



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

Centro de Ciencias Básicas

Doctorado en ciencias Biológicas modalidad tradicional

Proyecto de Tesis

**Efecto del agonista de la GnRH, Acetato de leuprolida,
sobre un modelo de Encefalopatía Hepática**

Que presenta

Brenda Lizeth Gutiérrez Esparza

Para optar por el título de doctora en Ciencias Biológicas

Tutor (es)

**Dr. José Luis Quintanar Stephano
Dra. Marina Liliana González Torres**

Comité Tutorial

Dr. Andrés Quintanar Stephano

Aguascalientes, Ags.

Marzo 2025



Fecha de dictamen (dd/mm/aaaa): 6 de marzo de 2025

NOMBRE: Breici Lizeth Gutiérrez Esperza ID: 344554

PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas, Modalidad Directa LSAC (del posgrado): Estudio de Proteínas en Sistemas Biológicos

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: Efecto del agonista de la GnRH, acetato leuprolida, sobre un modelo de encefalopatía hepática

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

Si el acetato de leuprolida demuestra ser efectivo, podría convertirse en una alternativa terapéutica para mejorar la calidad de vida de las personas con encefalopatía hepática. Al reducir los déficits en coordinación, memoria y aprendizaje, los pacientes podrían recuperar mayor autonomía en su vida diaria, disminuyendo su dependencia de los cuidadores. Esto, a su vez, contribuiría a reducir el impacto emocional y económico de las familias, aliviando la carga física, emocional y financiera de quienes brindan apoyo a los pacientes.

INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:	
SI	El trabajo es congruente con las LSAC del programa de posgrado
SI	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI	Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta anexo)
El agregado cumple con lo siguiente:	
SI	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancias predoctoral, etc)
SI	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutoral; en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
N.A.	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI	Coincide con el título y objetivo registrado
SI	Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI	Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI	Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
En caso de Tesis por artículos científicos publicados:	
	Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
	El estudiante es el primer autor
	El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación
	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
	La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúe con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

SI X

No

Elaboró:

FIRMAS

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LSAC DE ADSCRIPCION:

Dr. Daniel Cervantes García

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Dr. Gilberto Mejía Quirós

* En caso de conflicto de intereses, deberá ser revisor miembro del RAB de la LSAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutoral, según sea el caso

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Dr. Alejandro Padilla Díaz

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. Jorge Martín Alfaro Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

Se complementa con el Art. 1016 del Reglamento General de Docencia que a la letra séptima prevé los requisitos de la tesis y la procedencia del programa de posgrado y en el Art. 1017 la revisión del Secretario Técnico, antes el representante de los alumnos.

Elaborado por: D. Apoyo al Posgrado
Revisado por: D. Control Escolar/ D. Gestión de Calidad
Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posgrado

Código: DD-111-TO-13
Actualización: 01
Fecha: 28/04/20

CARTA DE VOTO APROBATORIO
COMITÉ TUTORAL

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

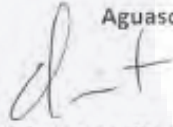
PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **BRENDA LIZETH GUTIERREZ ESPARZA** con ID 344554 quien realizó tesis titulado: **EFFECTO DEL AGONISTA DE LA GNRH, ACETATO DE LEUPROLIDA, SOBRE UN MODELO DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

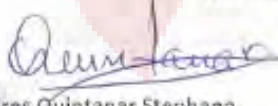
Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 05 de marzo de 2025.


Dr. José Luis Quintanar Stephano
Tutor de tesis


Dra. Marina Liliiana González Torres
Co-Tutor de tesis


Andres Quintanar Stephano
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaria Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Interesado
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad
Aprobado por: Depto. Control Escolar/Depto. Apoyo al Interesado

Elaborado por: SECRETARÍA DE EDUCACIÓN
Revisado por: SECRETARÍA DE EDUCACIÓN
Aprobado por: SECRETARÍA DE EDUCACIÓN



Neurological recovery in rats with portocaval anastomosis-induced hepatic encephalopathy treated with leuprolide acetate, a GnRH agonist

Brenda Lizeth Gutiérrez-Esparza¹ · Marina Liliana González-Torres² · Andrés Quintanar-Stephano¹ · J. Luis Quintanar¹

Received: 7 June 2024 / Accepted: 12 August 2024

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2024

Abstract

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric complication of acute liver failure or chronic liver injury. Liver dysfunction impairs ammonia detoxification, allowing it to cross the blood-brain barrier (BBB) and disrupt brain function. The hippocampus becomes a crucial target during elevated ammonia levels, causing spatial memory impairment and decreased learning ability. Leuprolide acetate (LA), a GnRH agonist, has been implicated in neuroprotection and neuroregeneration in several regions of the central nervous system (CNS) including hippocampus. In this study, we aim to evaluate the effects of LA treatment on hippocampus of rats with HE induced by portocaval anastomosis (PCA) through cognitive tests, histology analysis and expression of neuronal recovery marker proteins, such as neurofilament (NF200) and neurabin II, and astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP). Rats were divided into three groups: SHAM, portocaval anastomosis with saline solution (PCA+SS) and portocaval anastomosis treated with LA (PCA+LA). To evaluate learning and spatial memory elevated T-maze (ETM) and Y-maze test (YMT) were respectively used. Results indicated that LA-treated rats performed significantly better in ETM and YMT than untreated rats. Histological analysis of hippocampus showed increased neuron density, nuclear area, and layer thickness in dentate gyrus of PCA+LA group compared to PCA+SS. Additionally, neurabin II and NF200 expression were higher in LA-treated rats, while GFAP expression was elevated in the PCA+SS group compared to control and PCA+LA groups. In conclusion, LA enhances hippocampal neuron recovery and reduces astrogliosis, suggesting its potential as a therapeutic intervention for attenuating hippocampal damage during HE.

Keywords NF200 · Neurabin II · GFAP · Restorative neuron · Dentate gyrus

J. Luis Quintanar
jose.quintanar@edu.uaa.mx

Brenda Lizeth Gutiérrez-Esparza
lizeth.gutierrez@edu.uaa.mx

Marina Liliana González-Torres
liliana.gonzalez@edu.uaa.mx

Andrés Quintanar-Stephano
aquinta@correo.uaa.mx

¹ Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad, No. 940, Ciudad Universitaria, C.P. 20100 Aguascalientes, Aguascalientes, México

² Departamento de Psicología, Centro de Ciencias Sociales y Humanidades, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad, No. 940, Ciudad Universitaria, C.P. 20100 Aguascalientes, Aguascalientes, México

Introduction

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric complication of acute liver failure or chronic liver injury (França et al. 2019). Liver failure disrupts ammonia detoxification, allowing it to breach the BBB and interfere with brain function (Chen et al. 2014). Hyperammonemia has been directly implicated in the progression of HE, causing neurotoxicity and activating apoptotic pathways, particularly in neurons, contributing to cell death (Bosoi and Rose 2009). The hippocampus becomes a crucial target during elevated ammonia levels; patients with HE exhibits hippocampal atrophy marked by reduced volume and functional connectivity (García-García et al. 2018; Lin et al. 2019). This atrophy contributes to episodic and spatial memory impairment,

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer al Dr. José Luis Quintanar Stephano por abrirme las puertas de su laboratorio, por que, sin saberlo, le dio un giro de 180 grados a mi vida de la mejor manera. También le agradezco su asesoría, apoyo y por los consejos profesionales y de vida.

También quiero agradecer a la Dra. Marina Liliana González Torres por su asesoría e infinita paciencia.

A mi maestro el Dr. Andrés Quintanar Stephano por aceptarme como parte de su grupo de trabajo, por su asesoría y consejos.

Muchas gracias a la Dra. Consolación Martínez y la Dra. Raquel Guerrero por ser parte de mi comité extendido, sin su apoyo no hubiese podido terminar el doctorado.

Gracias a la AQB Sonia Cruz por su gran ayuda y asesoría en la parte de histología y a la Dra. Maricela Luna y a la Dra. Rosario Baltazar por su apoyo en las inmunofluorescencias.

Al Dr. Daniel Cervantes por su ayuda en la qPCR y la Dra. Eva Salinas por su asesoría y por permitirme trabajar en su laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio Alberto, Diana, Marcela, Fernando y Argelia por hacer mis días más felices.

