn00580064_m1
Tjp1	<i>Tight junction protein 1</i>	ZO-1	Rn02116071_s1

Tabla 7. Sondas de RT-PCR utilizadas en el Estudio 1. Todas las sondas están marcadas con el fluoróforo FAM-MGB. * Control endógeno.

7.1.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico se ejecutó con Sigmastat 3.0 (San Jose, CA, USA). Las variables continuas se expresaron como media \pm error estándar, las variables de frecuencia como n/N (%) y la significancia estadística se estableció en $p \leq 0.05$. Las comparaciones entre dos grupos se efectuaron con un test *t-student* o Mann-Whitney y entre más de dos grupos con *one-way* ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples Holm-Sidak. Para el análisis estadístico de la RT-PCR se

utilizaron los valores $\text{Log}_2^{(-\Delta\Delta\text{CT})}$ (es decir, una transformación matemática de $\Delta\Delta\text{CT}$ que no modifica el valor absoluto, pero que hace que las infraexpresiones se representen de 0 a $-\infty$ y las sobreexpresiones de 0 a $+\infty$).

El análisis estadístico de los datos de secuenciación del gen 16S de las muestras fecales se realizó en QIIME y R. Para trabajar con datos normalizados se analizó el mismo número de secuencias en todos los grupos. La comprobación de la normalidad de los datos se hizo con test Shapiro-Wilk. La comparación del número medio de secuencias de los grupos en los diferentes niveles taxonómico se hizo con un test *one-way* Kruskal-Wallis. Para la comprobación de las diferencias en la composición de las comunidades bacterianas se utilizó un test ANOVA multivariable no-paramétrico (NPANOVA) llamado test adonis. El cálculo de las posibles relaciones entre los diferentes géneros bacterianos y la variable de presión portal se realizó con un test de correlación Spearman no-paramétrico. Cuando fue posible se generaron los *p* valores corregidos por FDR (*False Discovery Rate*).

7.2. ESTUDIO II:

NEURODEGENERACIÓN EN ENCEFALOPATIA HEPÁTICA

7.2.1. Anastomosis portocava, cirugía *sham* e infusiones de amonio y/o LPS

La anastomosis porto-cava se basa en la derivación del flujo portal hacia la vena cava, para su realización se siguió el protocolo de Lee y Fisher¹⁵¹. La cirugía se realiza bajo anestesia con isoflurano y manteniendo la temperatura corporal a 37°C, el procedimiento comienza con el aislamiento y oclusión de la vena porta utilizando una pinza

hemostática, entonces se realiza una ligadura en la vena lo más cerca posible del hígado con seda 4/0 y se secciona. A continuación se ocluye la vena cava inferior por debajo y por encima de las venas renales, con pinza hemostática y pinza Satinski respectivamente. Bajo el microscopio se hace una abertura en la vena cava y se enlaza con la vena porta con una sutura de prolene 7/0. Finalmente se comprueba la correcta circulación sanguínea. La cirugía ficticia o *sham*, se basa en el aislamiento y oclusión de la vena porta durante 15 min.

Las infusiones de acetato de amonio (55 mmol/kg/min; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y/o LPS de *Klebsiella pneumoniae* (3 mg/kg; L4268; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) o vehículo (suero salino; Fresenius Kabi, Sevres, France) se realizaron por infusión continua (20µL/min; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) durante 3h mediante un catéter intraperitoneal permanente con una membrana en uno de los extremos. Para su colocación primero se realizaron 3 incisiones: 1) cavidad abdominal, 2) en la piel a la altura del glúteo mayor, 3) en la piel a la altura de la escápula. Con ayuda de una pinza mosquito se marcó un túnel en la piel para colocar el catéter, desde la cavidad abdominal hasta la escápula, dónde finalmente se fijó la membrana.

7.2.2. Cuantificación de los niveles de amonio y/o citoquinas en plasma

Se tomaron muestras de sangre antes y 3h después de las infusiones. Los niveles de amoniaco se determinaron por un método colorimétrico estándar en rutina clínica utilizando el analizador Cobas Integra (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Para el análisis de las citoquinas las muestras de sangre se centrifugaron a 1000g durante 20min, antes de los 30min posteriores a su recogida y se almacenaron a -20°C. La

determinación de IL-6, IL1 β y TNF- α se hizo mediante inmunoensayos ELISA (Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, USA) siguiendo el protocolo del fabricante.

7.2.3. Examen neurológico

7.2.3.1. Examen de reflejos

El examen de reflejos se efectuó antes y después de algunos de los episodios de HE siguiendo protocolo descrito por Zimmemann y col.¹⁵². Este examen consistió en la detección de la presencia o ausencia doce reflejos diferentes: de flexión, de enderezamiento (dcha. e izq.), de agarre, de colocación (en las cuatro patas), de equilibrio, corneal, auditivo de sobresalto y de sacudida de cabeza. La presencia de un reflejo correcto se puntuaba con un punto, por lo que 12 puntos suponían la ausencia de daño neurológico.

7.2.3.2. Examen de memoria

El test de memoria se ejecutó una semana después del último episodio de HE siguiendo el protocolo descrito por Bevins y Besheer¹⁵³. El examen de memoria requiere de una etapa de entrenamiento previo, en esta fase de familiarización los animales fueron expuestos de uno en uno a dos objetos idénticos (a) durante 10 min en un campo abierto. Una hora después se evaluaba la memoria a corto plazo exponiendo a los animales al objeto conocido (a) y a un nuevo objeto (b) durante 5 min. 24h después se valoraba la memoria a largo plazo exponiéndolos a un tercer objeto diferente (c) y al objeto conocido (a). El test era grabado en video para posteriormente medir el tiempo que invertía cada animal en explorar cada uno de los objetos (XNote Stopwatch), la exploración se definió como el contacto con la pata, el hocico o la boca. Los resultados

se expresaron por el ratio de discriminación, que se calcula como la interacción del animal con el objeto nuevo (b) o (c) dividido entre el tiempo de interacción total (a+b) o (a+c). La capacidad de reconocer objetos se refleja por un mayor tiempo interaccionando con el objeto nuevo, o lo que es lo mismo, por un ratio de discriminación superior a 0.5. Una memoria intacta supondría el mantenimiento de la capacidad de identificar los objetos ya conocidos e invertir más tiempo explorando los nuevos.