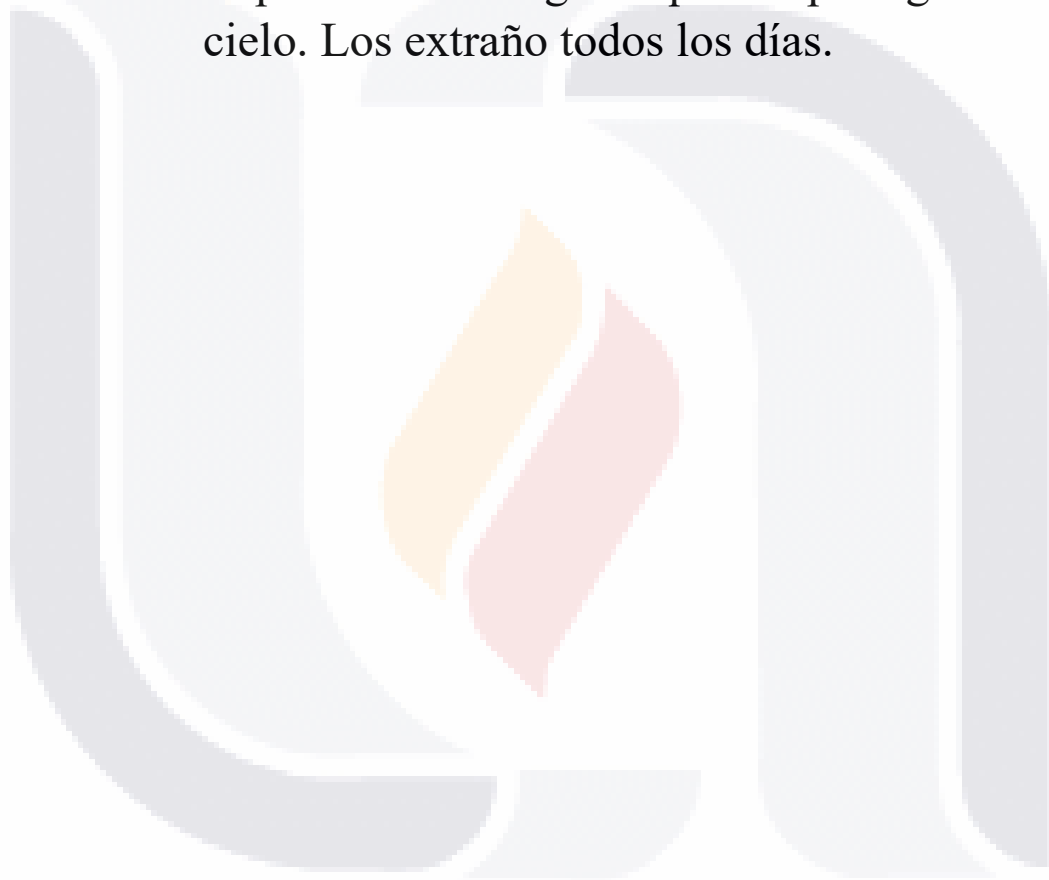
Gracias a las doctoras Carmen Díaz, Denisse Calderón e Irma Hernández por sus enseñanzas y su ayuda.

A mi familia por estar siempre de manera incondicional, los amo.

Finalmente quisiera agradecer al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por apoyar este trabajo de tesis mediante la beca doctoral 813,968.

Dedicatoria

Con todo mi amor para los tres ángeles que me protegen desde el cielo. Los extraño todos los días.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ÍNDICE GENERAL

1. Resumen	6
2. Abstract	7
3. Introducción	8
3.1. Hígado y sus características	8
3.2. Encefalopatía hepática	11
3.3. Progresión de la encefalopatía hepática	13
3.3.1. Hiperamonemia	14
3.3.2. Inflamación periférica	17
3.3.3. Neuroinflamación	19
3.4. EH y neurodegeneración	21
3.4.1. Daños en el cerebelo permiten el establecimiento de alteraciones cognitivas y en la coordinación motora durante la EH	22
3.4.2. Daños en el hipocampo promueve la inducción de alteraciones cognitivas durante la EH	25
3.5. Tratamientos	29
3.6. Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)	31
3.6.1. Agonista de la GnRH: Acetato de leuprolida	33
4. Objetivos	34
4.1. Objetivo general	35
4.2. Objetivos específicos	35
5. Materiales y métodos	36
5.1. Diseño experimental	36
5.2. Procedimiento quirúrgico: Anastomosis porto-cava	37
5.3. Administración de acetato de leuprolida	38
5.4. Determinación de amonio en sangre	38
5.5. Análisis de suero	39
5.6. Evaluación de la función motora y coordinación	39
5.6.1. Campo abierto	39
5.6.2. RotaRod	40
5.6.3. Barra transversal	41
5.7. Evaluación cognitiva	42

5.7.1	<i>Prueba de laberinto en Y</i>	42
5.8	Sacrificio y obtención de muestras	45
5.9	Histología.....	45
5.10	Evaluación de fibrosis mediante la tinción tricrómica de Masson	46
5.11	Evaluación de grosor de capas de cerebelo y densidad lineal de células de Purkinje	47
5.12	Evaluación de grosor, área nuclear y densidad neuronal en hipocampo	47
5.13	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa.....	48
5.14	Análisis de proteína mediante la técnica de Western Blot	50
5.15	Inmunofluorescencia	51
6	Resultados y discusiones	53
6.1	Validación de daño hepático en ratas con anastomosis portocava	53
6.1.1	Evaluación de peso corporal y tejido hepático	53
6.1.2	Análisis de marcadores de daño hepático	54
6.1.3	Histología del hígado.....	55
6.2	Efecto del acetato de leuprolida sobre cerebelo de ratas con anastomosis portocava	59
6.2.1	Evaluación de funciones motoras	59
6.2.2	Análisis histológico de cerebelo	63
6.2.3	Evaluación de marcadores de integridad neuronal en cerebelo.....	65
6.2.4	Evaluación de marcadores de gliosis reactiva	69
6.2.5	Evaluación de marcadores de inflamación	73
6.2.6	Evaluación de factores neurotróficos en cerebelo	77
6.2.7	Evaluación de marcadores involucrados en proceso de neurotransmisión en cerebelo	80
6.3	Evaluación del efecto del acetato de leuprolida sobre hipocampo de ratas con EH... ..	84
6.3.1	Evaluación de funciones cognitivas	84
6.3.2	Histología de hipocampo	87
6.3.3	Evaluación de marcadores de integridad neuronal en hipocampo	89
6.3.4	Evaluación de marcadores de gliosis reactiva en hipocampo.....	95
6.3.5	Evaluación de marcadores de inflamación en hipocampo.....	99
6.3.6	Evaluación de factores neurotróficos en hipocampo	103
6.3.7	Evaluación de marcadores involucrados en proceso de neurotransmisión en hipocampo	105
7.	Conclusiones	109

7.1	Hallazgos en hígado.....	109
7.2	Hallazgos en el cerebelo	109
7.3	Hallazgos en el hipocampo.....	110
8.	Perspectivas	112
9.	Referencias bibliográficas	113
10.	Anexos.....	134
	Anexo 1. Extracción de proteínas para Western Blot.....	134
	Anexo 2. Cuantificación de proteína por medio de la técnica del ácido bicinonínico (BCA) 135	
	Anexo 3. Electroforesis SDS PAGE.....	136
	Anexo 4. Western Blot.....	137
	Anexo 5. Inmunofluorescencia	139

Índice de figuras

Figura 1. Estructura histológica del hígado.....	8
Figura 2. Células hepáticas	9
Figura 3. Mecanismo de la fibrosis hepática	11
Figura 4. Efecto sinérgico de inflamación periférica, neuroinflamación e hiperamonemia en la inducción de EH.....	14
Figura 5. Metabolismo del amonio en los astrocitos.	15
Figura 6. Respuesta inmune durante la EH	18
Figura 7. Alteraciones en cerebelo durante la EH.	20
Figura 8. Alteraciones en hipocampo durante la EH.	21
Figura 9. Estructura de la corteza cerebelar.	23
Figura 10.. Efecto de neuroinflamación sobre la vía GABAérgica durante la EH. La inflamación periférica favorece el incremento de citocinas proinflamatorias, los cuales actúan alterando la neurotransmisión de GABA lo que provoca deterioro en funciones motoras y cognitivas.	25
Figura 11. Estructura del hipocampo.	26
Figura 12. La inflamación afecta la expresión de receptores glutamatérgicos en el hipocampo favoreciendo el deterioro de aprendizaje y memoria espacial durante la EH.	28

Figura 13. Eje hipotálamo/hipófisis/gónadas	32
Figura 14. Estructura de la GnRH y su análogo acetato de leuprolida.	33
Figura 15. Diseño experimental del proyecto.	37
Figura 16. Anastomosis portocava.....	38
Figura 17. Campo abierto	40
Figura 18. Rotarod.....	41
Figura 19. Barra transversal.....	42
Figura 20. Prueba de laberinto en T elevado	43
Figura 21. Laberinto en T elevado	45
Figura 22. Cuantificación de área fibrótica mediante la herramienta de deconvolutado de colores en el programa Image J.	46
Figura 23. A) Medición del grosor de la capa granular (CG), capa molecular (CM). B) Medición del área y densidad de las células de Purkinje (CP).....	47
Figura 24. Medición de grosor y área nuclear en las tres zonas del hipocampo (CA1, CA3 y DG)	48
Figura 25. Hígados teñidos con tricrómico de Masson.....	56
Figura 26. Análisis de fibrosis por medio de la tinción tricrómica de Masson.....	58
Figura 27. Prueba de campo abierto de los grupos SHAM, SS y AL.....	60
Figura 28. Prueba de RotaRod de los grupos SHAM, SS y AL..	61
Figura 29. Prueba de barra transversal de los grupos SHAM, SS y AL..	62
Figura 30. Histología de cerebelo de los grupos SHAM, SS y AL.....	64
Figura 31. G) Grosor de capa granular, H) Densidad de células de Purkinje, I) Grosor de capa molecular en los grupos SHAM, SS y AL..	65
Figura 32. Expresión de espinofilina en ratas SHAM, SS y AL (n=5).....	66
Figura 33. Expresión de NF200 en ratas SHAM, SS y AL (n=5).....	67
Figura 34. Expresión de tubulina por medio de la técnica de inmunofluorescencia	69
Figura 35. Expresión de GFAP en ratas SHAM, SS y AL (n=5)..	70
Figura 36. Expresión de GFAP por medio de la técnica de inmunofluorescencia	72
Figura 37. Expresión relativa de ARNm Iba 1 en ratas SHAM, SS y AL (n=3).	73
Figura 38. Expresión relativa de ARNm de TNF α , IL-6, IL-1 β e iNOS en ratas SHAM, SS y AL.....	76

Figura 39. Expresión relativa de ARNm de IL4, IL1 y TGFβ en ratas SHAM, SS y AL.	77
Figura 40. Expresión de BDNF en cerebelo de ratas SHAM, SS y AL.....	79
Figura 41. Expresión relativa de ARNm de BDNF y NGF en ratas SHAM, SS y AL	80
Figura 42. Expresión de sinaptofisina en cerebelo de ratas SHAM, SS y AL.....	81
Figura 43. Expresión relativa de ARNm de NR1 y NR2A en ratas SHAM, SS y AL.....	83
Figura 44. Prueba de laberinto en Y a los grupos SHAM, SS y AL.	85
Figura 45. Prueba de laberinto en T elevado de los grupos SHAM, SS y AL.....	86
Figura 46. Análisis morfométrico de las áreas CA1, CA3 y GD del hipocampo de grupos experimentales,	88
Figura 47. Expresión de espinofilina en ratas SHAM, SS y AL	91
Figura 48. Expresión de espinofilina en ratas SHAM, SS y AL	93
Figura 49. Expresión de tubulina en giro dentado de ratas SHAM, SS y AL	94
Figura 50. Expresión de GFAP en ratas SHAM, SS y AL.	95
Figura 51. Expresión de GFAP en giro dentado de ratas SHAM, SS y AL	96
Figura 52. Expresión relativa de ARNm de Iba1 en ratas SHAM, SS y AL.....	99
Figura 53. Expresión relativa de ARNm de TNFα, IL-6, IL-1β e iNOS en ratas SHAM, SS y AL.....	101
Figura 54. Expresión relativa de ARNm IL4, IL10 y TGFβ en ratas SHAM, SS y AL.	103
Figura 55. Expresión relativa de ARNm de BDNF y NGF en ratas SHAM, SS y AL.....	105
Figura 56. Expresión de sinaptofisina en giro dentado de ratas SHAM, SS y AL.....	106
Figura 57. Expresión relativa de ARNm de NR1 y NR2A en ratas SHAM, SS y AL.....	108

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de la EH de acuerdo el grado de severidad	12
Tabla 2. Grupos experimentales	36
Tabla 3. Oligos utilizados	49
Tabla 4. Tabla de anticuerpos utilizados	51
Tabla 5. Tabla de anticuerpos utilizados	52
Tabla 6. Peso corporal y peso de hígado en los grupos experimentales.....	53
Tabla 7. Marcadores de daño hepático	54

1. Resumen

La encefalopatía hepática (EH) es un trastorno neuropsiquiátrico asociado con enfermedades hepáticas crónicas, caracterizado por alteraciones motoras y cognitivas. En este estudio, se evaluó el efecto del acetato de leuprolida (AL) sobre las alteraciones cerebelares e hipocampales en un modelo experimental de EH inducido por anastomosis portocava. Las pruebas de función motora y cognitiva mostraron déficits significativos en la coordinación motora, aprendizaje y memoria en el grupo sin tratamiento, junto con una disminución en la densidad celular tanto en cerebelo como en hipocampo. En contraste, los animales tratados con AL mostraron una mejora en su desempeño. A nivel molecular, el grupo tratado mostró un aumento en la expresión de espinofilina, tubulina y NF200, indicadores de neuroregeneración, así como una disminución en la astrogliosis y neuroinflamación, evidenciado por el decremento de GFAP e Iba1 y los marcadores $TNF\alpha$, IL6 e iNOS. Además de incrementar los niveles de IL10, lo que sugiere un efecto antiinflamatorio. Finalmente, el restablecimiento de la expresión del factor neurotrófico BDNF, así como la sinaptofisina y las subunidades de receptor a glutamato NR1 y NR2A, indican una mejora en la neurotransmisión. Estos hallazgos sugieren que el acetato de leuprolida ejerce efectos neurotróficos en la EH al mejorar las funciones motoras y cognitivas, reducir la neuroinflamación y promover la plasticidad neuronal en el cerebelo y el hipocampo.

2. Abstract

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric disorder associated with chronic liver disease, characterized by motor and cognitive impairments. This study investigated the effects of leuprolide acetate (LA) on cerebellar and hippocampal alterations in an experimental model of HE induced by portocaval anastomosis. Motor and cognitive function tests revealed significant deficits in motor coordination, learning, and memory in the untreated group, along with a reduction in cell density in both the cerebellum and hippocampus. In contrast, LA-treated animals exhibited improved performance. At the molecular level, the LA-treated group showed increased expression of spinophilin, tubulin, and NF200, key markers of neuroregeneration. Additionally, there was a notable reduction in astrogliosis and neuroinflammation, evidenced by decreased levels of GFAP, Iba1, and the pro-inflammatory markers TNF α , IL6, and iNOS. Conversely, IL10 levels were elevated, suggesting a potential anti-inflammatory effect. Furthermore, the restoration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression, along with increased levels of synaptophysin and glutamate receptor subunits NR1 and NR2A, indicate enhanced neurotransmission. These findings suggest that leuprolide acetate exerts neuroprotective and neurotrophic effects in HE by improving motor and cognitive function, reducing neuroinflammation, and promoting neuronal plasticity in the cerebellum and hippocampus.

3. Introducción

3.1. Hígado y sus características

El hígado es la glándula más grande del cuerpo de los mamíferos, en él se desarrollan distintas funciones como metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, detoxificación de agentes nocivos, fagocitosis, almacenamiento y activación de vitamina D (Tortora y Derrickson, 2013). Se organiza en lóbulos hepáticos distribuidos de forma hexagonal, los cuales están compuestos por una vena central situada en la zona media y en las esquinas dispuestas de manera radial se encuentran las tríadas portales, que consisten en la vena porta, arteriola hepática y conducto biliar (Gebhardt y Matz-Soja, 2014). La vena porta recibe la circulación del intestino delgado y la mayoría proveniente del intestino grueso, bazo y páncreas; los sinusoides llevan la sangre desde la vena porta y la arteria hepática a la vena central (Soto-Gutiérrez *et al.*, 2017).

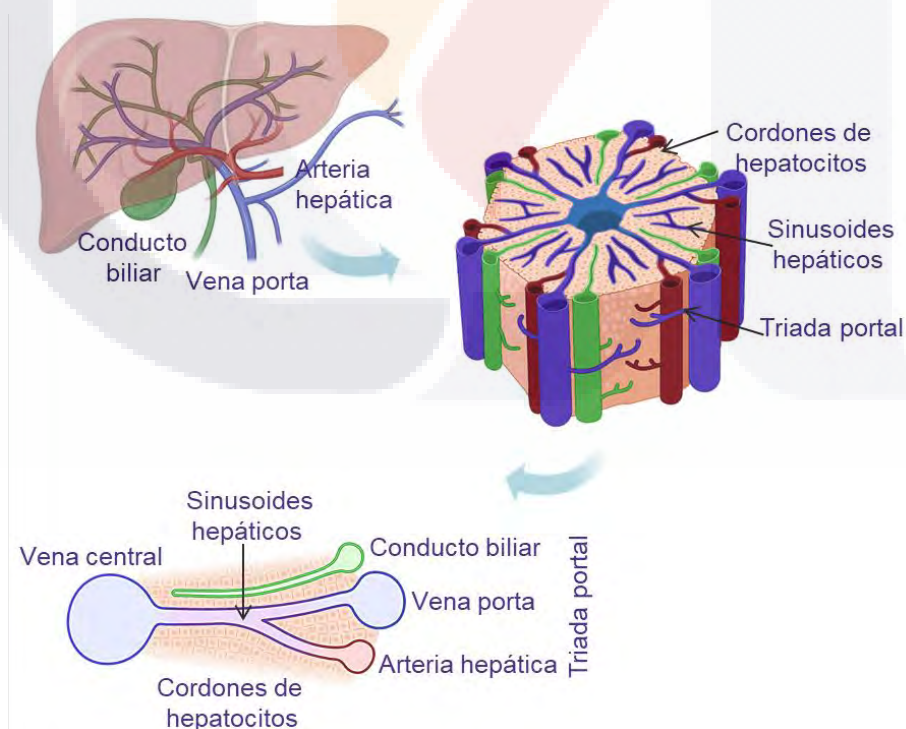


Figura 1. Estructura histológica del hígado.

El hígado está compuesto por distintos tipos celulares, cada uno con sus características fenotípicas, funciones y topografía específicas, entre los cuales podemos encontrar células parenquimatosas como los hepatocitos, y las no parenquimatosas que comprenden a las endoteliales, de Kupffer y las estrelladas hepáticas. Las células endoteliales constituyen el revestimiento de los capilares, contienen pequeñas aperturas para permitir la libre difusión de sustancias entre la sangre y la superficie de los hepatocitos. Por otro lado, las células de Kupffer son macrófagos con una capacidad endocítica; son potentes mediadores de la respuesta inflamatoria mediante la secreción de distintos factores bioactivos y juegan un papel importante en la defensa inmune (Bouwens, *et al.*, 1992). Las células estrelladas hepáticas son responsables del almacenamiento de vitamina A y participan en el desarrollo de fibrosis como respuesta a un daño crónico, ya que adquieren capacidad contráctil proinflamatoria y profibrogénica (Ishibashi, 2009).