7.2.4. Morfología cuantitativa

Los animales se perfundieron primero con una solución salina heparinizada al 1% para eliminar la sangre y después con una solución de PFA al 4% (Merk, New York, USA). El encéfalo se post-fijó con PFA durante 24h y para su crioconservación se trato con sacarosa, finalmente se almacenó a -80°C . Utilizando un criostato (Leica CM3050S, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) se realizaron secciones coronales de $30\mu\text{m}$ de grosor recogiendo los cortes de todo el encéfalo. Los cortes se almacenaron a 4°C en placas de 48 pocillos conteniendo un tampón fosfato 0.1M y azida 0.01%.

7.2.4.1. Selección de cortes para morfología cuantitativa

Para el análisis de la SNpc se identificó el inicio y el final de la estructura y se seleccionaron cortes con una periodicidad de 1 de cada 6, incluyendo toda la región. Para el análisis del estriado se seleccionaron 3 cortes de la zona central con una distancia de 10 secciones entre ellos. La cuantificación de las neuronas de Purkinje del cerebelo se basó en la selección periódica de 1 de cada 24 cortes, incluyendo toda la

estructura. En el cerebelo, la microglía, los astrocitos y la glía de Bergman se estudiaron mediante la selección de 4 cortes equidistantes.

7.2.4.2. Inmunohistoquímica (IHQ) y tinción Nissl

La inmunohistoquímica para la detección de microglía, astrocitos y apoptosis en glía de Bergman se realizó en portaobjetos, y para el marcaje de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y del estriado se realizó en flotación.

La IHQ en portaobjetos requiere de la colocación previa de los cortes de tejido en portaobjetos (superfrost ultra plus, Menzel-Gläser, Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA). Aproximadamente 24h después, con los cortes ya secos se comienza el protocolo de IHQ: los portaobjetos se lavan en agitación en tampón tris salino (TBS; 1mM tris, cloruro sódico [NaCl] 1.5mM, pH 7.4, 5min), se bloquea la actividad peroxidasa endógena (3% H₂O₂, 10% metanol en TBS, 10 min) y se lavan de nuevo. Después, pasan por un tratamiento de recuperación de antígenos (*Antigen retrieval*; 10mM citrato, pH 6, 95°C, 1h), otro de permeabilización del tejido (0,25% tritón 100X en TBS, 5min) y bloqueo (5% suero normal de cabra [NGS], 30min). Finalmente se incuban con el anticuerpo primario (**Tabla 8**) disuelto en 2% de NGS a 4°C toda la noche y en cámara húmeda. Al día siguiente, se lavan los portaobjetos y se incuban con el anticuerpo secundario (Tabla 4) conjugado con biotina en 2% de NGS 1h a temperatura ambiente. Se vuelven a lavar los portaobjetos y se aplica durante 1h una solución de marcaje con peroxidasa (ABC standard peroxidase staining kit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Se lavan de nuevo y se transfieren a 3.3'-diaminobenzina (DAB) hasta que se desarrolla el color óptimo, en

ese momento se para la reacción con 3 lavados con TBS, se deshidrata el tejido en un gradiente de alcoholes y se hace el montaje con DPX.

La inmunohistoquímica en flotación se realiza en placas de 48 pocillos. A diferencia de la inmunohistoquímica en portaobjetos no se aplica ni tratamiento de recuperación de antígenos ni de permeabilización de tejido. La colocación de los cortes de tejido en portaobjetos se hace después del revelado con DAB. Una vez montados, se dejan secar toda la noche antes de deshidratar y fijar el cubreobjetos.

Anticuerpo primario					
	Diana	Especie AC	Fabricante	Dilución	Incubación
SNpc	TH	Conejo	Calbiochem	1/2000	48h
Estriado	TH	Conejo	Calbiochem	1/5000	48h
Cerebelo					
Microglia	Iba-1	Conejo	Wako Chemicals	1/1000	O/N
Astroцитos	GFAP	Conejo	Sigma-Aldrich	1/1000	O/N
G. Bergman (Apoptosis)	Caspasa-3	Conejo	Cell Signalling	1/600	O/N
Anticuerpo secundario-conjugado con biotina					
Anticuerpo	Fabricante	Dilución		Incubación	
		1/1000			
Anti-Conejo IgG	Vector laboratories	(excepto estriado 1/2000)			1h

Tabla 8. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunohistoquímica en el Estudio 2. SNpc, sustancia negra pars compacta; TH, tirosina hidrosilasa; Iba1, molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; AC, Anticuerpo; O/N (Overnigth), durante la noche.

La tinción Nissl marca estructuras del sistema nervioso en tejido fijado con PFA. Dicha tinción se utilizó para la identificación de las neuronas de Purkinje y como contratinción en la detección de las neuronas

dopaminérgicas de la SNpc. Los portaobjetos con el tejido ya colocado y secado se mantienen durante 1min en agitación en una solución de violeta de cresilo, después se deshidratan en un gradiente de alcoholes, se sumergen en xileno y se montan con el cubreobjetos.