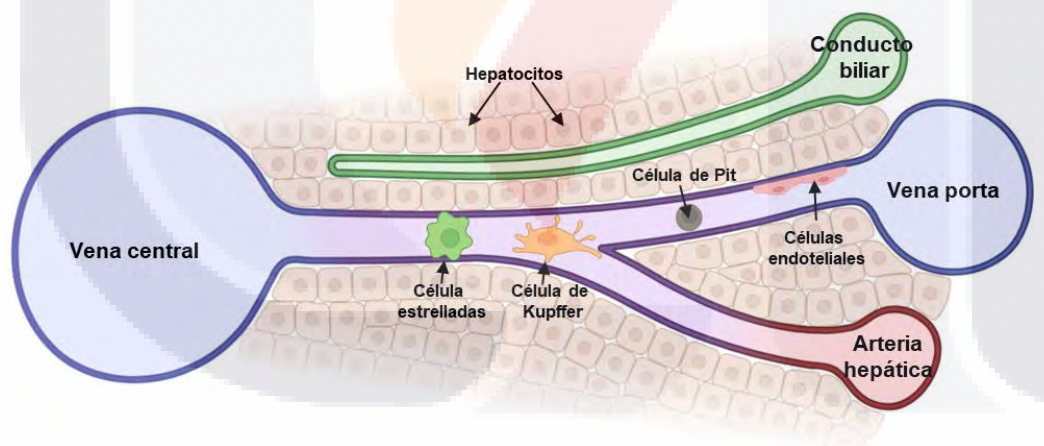


Figura 2. Células hepáticas

Los hepatocitos juegan un papel fundamental tanto en la síntesis y degradación de numerosas biomoléculas endógenas, como en la conversión y desintoxicación de compuestos xenobióticos. Con base en la ubicación de los vasos sanguíneos, los hepatocitos se dividen en dos subpoblaciones: periportales y perivenosos. Los

periporales reciben un alto flujo sanguíneo rico en oxígeno, hormonas y sustratos, ya que poseen un alto nivel de actividad metabólica, mientras que en los perivenosos se encuentran las enzimas necesarias para el metabolismo energético, la β -oxidación, catabolismo de aminoácidos y gluconeogénesis (Braeuning *et al.*, 2006). Los hepatocitos son las células más abundantes en el hígado, ya que comprenden más del 80% de la población por lo que son el primer blanco en los procesos de lesión, generando su pérdida y por consiguiente la alteración de la arquitectura y función del tejido hepático dando pie a la aparición de fibrosis.

La fibrosis resulta de la respuesta del hígado ante lesiones, cuando estas son agudas, las células del parénquima se regeneran, reemplazando a las células apoptóticas. Sin embargo, si la lesión persiste, la regeneración hepática falla produciéndose entonces la acumulación de colágena I. En el desarrollo de la fibrosis, se lleva a cabo una compleja cascada de mecanismos entre diferentes tipos celulares, en primer lugar, los hepatocitos liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) e inducen el reclutamiento de leucocitos por las células inflamatorias. Las células inflamatorias activan a las células estrelladas hepáticas (CEH) para secretar la colágena. Las CEH activadas liberan quimosinas proinflamatorias, además de expresar moléculas de adhesión celular y modular la activación de linfocitos, mientras que las células de Kupffer, que tienen un papel importante en la inflamación, liberan ROS y citocinas. Además, los cambios producidos en la composición de la matriz extracelular pueden estimular la fibrogénesis, por ejemplo, la colágena tipo IV y el fibrinógeno son capaces de estimular a las CEH residentes por la activación del TGF- β 1 (Bataller y Brenner, 2005). El inicio de la fibrosis hepática causa una serie de manifestaciones clínicas como la ascitis, la falla renal, el sangrado visceral, la hipertensión y encefalopatía hepática (Ishibashi, 2009).

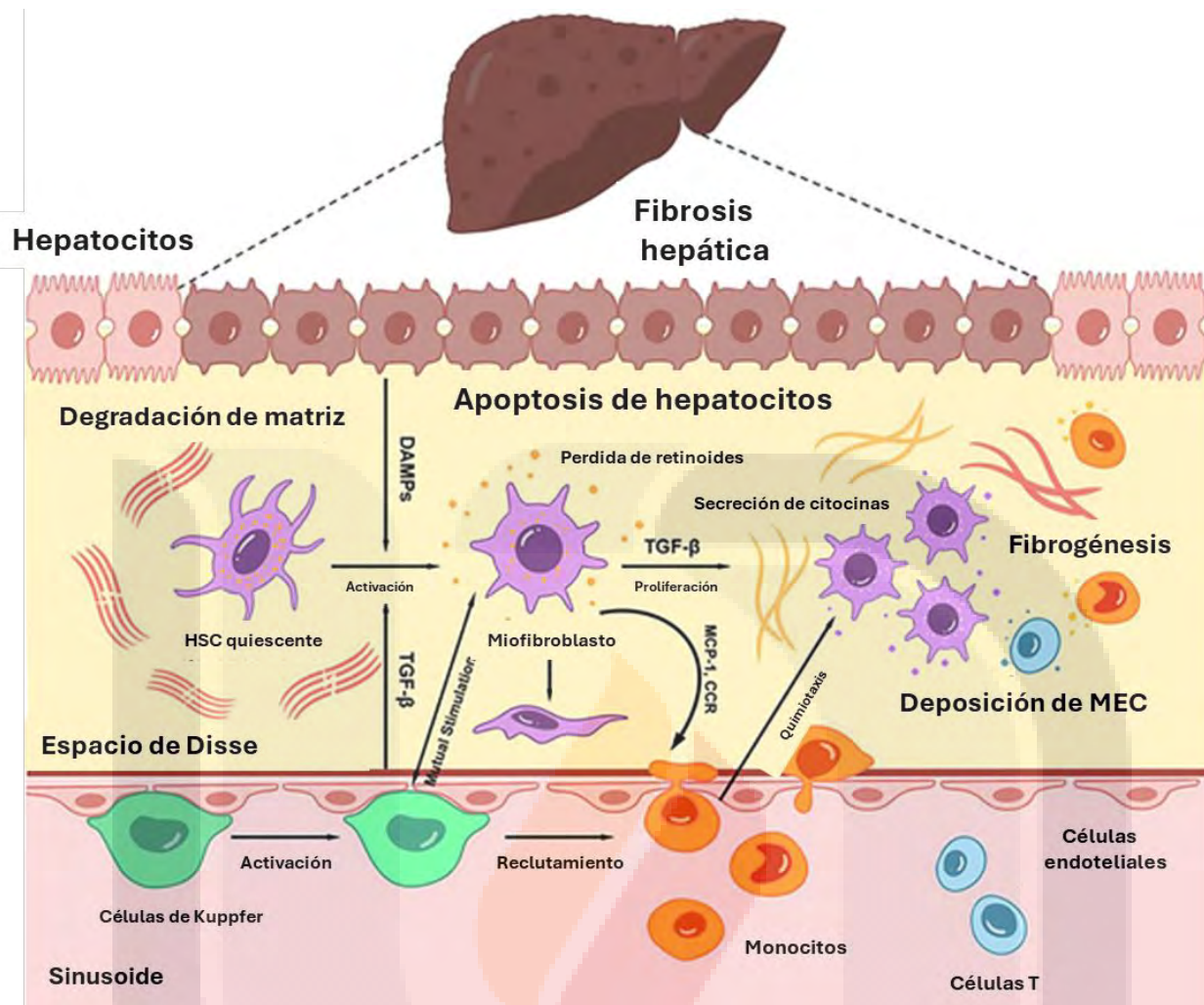


Figura 3. Mecanismo de la fibrosis hepática

3.2. Encefalopatía hepática

La encefalopatía hepática (EH) es una disfunción cerebral secundaria a cirrosis, falla hepática y/o derivaciones portosistémicas que se manifiesta en anomalías neurológicas como cambios en la personalidad, déficit de atención, disturbios en el sueño y memoria espacial, anormalidades sensoriales y psicomotoras, alteración de la función cognitiva; y en condiciones crónicas puede causar coma o muerte. Pacientes que desarrollan esta enfermedad tienen un mal pronóstico y generalmente se consideran candidatos a trasplante de hígado (França *et al.*, 2019).

La EH se clasifica de manera clínica de acuerdo con lo establecido por la ISHEN en tipo A, B y C. El tipo A es causado por insuficiencia hepática aguda con un comienzo rápido de necrosis de hepatocitos e inflamación severa sin un daño preexistente en el hígado. El tipo B se encuentra relacionado a una derivación porto sistémica en ausencia de falla o enfermedad hepática y por último el tipo C se asocia con enfermedad hepática crónica (cirrosis o fibrosis severa), (DeMorrow *et al.*, 2021).