7.2.4.3. Estereología sustancia negra pars compacta y cerebelo

La estereología permite cuantificar el número de células de una estructura en 3D a partir de sus secciones en 2D, estas secciones deben de incluir toda la estructura y ser equidistantes¹⁵⁴. El contaje se realizó a ciegas con un microscopio acoplado a una cámara y un ordenador con el software *Stereo Investigator* (version 7.00; MSF Bioscience-Micro Bright Field, Williston, USA). En primer lugar es necesario establecer los parámetros de contaje que determinan el tipo de contaje, el objetivo, el tamaño de los campos y la distancia entre ellos:

- SNpc: Fraccionador óptico, objetivo: 100x (aceite de inmersión), tamaño de cuadrícula: 50mm x 50mm, XY: 125x 100.
- Cerebelo: Fraccionador óptico, objetivo: 63x (aceite de inmersión), tamaño de cuadrícula: 125mm x 75mm, XY: 300x 300.

Después se delimita la zona de interés en la que el programa genera de manera automática y aleatoria campos de contaje. El contaje se basa en la identificación del núcleo y únicamente se tienen en cuenta las células cuyo núcleo se encuentra completamente dentro del campo o tocando las líneas verdes. Para evitar solapamientos se evalúa cuidadosamente todo el grosor de la sección (eje Z). Destacar que, en el cerebelo el contaje de las neuronas de Purkinje normales y degenerativas se realizó de manera independiente.

7.2.4.4. Análisis estriado

Los portaobjetos con los cortes de estriado ya teñidos se escanearon en transparencia y escala de grises con el programa *Launch Silverfast*. Para la cuantificación de la densidad óptica del área marcada se utilizó el programa Image J (version 1.45s; NIH, Bethesda; USA).

7.2.4.5. Análisis de microglía, astrocitos y glía de Bergman

La evaluación de la microglía, los astrocitos y la apoptosis en glía de Bergman se hizo a ciegas siguiendo las pautas descritas a continuación:

- Para el análisis de la microglía se tomaron 8 imágenes (200X) de cada uno de los 4 cortes que se seleccionaron en cada animal y se cuantificó el porcentaje de área ocupado.

- Para el análisis de astrocitos se tomaron 2 fotos (400X) de cada uno de los 4 cortes que se seleccionaron en cada animal y se estimó el aumento de volumen de los astrocitos calculando el porcentaje de área marcado con GFAP / número de astrocitos.

- Para el análisis de la apoptosis en la glía de Bergman se tomaron 4 fotos (200X) de cada uno de los 4 cortes en cada animal y se cuantificó la intensidad del marcaje en las imágenes.

El análisis de las imágenes se realizó con el programa Image J (version 1.45s; NIH, Bethesda; USA).

7.2.5. Microarray

Las muestras de cerebelo para la extracción de RNA se mantuvieron durante 24h en *RNAlater* (Life technologies, Carlsbad, USA), después se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. El lisado del tejido previo a la extracción de RNA se hizo homogeneizando 50-100mg

de tejido con trizol (Life technologies, Carlsbad, USA) y pasando el extracto por un homogeneizador (Omni international, Kennesaw, USA). Los homogenados obtenidos fueron incubados durante 5 min a temperatura ambiente para conseguir la completa disociación de las nucleoproteínas. Se añadió cloroformo, se centrifugó a 10.500 rpm durante 15min a 2-8°C y se recogió la fase acuosa. El protocolo de extracción de RNA total se continuó utilizando el kit Rneasy micro (QIAGEN, Venlo, Nederland) siguiendo las instrucciones del fabricante, al finalizar, la calidad y cantidad del RNA obtenido se analizó con *Bioanalyzer* (2100 bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

El perfil de expresión génica del cerebelo se evaluó mediante *Rat Gene 1.1 ST 24-array plate* (16,500 genes, Affimetrix, Santa Clara, USA) en la unidad de alta tecnología del VHIR. Los genes que presentaron una expresión diferencial de al menos el doble (ratio de expresión [fold change] >2) y que al analizarse con el programa *Ingenuity Pathway* (IPA[®], Qiagen, Redwood city, USA) parecían estar relacionados con procesos neurológicos se volvieron a cuantificar por RT-PCR.

Los niveles de expresión génica de los genes seleccionados se verificaron mediante RT-PCR (Life Technologies, Carlsbad, USA). La síntesis del DNA complementario y la RT-PCR se desarrollaron como se ha descrito previamente en el apartado 7.1.8 con las sondas que aparecen detalladas en la **Tabla 9**. Para la cuantificación de la reacción de RT-PCR se utilizó el sistema *ABI Prism 7000 SDS* (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA) y para el análisis el programa *SDS RQ manager*.

Símbolo	Nombre completo	Otras nomenclaturas	Código
Actb*	<i>beta-actin</i>	Actx	Rn00667869_m1
Ccl-2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>	MCP-1, Scya2, Sigje	Rn00580555_m1
Htr2c	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C, G protein-coupled</i>	5-HT2C, 5-HTR2C, 5HT-1C	Rn00562748_m1
Otx-2	<i>Homeobox protein OTX2-like</i>	-	Rn01414596_m1
Ttr	<i>Transthyretin</i>	Lr1, Tbpa	Rn01406102_m1

Tabla 9. Sondas de RT-PCR utilizadas en el Estudio 2. Todas las sondas están marcadas con el fluoróforo FAM-MGB. * Control endógeno.

7.2.6. Western-blot

Las muestras de cerebelo para el análisis de proteínas se congelaron directamente en metilbutano y se almacenaron a -80°C . El primer paso de la extracción proteica se realizó mediante la homogeneización de 50mg de tejido con tampón de lisis y homogeneizador manual. Los siguientes pasos del protocolo de extracción y cuantificación de proteínas están detallados en el apartado 7.1.7. El Western-blot se realizó utilizando el sistema de BioRad (Hercules, USA), para la electroforesis se utilizaron geles de poliacrilamida 12%, cargando $40\mu\text{g}$ del lisado proteico y para la transferencia se emplearon membranas de PVDF (BioRad, Hercules, USA). Las membranas se bloquearon durante 1h en leche desnatada 5% y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario Ttr (1/2000, Thermo Fisher, Waltham, USA) y como control de carga β -actina (1/25,000; Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA). El anticuerpo secundario (anti-conejo IgG o anti-ratón igG; 1/3000; Cell signaling, Danvers, USA) se incubó durante 1h a temperatura ambiente. La membrana se reveló en película quimioluminiscente (GE Healthcare; Little Chalfont, UK) con el kit *ECL prime* (GE Healthcare; Little Chalfont, UK) y las bandas se cuantificaron con Image J.