Adicionalmente, puede clasificarse siguiendo los criterios de West Haven que organiza cinco diferentes estadios en función del grado de severidad clínico, el primero se conoce como EH mínima (EHM), la cual se distingue por presentar alteraciones psicométricas o neuropsicológicas y sin evidencia clínica de cambios mentales, el grado I se caracteriza por ligera falta de alertamiento, euforia o ansiedad, acortamiento del tiempo de atención, dificultad para realizar sumas o restas matemáticas e inversión del ritmo del sueño; el grado II se determina por síntomas como letargia o apatía, desorientación en tiempo, cambio de personalidad obvio, comportamiento inapropiado, dispraxia y asterixis, en el grado III se presentan síntomas desde somnolencia a estupor, confusión, desorientación, comportamiento bizarro, y finalmente el grado IV corresponde a un estado de coma (Morcillo-Muñoz *et al.*, 2020). La encefalopatía hepática grado I se conoce como encubierta mientras que los grados II, III y IV se clasifican como manifiesta (Romero-Gómez *et al.*, 2007).

Tabla 1. Clasificación de la EH de acuerdo el grado de severidad

Clasificación	ISHEN	Descripción
Mínima	Encubierta	Alteraciones psicométricas o neuropsicológicas.
I		-Euforia o ansiedad -Somnolencia diurna (inversión del ritmo del sueño) -Acortamiento del tiempo de atención -Insomnio -Dificultad para sumar o restar

II	Manifiesta	-Desorientación en tiempo - Letargia o apatía -Cambio de personalidad -Asterixis -Dispraxia
III		-Responde a estímulo Somnolencia a estupor -Confusión -Desorientación
IV		Coma

Se estima que, a nivel mundial los casos de EH manifiesta sucede en aproximadamente 30-40% de los pacientes cirróticos y la EH mínima ocurre en alrededor del 20 al 80% de los casos (El-Marasy, El Awdan, y Abd-Elsalam, 2019). En México existen alrededor de 100,000 a 200,000 pacientes cirróticos y 70 de cada 100 pacientes con cirrosis padece alguno de los cuatro grados de encefalopatía hepática y 30% de ellos fallece por esta complicación (Ramírez-Palma, Muñoz-Hernández y Melchor-López, 2016).

3.3. Progresión de la encefalopatía hepática

Actualmente se conoce que la progresión de la EH ocurre a partir de la sinergia entre la hiperamonemia, la inflamación y la neuroinflamación, desencadenando las alteraciones características que ocurren durante la enfermedad (Cabrera-Pastor *et al.*, 2019), (Figura 1). Shawcross y colaboradores en el 2004 provocaron hiperamonemia en pacientes cirróticos causando el deterioro de las funciones cognitivas cuando los pacientes presentaban inflamación, pero no cuando esta desaparecía. Estos datos indican que la inflamación agrava las alteraciones producidas por el aumento de amonio en sangre. Adicionalmente se ha visto que ratas con hiperamonemia crónica sin fallo hepático presentan activación de la microglia y neuroinflamación en el cerebelo; y que el tratamiento de estas con un antiinflamatorio restaura las funciones cognitivas, sugiriendo que la neuroinflamación ocasionada por la hiperamonemia juega un papel determinante en el deterioro neurológico durante la EH (Felipo, 2013).

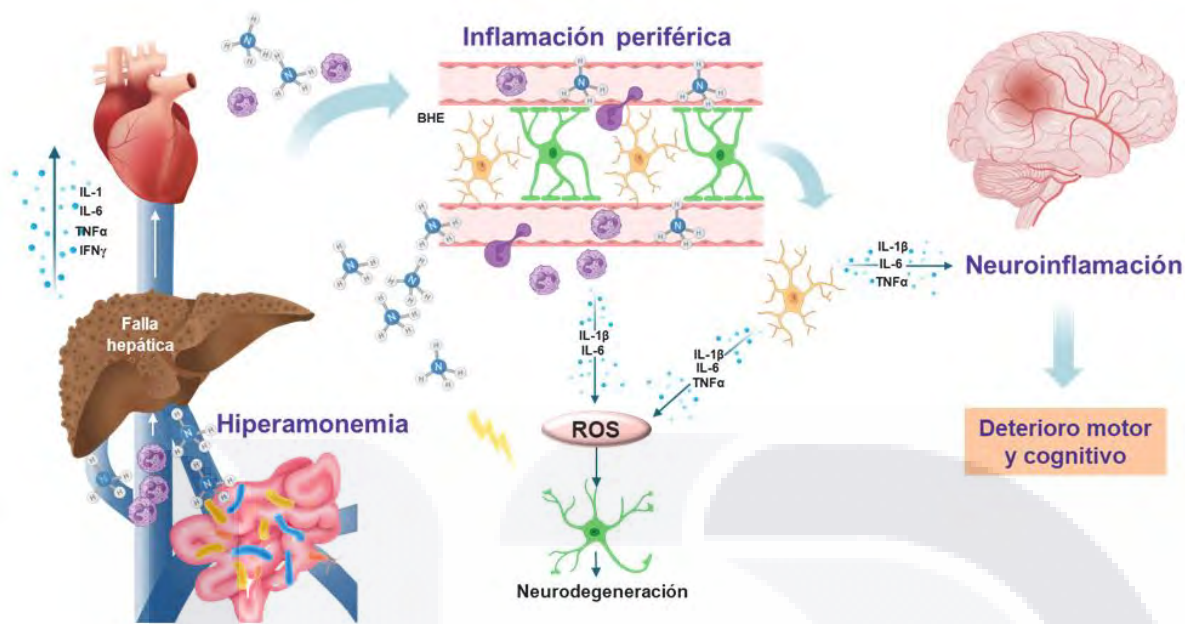


Figura 4. Efecto sinérgico de inflamación periférica, neuroinflamación e hiperamonemia en la inducción de EH.

3.3.1. Hiperamonemia

En condiciones saludables, el hígado tiene la función de metabolizar el amonio derivado de la degradación de proteínas en la mucosa intestinal a urea y glutamina, esto mediante la acción de enzimas glutamato deshidrogenasa y glutaminasa en el ciclo de la urea, sin embargo, cuando existe fallo hepático, el proceso de detoxificación no se lleva a cabo correctamente y se elevan sus niveles en sangre ocasionado hiperamonemia sistémica (Morcillo-Muñoz *et al.*, 2020).

El amonio es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) aumentando su concentración en el cerebro y ya que en este no se produce el ciclo de la urea, el único sitio del sistema nervioso central (SNC) donde ocurre la detoxificación de esta toxina es en los astrocitos (Lu *et al.*, 2020). Los astrocitos son células gliales del SNC presentes en la corteza cerebral cuya función es la de proporcionar apoyo físico y metabólico a las neuronas, incluyendo la regulación del metabolismo energético, eléctrico aislamiento, regulación de neurotransmisores, homeostasis de red, equilibrio iónico

extracelular y protección frente a neurotoxinas (Ochoa-Sánchez *et al.*, 2021). El metabolismo del amonio en dichas células ocurre por medio de la conversión de glutamato y amonio a glutamina en una reacción que consume ATP, y que es catalizada por la glutamina sintetasa. La glutamina resultante de esta reacción es liberada al espacio extracelular para ser capturada por las terminales neuronales. En las neuronas la enzima glutaminasa cataliza la transformación de glutamina a glutamato para liberarlo desde la terminal presináptica. Posteriormente, el glutamato es recapturado rápidamente por transportadores de aminoácidos para reincorporarlo en los astrocitos y repetir el ciclo (Sepehrinezhad *et al.*, 2020).

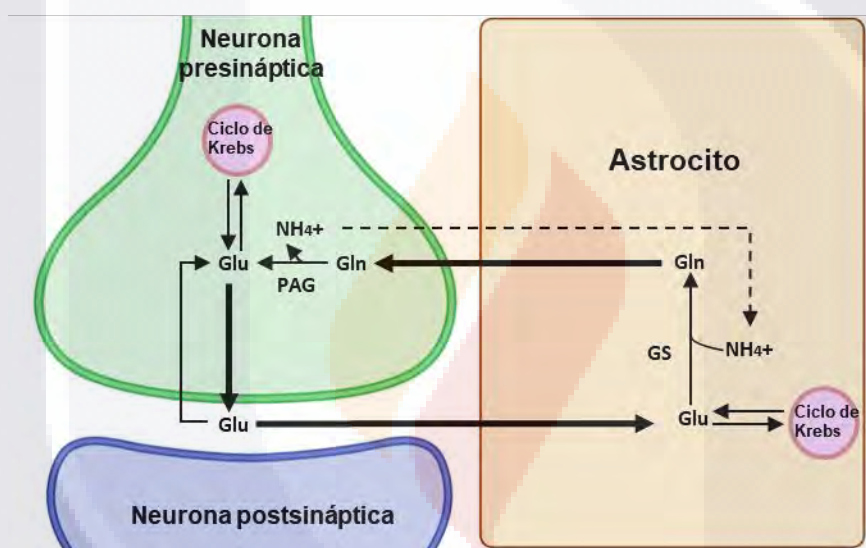


Figura 5. Metabolismo del amonio en los astrocitos.