7.2.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se ejecutó con Sigmapstat 3.0 (San Jose, CA, USA), los datos se expresaron como media \pm desviación estándar y la significancia estadística se estableció en $p \leq 0.05$. Las comparaciones entre los grupos se efectuaron con *one-way ANOVA* seguido del test de comparaciones múltiples Holm-Sidak. Los resultados de los niveles de amonio y citoquinas en sangre comparando antes y después de las infusiones se analizaron mediante *two-way ANOVA*. Los datos del test de reflejos se resumieron en una tabla de contingencia y se analizaron con un test McNemar seguido del método Fisher.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Marchesini, G. *et al.* Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* **37**, 917–923 (2003).
2. Younossi, Z. M. *et al.* Changes in the Prevalence of the Most Common Causes of Chronic Liver Diseases in the United States From 1988 to 2008. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 524–530.e1 (2011).
3. Williams, C. D. *et al.* Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study. *Gastroenterology* **140**, 124–131 (2011).
4. Lazo, M. *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease and mortality among US adults: prospective cohort study. *BMJ* **343**, d6891–d6891 (2011).
5. Tilg, H. & Moschen, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* **52**, 1836–1846 (2010).
6. Liu, W., Baker, R. D., Bhatia, T., Zhu, L. & Baker, S. S. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 1969–1987 (2016).
7. Bugianesi, E. *et al.* Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia* **48**, 634–642 (2005).
8. Than, N. N. & Newsome, P. N. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis* **239**, 192–202 (2015).
9. Donnelly, K. L. *et al.* Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* **115**, 1343–1351 (2005).
10. Bugianesi, E., McCullough, A. J. & Marchesini, G. Insulin resistance: A metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* **42**, 987–1000 (2005).
11. Cohen, J. C., Horton, J. D. & Hobbs, H. H. Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science (80-.)*. **332**, 1519–1523 (2011).
12. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Selective versus Total Insulin Resistance: A Pathogenic Paradox. *Cell Metab.* **7**, 95–96 (2008).
13. Shetty, S., Kusminski, C. M. & Scherer, P. E. Adiponectin in health and disease: evaluation of adiponectin-targeted drug development strategies. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 234–239 (2009).
14. Purushotham, A. *et al.* Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. *Cell Metab.* **9**, 327–338 (2009).

15. Kim, J.-Y. *et al.* Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **117**, 2621–2637 (2007).
16. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87–91 (1993).
17. Kern, P. A. *et al.* The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest.* **95**, 2111–2119 (1995).
18. Fernandez-Real, J.-M. *et al.* Circulating Interleukin 6 Levels, Blood Pressure, and Insulin Sensitivity in Apparently Healthy Men and Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 1154–1159 (2001).
19. Senn, J. J., Klover, P. J., Nowak, I. A. & Mooney, R. A. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* **51**, 3391–9 (2002).
20. Park, E. J. *et al.* Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression. *Cell* **140**, 197–208 (2010).
21. Le Chatelier, E. *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**, 541–546 (2013).
22. Cotillard, A. *et al.* Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* **500**, 585–588 (2013).
23. Bosch, J., Berzigotti, A., Garcia-Pagan, J. C. & Abraldes, J. G. The management of portal hypertension: Rational basis, available treatments and future options. *J. Hepatol.* **48**, S68–S92 (2008).
24. Tsochatzis, E. A., Bosch, J. & Burroughs, A. K. Liver cirrhosis. *Lancet* **383**, 1749–1761 (2014).
25. Bosch, J. Vascular Deterioration in Cirrhosis. *J. Clin. Gastroenterol.* **41**, S247–S253 (2007).
26. Iwakiri, Y. Pathophysiology of Portal Hypertension. *Clin. Liver Dis.* **18**, 281–291 (2014).
27. Abraldes, J. G. & García-Pagán, J. C. [Animal models for the study of portal hypertension]. *Gastroenterol. Hepatol.* **29**, 51–9 (2006).
28. Wiest, R. & Groszmann, R. J. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: Too much, not enough. *Hepatology* **35**, 478–491 (2002).
29. García-Pagán, J.-C., Gracia-Sancho, J. & Bosch, J. Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *J. Hepatol.* **57**, 458–461 (2012).
30. Fernández-Iglesias, A. & Gracia-Sancho, J. How to Face Chronic

- Liver Disease: The Sinusoidal Perspective. *Front. Med.* **4**, 7 (2017).
31. Poisson, J. *et al.* Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J. Hepatol.* **66**, 212–227 (2017).
 32. Mookerjee, R. P., Vairappan, B. & Jalan, R. The puzzle of endothelial nitric oxide synthase dysfunction in portal hypertension: The missing piece? *Hepatology* **46**, 943–946 (2007).
 33. Vairappan, B. Endothelial dysfunction in cirrhosis: Role of inflammation and oxidative stress. *World J. Hepatol.* **7**, 443–59 (2015).
 34. Iwakiri, Y. & Groszmann, R. J. Vascular endothelial dysfunction in cirrhosis. *J. Hepatol.* **46**, 927–934 (2007).
 35. Shah, V. *et al.* Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* **117**, 1222–8 (1999).
 36. Iwakiri, Y. & Kim, M. Y. Nitric oxide in liver diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 524–536 (2015).
 37. Clapp, B. *et al.* Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. *Cardiovasc. Res.* **64**, 172–178 (2004).
 38. Balasubramaniyan, V. *et al.* Ammonia reduction with ornithine phenylacetate restores brain eNOS activity via the DDAH-ADMA pathway in bile duct-ligated cirrhotic rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **302**, G145-52 (2012).
 39. Zimmermann, K. *et al.* NOSTRIN: a protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 17167–72 (2002).
 40. Icking, A. *et al.* NOSTRIN functions as a homotrimeric adaptor protein facilitating internalization of eNOS. *J. Cell Sci.* **118**, 5059–69 (2005).
 41. Rappaport, A. M., MacPhee, P. J., Fisher, M. M. & Phillips, M. J. The scarring of the liver acini (Cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory considerations. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* **402**, 107–37 (1983).
 42. Thabut, D. & Shah, V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: New targets for the treatment of portal hypertension? *J. Hepatol.* **53**, 976–980 (2010).
 43. Novo, E. *et al.* Proangiogenic cytokines as hypoxia-dependent factors stimulating migration of human hepatic stellate cells. *Am. J. Pathol.* **170**, 1942–53 (2007).
 44. Sumanovski, L. T., Battegay, E., Stumm, M., van der Kooij, M. &