El incremento acelerado de la concentración intracelular de amonio en los astrocitos se ha relacionado con un incremento del gradiente osmótico, esto ocurre debido a la sobreexpresión de proteínas como acuaporina IV, la cual se encuentra en la membrana de los astrocitos ocasionando un aumento en el flujo de líquido hacia el medio intracelular, disminución en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y sobreexpresión de los receptores de benzodiazepinas, todos elementos implicados en el desarrollo de la inflamación y alteraciones morfológicas de los astrocitos (Rojo *et al.*,

2007). Dichas alteraciones se caracterizan por el desarrollo de un gran núcleo, nucléolo prominente y marginación del patrón de cromatina, estos astrocitos dañados se asemejan estructuralmente a los astrocitos del Alzheimer tipo II.

Actualmente se desconoce el papel que juegan los astrocitos del Alzheimer tipo II en la progresión de la EH, sin embargo, debido a que participan en funciones clave para la homeostasis neural podrían estar asociados a la disfunción neuronal. Este tipo de astrocitos dañados se han reportado en pacientes cirróticos sin EH, lo que sugiere que la hiperamonemia por si sola promueve la formación de estos; en ratas con ligadura de conducto biliar (BDL) con dieta rica en amonio se observó una mayor presencia de astrocitos del Alzheimer tipo II y coordinación motora alterada en comparación con ratas con BDL y dieta normal (Jover *et al.*, 2006). Experimentos en ratas con hiperamonemia inducida por tioacetamida (TAA) mostraron que la toxicidad del amoníaco en los astrocitos está relacionada con el deterioro de la integridad neuronal, lo que afecta la función sináptica. Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que el edema cerebral se debe la inflamación de los astrocitos. Por lo tanto, la inflamación/disfunción de los astrocitos deteriora significativamente la comunicación neuronal, lo que resulta en disfunción, deterioro y eventualmente neurodegeneración (Ochoa-Sánchez *et al.*, 2021).

Además, se ha reportado que la toxicidad por amonio está asociada con una reducción de la proteína ácida fibrilar glial cerebral (GFAP); en un estudio *post mortem* de muestras cerebrales de pacientes con HE se observó la disminución de GFAP en los ganglios basales, la corteza cerebral, el tálamo y la sustancia blanca subcortical (Sepehrinezhad *et al.*, 2020). Tomando en consideración que GFAP es una proteína del citoesqueleto en los astrocitos implicada en la regulación de la motilidad y la forma de los astrocitos, el amoníaco podría estar relacionado con el deterioro de la estructura y

función de estos y, en consecuencia, la integridad sináptica y el rendimiento neurológico.

3.3.2. Inflamación periférica

El hígado posee un papel importante en la inmunidad del organismo contra agentes infecciosos provenientes del tracto gastrointestinal; ya que permite a las células del sistema inmune neutralizarlos mientras el flujo sanguíneo atraviesa del parénquima hepático hasta el sistema venoso portal (Bleibel y Al-Osaimi, 2012); durante fallas hepáticas esta función se ve alterada, permitiendo la entrada de agentes infecciosos a la circulación sanguínea y dando como resultado un estado crónico de inflamación regulado por la liberación sistémica de citocinas proinflamatorias que incluyen al factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e interleucina 12 (IL-12), (Aldridge *et al.*, 2015).

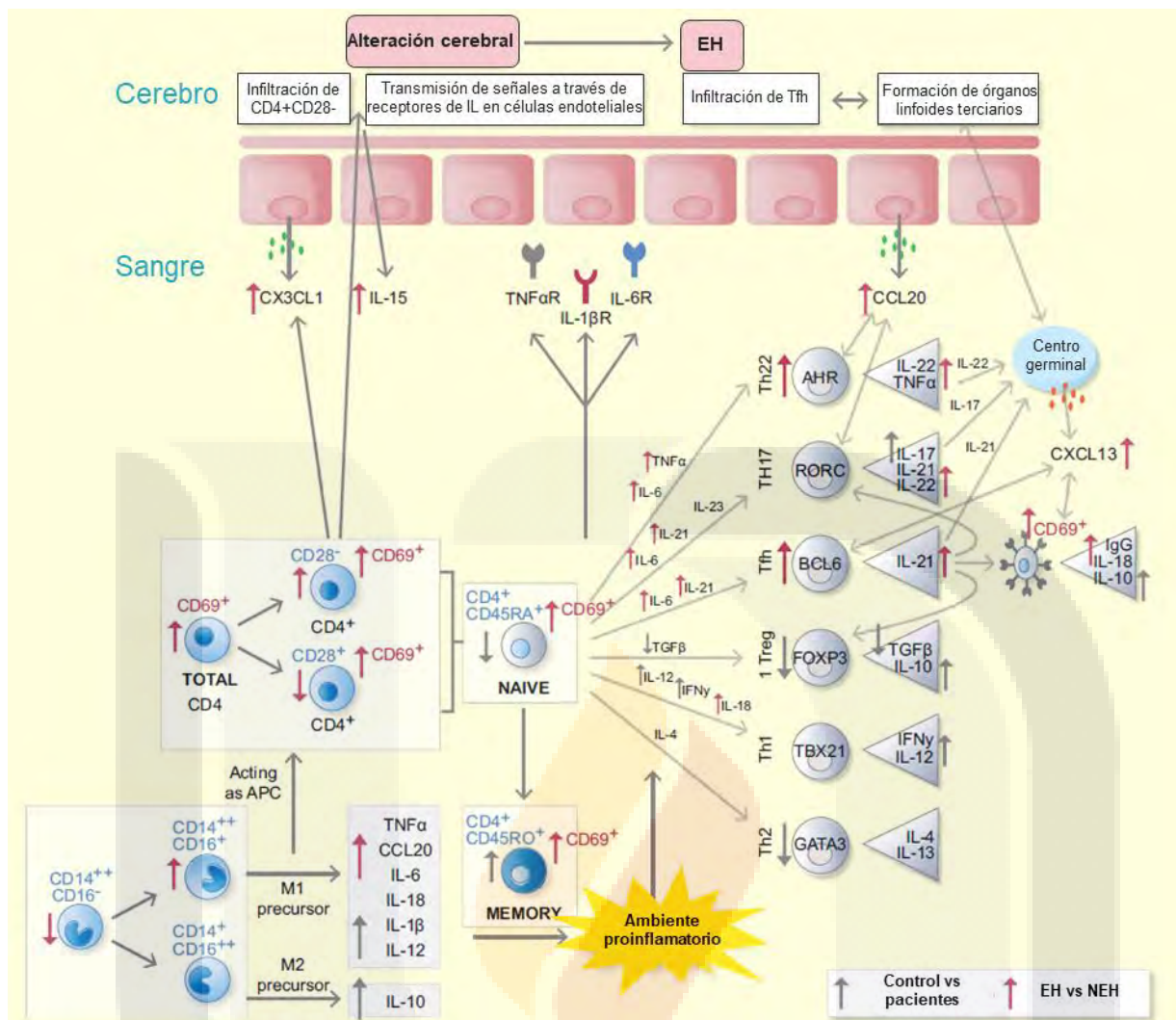


Figura 6. Respuesta inmune durante la EH

Los efectos de las moléculas proinflamatorias sistémicas provocan la activación de las células de la microglia, hecho que conlleva a la infiltración de células del sistema inmune periférico en el SNC, específicamente de células T, las cuales al ser capaz de migrar hacia el SNC, diferenciarse en distintos subtipos (Th1, Th2, Th17, Th22 o Tfh) y secretar distintas citocinas en el cerebro como $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , IL-6 permiten el establecimiento de la neuroinflamación (Cabral-Pastor *et al.*, 2019).

Existen distintos reportes que han relacionado la gravedad de la EH con un incremento en los niveles plasmáticos de citocinas. Existe una relación entre los niveles séricos de

TNF- α y el grado de severidad de la encefalopatía hepática en pacientes con fallo hepático crónico (Odeh *et al.*, 2004). Montoliu y colaboradores en el 2009 mostraron que la IL-6 e IL-18 están aumentadas en pacientes cirróticos con EHM comparadas con pacientes sin EHM y que los pacientes con niveles más altos de estas interleucinas IL-6 e IL-8 presentaron un peor resultado en la batería de pruebas psicométricas realizadas en el estudio, sugiriendo que alteraciones relacionadas con la IL-6 e IL-18 podrían contribuir al deterioro cognitivo durante la EH.

3.3.3. Neuroinflamación

La microglia son células residentes en el SNC que desempeñan un papel importante en la respuesta inflamatoria a cambios patológicos como infecciones, traumatismos, tumores, daños tisular o isquemia. Estas células cumplen varias funciones dentro del organismo como el reconocimiento de patógenos, fagocitosis, presentación de antígenos y remodelación de sinapsis. En respuesta a variaciones en el medio ambiente, las células microgliales pueden ser activadas por medio de cambios en su morfología y función. Su activación se divide en dos tipos: M1 clásico y M2 alternativa. En la activación M1, las células microgliales pueden volverse hiperramificadas o ameboides/fagocíticas y sintetizar moléculas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α e IL-6, radicales superóxidos, glutamato, óxido nítrico (NO) y, en última instancia, eliminar infecciones y reparar tejidos. La M2, puede ser desencadenada por citocinas como IL-4, IL-13 o IL-25, IL-10, factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y factores neurotróficos que facilitan la curación y delimitación las lesiones neuronales (Réus *et al.*, 2015).