- Sieber, C. C. Increased angiogenesis in portal hypertensive rats: Role of nitric oxide. *Hepatology* **29**, 1044–1049 (1999).
45. Sieber, C. C., Sumanovski, L. T., Stumm, M., van der Kooij, M. & Battegay, E. In vivo angiogenesis in normal and portal hypertensive rats: role of basic fibroblast growth factor and nitric oxide. *J. Hepatol.* **34**, 644–50 (2001).
46. Abraldes, J. G. *et al.* Mild increases in portal pressure upregulate vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in the intestinal microcirculatory bed, leading to a hyperdynamic state. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, G980-7 (2006).
47. Coll, M. *et al.* Atrophy of mesenteric sympathetic innervation may contribute to splanchnic vasodilation in rat portal hypertension. *Liver Int.* **30**, 593–602 (2010).
48. Ezkurdia, N. *et al.* Blockage of the afferent sensitive pathway prevents sympathetic atrophy and hemodynamic alterations in rat portal hypertension. *Liver Int.* **32**, 1295–305 (2012).
49. Fernández-Varo, G. *et al.* Nitric oxide synthase 3-dependent vascular remodeling and circulatory dysfunction in cirrhosis. *Am. J. Pathol.* **162**, 1985–93 (2003).
50. Fernández-Varo, G. *et al.* Impaired extracellular matrix degradation in aortic vessels of cirrhotic rats. *J. Hepatol.* **46**, 440–6 (2007).
51. Frederick, R. T. Current concepts in the pathophysiology and management of hepatic encephalopathy. *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y.)* **7**, 222–33 (2011).
52. Manning, R. T. & Delp, M. Management of Hepatocerebral Intoxication. *N. Engl. J. Med.* **258**, 55–62 (1958).
53. Phear, E. A., Sherlock, S. & Summerskill, W. H. Blood-ammonium levels in liver disease and hepatic coma. *Lancet* **268**, 836–40 (1955).
54. Butterworth, R. F., Giguère, J. F., Michaud, J., Lavoie, J. & Layrargues, G. P. Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem. Pathol.* **6**, 1–12
55. Häussinger, D. & Schliess, F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* **57**, 1156–65 (2008).
56. Huizenga, J. R., Gips, C. H. & Tangerman, A. The Contribution of Various Organs to Ammonia Formation: A Review of Factors Determining the Arterial Ammonia Concentration. *Ann. Clin. Biochem. An Int. J. Biochem. Lab. Med.* **33**, 23–30 (1996).
57. Häussinger, D., Sies, H. & Gerok, W. Functional hepatocyte

- heterogeneity in ammonia metabolism. The intercellular glutamine cycle. *J. Hepatol.* **1**, 3–14 (1985).
58. Ott, P. & Larsen, F. S. Blood-brain barrier permeability to ammonia in liver failure: a critical reappraisal. *Neurochem. Int.* **44**, 185–98 (2004).
 59. Córdoba, J. & Mínguez, B. Hepatic encephalopathy. *Semin. Liver Dis.* **28**, 70–80 (2008).
 60. Häussinger, D., Kircheis, G., Fischer, R., Schliess, F. & vom Dahl, S. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J. Hepatol.* **32**, 1035–8 (2000).
 61. Wright, G. & Jalan, R. Ammonia and inflammation in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: Pandora's box? *Hepatology* **46**, 291–294 (2007).
 62. Rolando, N. *et al.* The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology* **32**, 734–9 (2000).
 63. Odeh, M. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: the tumour necrosis factor-alpha theory. *Eur. J. Clin. Invest.* **37**, 291–304 (2007).
 64. Jiang, W., Desjardins, P. & Butterworth, R. F. Cerebral inflammation contributes to encephalopathy and brain edema in acute liver failure: protective effect of minocycline. *J. Neurochem.* **109**, 485–493 (2009).
 65. Jiang, W., Desjardins, P. & Butterworth, R. F. Direct evidence for central proinflammatory mechanisms in rats with experimental acute liver failure: protective effect of hypothermia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **29**, 944–52 (2009).
 66. Butterworth, R. F. Hepatic encephalopathy: A central neuroinflammatory disorder? *Hepatology* **53**, 1372–1376 (2011).
 67. Bémour, C. & Butterworth, R. F. Liver-brain proinflammatory signalling in acute liver failure: Role in the pathogenesis of hepatic encephalopathy and brain edema. *Metab. Brain Dis.* **28**, 145–150 (2013).
 68. Bajaj, J. S. Review article: the modern management of hepatic encephalopathy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **31**, 537–547 (2010).
 69. Kucera, O. & Cervinkova, Z. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J. Gastroenterol.* **20**, 8364–76 (2014).
 70. Lieber, C. S. *et al.* Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 502–9 (2004).
 71. Hewitt, K. N., Pratis, K., Jones, M. E. E. & Simpson, E. R.

- Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse. *Endocrinology* **145**, 1842–8 (2004).
72. Newberry, E. P. *et al.* Phenotypic divergence in two lines of L-Fabp^{-/-} mice reflects substrain differences and environmental modifiers. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **309**, G648–61 (2015).
73. Rosenstengel, S., Stoeppeler, S., Bahde, R., Spiegel, H.-U. & Palmes, D. Type of steatosis influences microcirculation and fibrogenesis in different rat strains. *J. Invest. Surg.* **24**, 273–82 (2011).
74. Stöppeler, S. *et al.* Gender and strain-specific differences in the development of steatosis in rats. *Lab. Anim.* **47**, 43–52 (2013).
75. Veteläinen, R., van Vliet, A. & van Gulik, T. M. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **22**, 1526–1533 (2007).
76. Sampey, B. P. *et al.* Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity* **19**, 1109–17 (2011).
77. Moore, B. J. The cafeteria diet--an inappropriate tool for studies of thermogenesis. *J. Nutr.* **117**, 227–31 (1987).
78. Fellmann, L., Nascimento, A. R., Tibiriça, E. & Bousquet, P. Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacol. Ther.* **137**, 331–340 (2013).
79. Wouters, K. *et al.* Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **48**, 474–486 (2008).
80. Kawasaki, T. *et al.* Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *J. Nutr.* **139**, 2067–71 (2009).
81. Ichimura, M. *et al.* High-fat and high-cholesterol diet rapidly induces non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis in Sprague-Dawley rats. *Hepatol. Res.* **45**, 458–69 (2015).
82. Butterworth, R. F. *et al.* Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int.* **29**, 783–8 (2009).
83. Córdoba, J., Gottstein, J. & Blei, A. T. Glutamine, myo -inositol, and organic brain osmolytes after portocaval anastomosis in the rat: Implications for ammonia-induced brain edema. *Hepatology* **24**, 919–923 (1996).
84. Traber, P., DalCanto, M., Ganger, D. & Blei, A. T. Effect of body

- temperature on brain edema and encephalopathy in the rat after hepatic devascularization. *Gastroenterology* **96**, 885–91 (1989).
85. Potvin, M., Finlayson, M. H., Hinchey, E. J., Lough, J. O. & Goresky, C. A. Cerebral abnormalities in hepatectomized rats with acute hepatic coma. *Lab. Invest.* **50**, 560–4 (1984).
 86. Hindfelt, B., Plum, F. & Duffy, T. E. Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portacaval shunts. *J. Clin. Invest.* **59**, 386–96 (1977).
 87. Francque, S. *et al.* Noncirrhotic human nonalcoholic fatty liver disease induces portal hypertension in relation to the histological degree of steatosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **22**, 1 (2010).
 88. Francque, S. *et al.* Non-alcoholic steatohepatitis induces non-fibrosis-related portal hypertension associated with splanchnic vasodilation and signs of a hyperdynamic circulation *in vitro* and *in vivo* in a rat model. *Liver Int.* **30**, 365–375 (2010).
 89. Francque, S. *et al.* Increased intrahepatic resistance in severe steatosis: endothelial dysfunction, vasoconstrictor overproduction and altered microvascular architecture. *Lab. Investig.* **92**, 1428–1439 (2012).
 90. Pasarín, M. *et al.* Sinusoidal endothelial dysfunction precedes inflammation and fibrosis in a model of NAFLD. *PLoS One* **7**, e32785 (2012).
 91. Chassaing, B., Etienne-Mesmin, L. & Gewirtz, A. T. Microbiota-liver axis in hepatic disease. *Hepatology* **59**, 328–339 (2014).
 92. Le Roy, T. *et al.* Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* **62**, 1787–1794 (2013).
 93. De Minicis, S. *et al.* Dysbiosis contributes to fibrogenesis in the course of chronic liver injury in mice. *Hepatology* **59**, 1738–1749 (2014).
 94. Moghadamrad, S. *et al.* Attenuated portal hypertension in germ-free mice: Function of bacterial flora on the development of mesenteric lymphatic and blood vessels. *Hepatology* **61**, 1685–1695 (2015).
 95. García-Lezana, T. *et al.* A Diet Combining High Fat and Glucose-Fructose Syrup Induces Obesity, Non-Alcoholic Steatohepatitis and Portal Hypertension in a New Animal Model. *J. Hepatol.* **64**, S452–S453 (2016).
 96. Marrone, G. *et al.* The transcription factor KLF2 mediates hepatic endothelial protection and paracrine endothelial–stellate cell deactivation induced by statins. *J. Hepatol.* **58**, 98–103 (2013).

97. Butterworth, R. F. Neuronal cell death in hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.* **22**, 309–320 (2007).
98. Soffer, D., Sherman, Y., Tur-Kaspa, R. & Eid, A. Acquired hepatocerebral degeneration in a liver transplant recipient. *Acta Neuropathol.* **90**, 107–111 (1995).
99. Bajaj, J. S. *et al.* Persistence of Cognitive Impairment After Resolution of Overt Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology* **138**, 2332–2340 (2010).
100. Sotil, E. U., Gottstein, J., Ayala, E., Randolph, C. & Blei, A. T. Impact of preoperative overt hepatic encephalopathy on neurocognitive function after liver transplantation. *Liver Transpl.* **15**, 184–92 (2009).
101. Garcia-Martinez, R. *et al.* Hepatic encephalopathy is associated with posttransplant cognitive function and brain volume. *Liver Transpl.* **17**, 38–46 (2011).
102. Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Boix, J. & Felipo, V. Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology* **46**, 514–9 (2007).
103. Shawcross, D. L., Wright, G., Olde Damink, S. W. M. & Jalan, R. Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.* **22**, 125–138 (2007).
104. Wright, G. *et al.* Reduction in hyperammonaemia by ornithine phenylacetate prevents lipopolysaccharide-induced brain edema and coma in cirrhotic rats. *Liver Int.* **32**, 410–9 (2012).
105. Ericsson, A. C., Crim, M. J. & Franklin, C. L. A brief history of animal modeling. *Mo. Med.* **110**, 201–5
106. Delire, B., Stärkel, P. & Leclercq, I. Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **3**, 53–66 (2015).
107. Liu, Y. *et al.* Animal models of chronic liver diseases. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* **304**, G449–G468 (2013).
108. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. & Gordon, J. I. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022–1023 (2006).
109. Ley, R. E. *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 11070–11075 (2005).
110. Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L. & Gordon, J. I. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* **3**, 213–23 (2008).
111. Pasarín, M. *et al.* Insulin resistance and liver microcirculation in a