El principal promotor de la neuroinflamación en muchas condiciones patológicas, incluyendo la hiperamonemia crónica y la EH es la microglia (Cabrera *et al.*, 2016). La activación de la microglia está asociada con daño neuronal en pacientes con falla hepática crónica ya que presentan neurodegeneración en células de Purkinje y capa

granular en el cerebelo como consecuencia de la activación M1. Dennis *et al.*, 2014 al analizar el cerebro *post mortem* de pacientes con cirrosis alcohólica y EH, reportó que 50% de los pacientes presentaron microglia activada con morfología hipertrofiada y cuerpos celulares cortos y engrosados. Esto sugiere que la proliferación microglial puede formar parte de una respuesta neuroprotectora temprana ante la EH, sin embargo, este mecanismo falla en el curso de la enfermedad producto del contenido de amoníaco cerebral alto y de que la inflamación sistémica permanece.

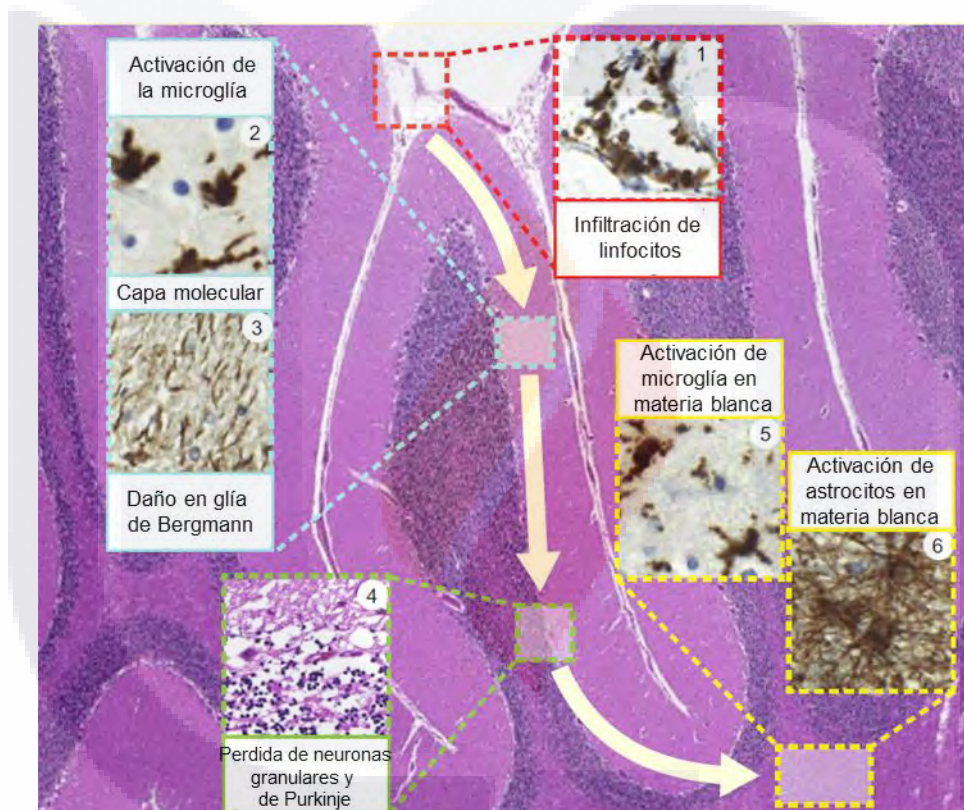


Figura 7. Alteraciones en cerebelo durante la EH.

En modelos animales de encefalopatía hepática se ha reportado que la neuroinflamación en el cerebelo e hipocampo conlleva a la activación de la microglia y astrocitos, además de incrementos en los niveles de IL-1B y TNF- α (Cabrera *et al.*, 2019). El establecimiento de la neuroinflamación y activación de la microglia se ha relacionado al deterioro cognitivo, Cauli y colaboradores en 2007 mostraron que ratas con anastomosis porto-cava (APC), presentan neuroinflamación y una capacidad reducida

para aprender una tarea en el laberinto en Y, y que esta capacidad podía ser restaurada al iniciar tratamiento con un antiinflamatorio como el ibuprofeno. Este mismo efecto se reportó en ratas con BDL las cuales presentan activación de la microglia, principalmente en el cerebelo, provocando un aumento de los niveles de factores inflamatorios y deterioro cognitivo e hipoquinesia, el tratamiento crónico con ibuprofeno redujo la activación microglial y los marcadores inflamatorios y restauró las funciones motoras y cognitivas (Rodrigo *et al.*, 2010).

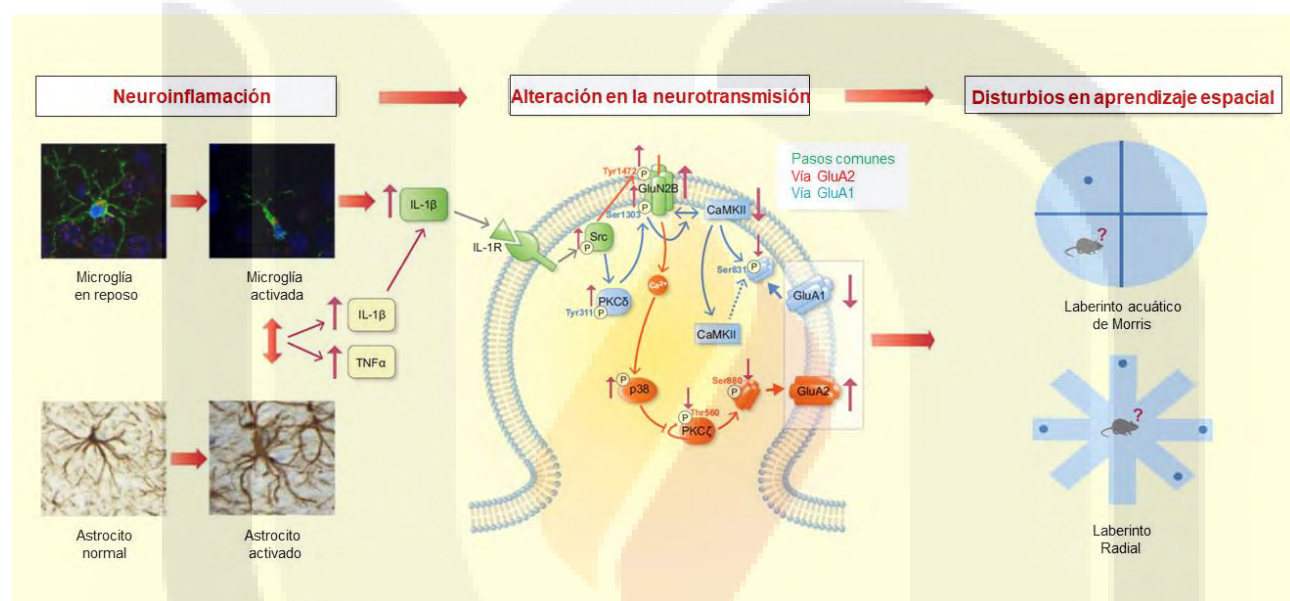


Figura 8. Alteraciones en hipocampo durante la EH.

3.4. EH y neurodegeneración

Las neuronas son las encargadas de transmitir y recibir señales para permitir la regulación de todas las funciones del cuerpo. Por lo tanto, la alteración en su estructura, función, conectividad, así como su muerte, se ha asociado con diferentes trastornos neurológicos. Durante la EH se ha observado que el amonio actúa como neurotoxina provocando modificaciones celulares en el cerebro que están asociadas con la estructura celular, la morfología, proliferación/densidad, excitotoxicidad y muerte celular (Braissant *et al.*, 2013). En diversos estudios con ratas con EH se han asociado

alteraciones cognitivas y de coordinación motora con modificaciones en la estructura de las neuronas, específicamente con la reducción de espinas dendríticas en neuronas corticales e hipocampales (Ochoa-Sánchez *et al.*, 2021). Mohammadian *et al.*, 2019 evidenciaron deficiencias neurológicas asociadas con la pérdida de la actividad sináptica, apoptosis y muerte de células neuronales en el hipocampo y sustancia negra compacta en ratas con BDL e hiperamonemia.

3.4.1 Daños en el cerebelo permiten el establecimiento de alteraciones cognitivas y en la coordinación motora durante la EH

El cerebelo está encargado de la regulación de la coordinación motora, equilibrio y algunos tipos de aprendizaje como el motor, asociativo y emocional, además de componentes del aprendizaje espacial, memoria de trabajo, atención visuoespacial y función verbal (Timman *et al.*, 2010). La corteza cerebelosa se encuentra dividida en tres capas, la capa interna, también llamada granular formada por pequeñas células granulares que constituyen la mitad de las neuronas en el cerebelo, la capa intermedia o de células de Purkinje formada por neuronas de Purkinje y la capa molecular en donde se hallan células estrelladas y células en cesta (Voogd y Glickstein, 1998).

La capa granular está formada por dos tipos de neuronas, de Golgi y grano. Las primeras son inhibitoras mientras que las de grano son las únicas que liberan glutamato y sus axones forman fibras que se bifurcan en la capa molecular para realizar sinapsis excitadoras con las dendritas de las células de Purkinje. A continuación, la capa de células de Purkinje está formada por grandes neuronas que son inhibitoras liberadoras de GABA, sus axones constituyen las únicas vías aferentes de la corteza cerebelosa. Finalmente, la capa molecular es multisináptica, forma la capa superficial de la corteza cerebelosa adherida a la piamadre, en ella predominan neuronas inhibitoras liberadoras de GABA (Jaramillo y Calderón, 2021).