- rat model of early NAFLD. *J. Hepatol.* **55**, 1095–1102 (2011).
112. Duncan, E. R. *et al.* Accelerated endothelial dysfunction in mild prediabetic insulin resistance: the early role of reactive oxygen species. *AJP Endocrinol. Metab.* **293**, E1311–E1319 (2007).
 113. Duncan, E. R. *et al.* Effect of endothelium-specific insulin resistance on endothelial function in vivo. *Diabetes* **57**, 3307–14 (2008).
 114. La Mura, V. *et al.* Effects of simvastatin administration on rodents with lipopolysaccharide-induced liver microvascular dysfunction. *Hepatology* **57**, 1172–1181 (2013).
 115. Schnabl, B. & Brenner, D. A. Interactions Between the Intestinal Microbiome and Liver Diseases. *Gastroenterology* **146**, 1513–1524 (2014).
 116. Jiang, C. *et al.* Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* **125**, 386–402 (2015).
 117. Fang, S. *et al.* Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. *Nat. Med.* **21**, 159–165 (2015).
 118. Gonzalez, F. J., Jiang, C., Bisson, W. H. & Patterson, A. D. Inhibition of farnesoid X receptor signaling shows beneficial effects in human obesity. *J. Hepatol.* **62**, 1234–6 (2015).
 119. Verbeke, L. *et al.* Obeticholic acid, a farnesoid X receptor agonist, improves portal hypertension by two distinct pathways in cirrhotic rats. *Hepatology* **59**, 2286–2298 (2014).
 120. Luo, M. *et al.* Correlation between interleukin-6 and ammonia in patients with overt hepatic encephalopathy due to cirrhosis. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **37**, 384–390 (2013).
 121. Ong, J. P. *et al.* Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *Am. J. Med.* **114**, 188–93 (2003).
 122. Shawcross, D. L., Davies, N. A., Williams, R. & Jalan, R. Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J. Hepatol.* **40**, 247–54 (2004).
 123. Nielsen, S. S., Grøfte, T., Tygstrup, N. & Vilstrup, H. Effect of lipopolysaccharide on *in vivo* and genetic regulation of rat urea synthesis. *Liver Int.* **25**, 177–183 (2005).
 124. Qureshi, M. O., Khokhar, N. & Shafqat, F. Ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* **24**, 160–3 (2014).

125. Ahl, B. *et al.* Regional differences in cerebral blood flow and cerebral ammonia metabolism in patients with cirrhosis. *Hepatology* **40**, 73–79 (2004).
126. Singh, S., Koiri, R. K. & Trigun, S. K. Acute and chronic hyperammonemia modulate antioxidant enzymes differently in cerebral cortex and cerebellum. *Neurochem. Res.* **33**, 103–113 (2008).
127. Yoshida, K. *et al.* Distinctive features of degenerating Purkinje cells in spinocerebellar ataxia type 31. *Neuropathology* **34**, 261–267 (2014).
128. Graeber, M. B. & Moran, L. B. Mechanisms of cell death in neurodegenerative diseases: fashion, fiction, and facts. *Brain Pathol.* **12**, 385–90 (2002).
129. Brown, G. C. & Neher, J. J. Inflammatory Neurodegeneration and Mechanisms of Microglial Killing of Neurons. *Mol. Neurobiol.* **41**, 242–247 (2010).
130. Walter, L. & Neumann, H. Role of microglia in neuronal degeneration and regeneration. *Semin. Immunopathol.* **31**, 513–525 (2009).
131. Jiang, W., Desjardins, P. & Butterworth, R. F. Cerebral inflammation contributes to encephalopathy and brain edema in acute liver failure: protective effect of minocycline. *J. Neurochem.* **109**, 485–93 (2009).
132. Rodrigo, R. *et al.* Hyperammonemia Induces Neuroinflammation That Contributes to Cognitive Impairment in Rats With Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology* **139**, 675–684 (2010).
133. Agusti, A. *et al.* Sildenafil reduces neuroinflammation in cerebellum, restores GABAergic tone, and improves motor incoordination in rats with hepatic encephalopathy. *CNS Neurosci. Ther.* **23**, 386–394 (2017).
134. Agusti, A. *et al.* p38 MAP kinase is a therapeutic target for hepatic encephalopathy in rats with portacaval shunts. *Gut* **60**, 1572–9 (2011).
135. Cavanagh, J. B., Lewis, P. D., Blakemore, W. F. & Kyu, M. H. Changes in the cerebellar cortex in rats after portocaval anastomosis. *J. Neurol. Sci.* **15**, 13–26 (1972).
136. Bellamy, T. C. Interactions between Purkinje neurones and Bergmann glia. *Cerebellum* **5**, 116–26 (2006).
137. Wang, F., Xu, Q., Wang, W., Takano, T. & Nedergaard, M. Bergmann glia modulate cerebellar Purkinje cell bistability via Ca²⁺-dependent K⁺ uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**,

- 7911–6 (2012).
138. Kril, J. J., Flowers, D. & Butterworth, R. F. Distinctive pattern of Bergmann glial pathology in human hepatic encephalopathy. *Mol. Chem. Neuropathol.* **31**, 279–87 (1997).
 139. Suárez, I. *et al.* Different response of astrocytes and bergmann glial cells to portacaval shunt: An immunohistochemical study in the rat cerebellum. *Glia* **6**, 172–179 (1992).
 140. Kril, J. J. & Butterworth, R. F. Diencephalic and cerebellar pathology in alcoholic and nonalcoholic patients with end-stage liver disease. *Hepatology* **26**, 837–41 (1997).
 141. Bi, F. *et al.* Reactive astrocytes secrete Icn2 to promote neuron death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 4069–74 (2013).
 142. Lee, S., Lee, W.-H., Lee, M.-S., Mori, K. & Suk, K. Regulation by lipocalin-2 of neuronal cell death, migration, and morphology. *J. Neurosci. Res.* **90**, 540–550 (2012).
 143. McMillin, M. *et al.* Neuronal CCL2 is upregulated during hepatic encephalopathy and contributes to microglia activation and neurological decline. *J. Neuroinflammation* **11**, 121 (2014).
 144. Reixach, N., Deechongkit, S., Jiang, X., Kelly, J. W. & Buxbaum, J. N. Tissue damage in the amyloidoses: Transthyretin monomers and nonnative oligomers are the major cytotoxic species in tissue culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 2817–2822 (2004).
 145. Wisniewski, T., Castano, E., Ghiso, J. & Frangione, B. Cerebrospinal fluid inhibits Alzheimer beta-amyloid fibril formation in vitro. *Ann. Neurol.* **34**, 631–633 (1993).
 146. Suárez, I., Bodega, G. & Fernández, B. Upregulation of alpha-synuclein expression in the rat cerebellum in experimental hepatic encephalopathy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **36**, 422–35 (2010).
 147. Pang, X.-Y. *et al.* Expression and Regulation of Human Fetal-Specific CYP3A7 in Mice. *Endocrinology* **153**, 1453–1463 (2012).
 148. Yoshizato, K., Tateno, C. & Utoh, R. Mice with liver composed of human hepatocytes as an animal model for drug testing. *Curr. Drug Discov. Technol.* **9**, 63–76 (2012).
 149. Llopis, M. *et al.* Intestinal microbiota contributes to individual susceptibility to alcoholic liver disease. *Gut* **65**, 830–9 (2016).
 150. Kleiner, D. E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **41**, 1313–1321 (2005).
 151. Lee, S. H. & Fisher, B. Portacaval shunt in the rat. *Surgery* **50**, 668–72 (1961).
 152. Zimmermann, 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* **9**, 594–601 (1989).
153. Bevins, R. A. & Besheer, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat. Protoc.* **1**, 1306–1311 (2006).
154. Fiala, J. C. & Harris, K. M. Extending unbiased stereology of brain ultrastructure to three-dimensional volumes. *J. Am. Med. Inform. Assoc.* **8**, 1–16

ANEXO

**CEREBELLAR NEURODEGENERATION IN A NEW RAT MODEL OF
EPISODIC HEPATIC ENCEPHALOPATHY**

Teresa García-Lezana^{1,2,3*}, Marc Oria^{1,2,3*}, Jordi Romero-Giménez¹, Jordi Bové⁴, Miquel Vila^{4,5,6}, Joan Genescà^{1,2,3}, Laia Chavarria^{1,2,3}, Juan Córdoba^{1,2,3}

¹Liver Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR), Barcelona, Spain. ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ³Departament Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain. ⁴Neurodegenerative Diseases Research Group, Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR) - Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Barcelona, Spain. ⁵Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain. ⁶Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Barcelona, Spain.

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, Mayo 2016

<http://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0271678X16649196>

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es el resultado del esfuerzo y el apoyo de muchas personas a las que no quiero dejar de dar las gracias.

Gracias. A Joan Córdoba y Laia Chavarria, por la oportunidad de comenzar, por la confianza. A Joan Genescà, Salvador Augustin y María Martell, gracias por hacerme sentir parte del grupo desde el principio, por guiarme, por todo el tiempo invertido, por estar siempre disponibles.

Gracias a Jordi Bové y Miquel Vila, por compartir conmigo vuestra experiencia en el estudio de procesos neurodegenerativos. Gracias también a Chaysavanh Manichanh y su equipo, en especial Alba Santiago y Andreu Schoenenberger, por introducirme en el estudio de la microbiota intestinal y resolver con paciencia todas mis dudas.

Gracias infinitas a mis compañeros. A Laia, Jordi, Marc, Sarai, Nahia, Manu, Imma, Miren, Mónica, Diana, Josep, Qian, Chari, MariaQ, Damir, Biopep, Meri, Laura, Sofia, Mariu, Celia... por lo que me habéis enseñado y ayudado, por la paciencia, por escucharme, por los consejos, por las risas, por hacerlo tan fácil.

Gracias a Macarena, Meritxell, Mónica, Begoña y Stephanie por estar animándome en cada presentación, por las cenas de congreso.

Gracias a mis amigos, para los que un *Western* es únicamente una película del oeste, Juanki, Alba, Vir, Amaia, Alberto, Javi, Dani, María, Arantxa, Liam, Gemma, Sara, Laura, Esti y Edurne gracias por llevar años interesándoos por mi trabajo, por cambiar de tema después. Y, como no, a Amaia, Isabel, Diana, Nuria, Jenny y Sara, gracias por los domingos de biblioteca, por seguir a pesar de la distancia.

Gracias a mi familia, por darme impulso, por estar siempre de colchón, por el apoyo.

Gracias también a todas las cosas que han salido mal, los experimentos mil veces repetidos, los que nunca salieron, los resultados negativos, los aparentemente inexplicables, los artículos rechazados. Gracias por haberme enseñado a aceptar y mejorar.

Gracias, porque estoy segura de que he aprovechado muy bien el tiempo.