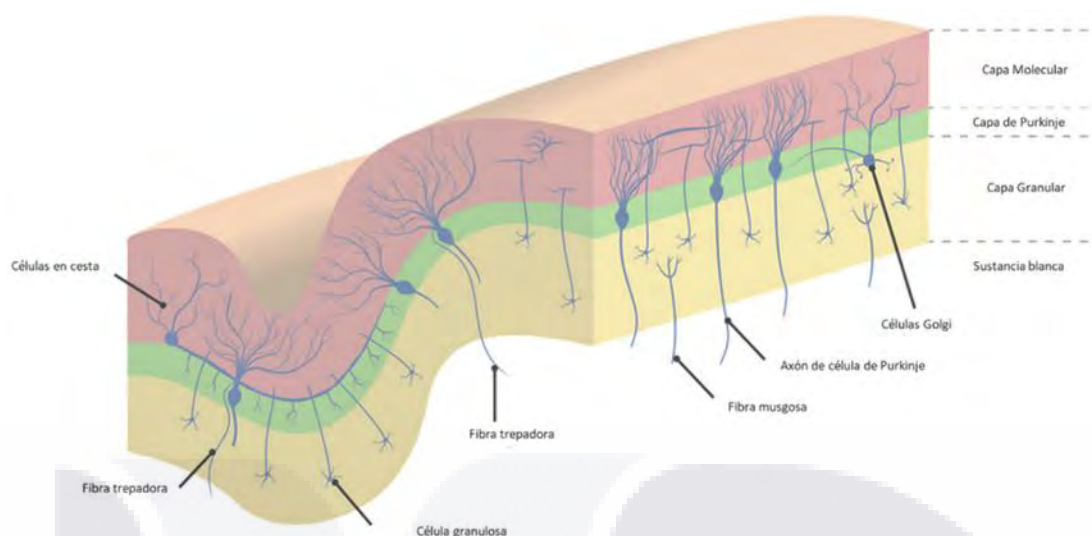


Figura 9. Estructura de la corteza cerebelar.

Las alteraciones en el cerebelo se caracterizan por la aparición de ataxia, hipotonía, abasia y astasia. En pacientes con EHM se ha demostrado la presencia de temblores, ataxia y alteración de los movimientos lentos, lo que indica que el cerebelo es una de las principales zonas en dañarse durante esta enfermedad (Felipo *et al.*, 2014). Además en un estudio con cultivos de neuronas cerebelares granulosas se observó que la administración de amonio induce la alteración de la morfología neuronal, ruptura de neuritas y el desmontaje del citoesqueleto conduciendo a la muerte celular (Cai *et al.*, 2019). López-Cervantes y colaboradores (2021) reportaron en ratas con EH inducida por APC alteraciones celulares como pérdida de las células de Purkinje e inflamación de astrocitos.

El cerebelo desempeña un papel fundamental en la modulación de la coordinación motora y ciertos tipos de aprendizaje a través de la neurotransmisión GABAérgica y la regulación del GABA extracelular. Este neurotransmisor, el principal inhibitorio del sistema nervioso, participa en aproximadamente el 40% de las sinapsis de este tipo. Las concentraciones elevadas de amonio pueden alterar significativamente la neurotransmisión GABAérgica al activar los receptores GABA A mediante distintos mecanismos: un aumento en la afinidad del receptor por su ligando, una mayor cantidad

de sitios de unión selectivos para GABA y agonistas de benzodiazepinas, una reducción en la captación y un incremento en la liberación de GABA por los astrocitos. Además, se ha observado una sobreexpresión de los receptores periféricos de benzodiazepinas en los astrocitos, lo que favorece la síntesis y liberación de agonistas neuroesteroideos del complejo receptor GABA A. En conjunto, estos efectos permiten que el amonio incremente tanto directa como indirectamente la neurotransmisión inhibitoria mediada por GABA, lo que clínicamente se traduce en deterioros motores y cognitivos desde las etapas iniciales de la EH (Rojó *et al.*, 2007). En modelos animales, las ratas con hiperamonemia y encefalopatía hepática mínima presentan un aumento en los niveles de GABA extracelular y un incremento del tono GABAérgico, lo que refuerza la relación entre la disfunción GABAérgica y las alteraciones neurológicas observadas en la EH.

Además, en la EH se ha observado una alteración en la concentración del neurotransmisor inhibitorio GABA como consecuencia de la neuroinflamación. Este efecto ha sido descrito en ratas con APC, donde se ha identificado activación microglial, un aumento en los niveles de IL-1 β y TNF- α , así como una mayor expresión del receptor TNFR1 de TNF- α . Esta última alteración promueve la activación de NF- κ B en el núcleo celular, lo que desencadena la transcripción de genes proinflamatorios y contribuye al incremento de los niveles de glutamato extracelular.

El glutamato es captado principalmente por los transportadores GLT1 y GLAST en los astrocitos. No obstante, en astrocitos activados, la función del transportador GAT-3 se invierte, favoreciendo la liberación de GABA al fluido extracelular. Este mecanismo ha sido vinculado con alteraciones en la coordinación motora y en la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y (Figura 3) (Cabrera *et al.*, 2019)

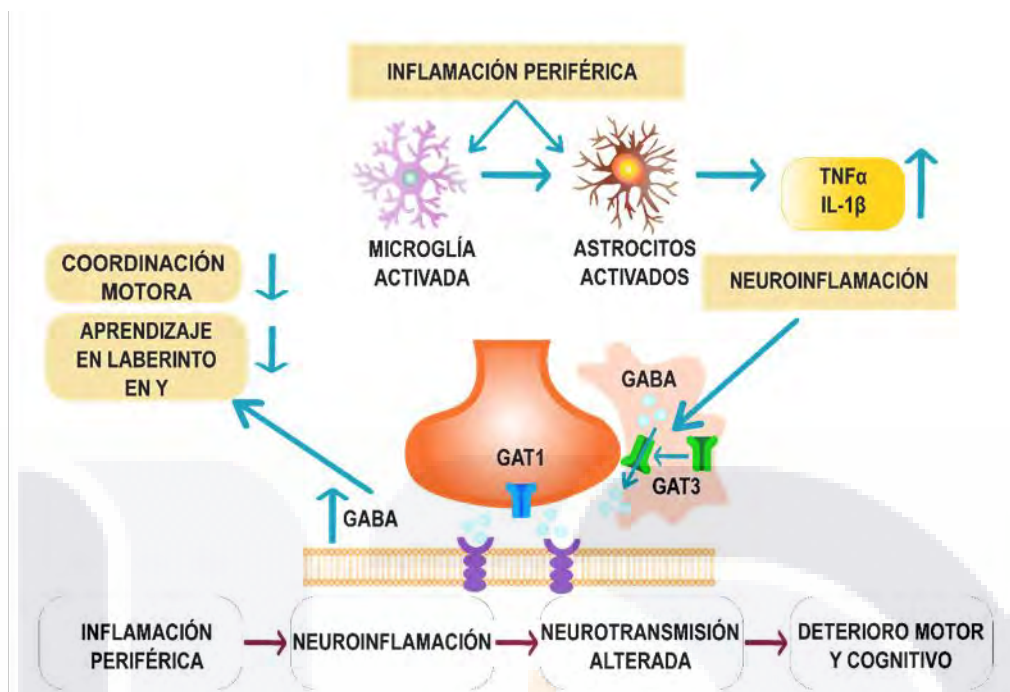


Figura 10.. Efecto de neuroinflamación sobre la vía GABAérgica durante la EH. La inflamación periférica favorece el incremento de citocinas proinflamatorias, los cuales actúan alterando la neurotransmisión de GABA lo que provoca deterioro en funciones motoras y cognitivas.

3.4.2 Daños en el hipocampo promueve la inducción de alteraciones cognitivas durante la EH

El hipocampo es una estructura mesolímbica clave en procesos cognitivos, memoria y aprendizaje. Dentro del sistema nervioso central (SNC), se localiza en el lóbulo temporal medial y, junto con el giro dentado, el subículo, el presubículo y la corteza entorrinal, conforma la formación hipocampal. El giro dentado se distingue por una capa densamente empaquetada de células granulares pequeñas que rodea el extremo del hipocampo y da paso a las regiones de CA (CA3, CA2 y CA1). Todas las regiones CA están organizadas en capas, siendo el *stratum pyramidale* la principal, compuesta por neuronas piramidales. Por debajo de esta capa se encuentra el *stratum oriens*, que alberga las dendritas basales de las células piramidales y algunas interneuronas.

En la región CA3, por encima del *stratum pyramidale*, se encuentra el *stratum lucidum*, caracterizado por la presencia de fibras musgosas, que son los axones de las neuronas

granulares. Encima de esta capa, en la región CA3, se ubica el *stratum radiatum*, el cual también se encuentra sobre la capa piramidal de CA2 y CA1. Finalmente, la capa más externa de CA3 es el *stratum lacunosum-moleculare* (Figura 11) (Andersen *et al.*, 2007). A nivel neuronal, las capas piramidales del hipocampo están densamente pobladas por neuronas glutamatérgicas, que poseen un bajo umbral de activación, lo que facilita un alto grado de neuroplasticidad en esta región. De hecho, las neuronas piramidales glutamatérgicas representan aproximadamente el 90% del total de neuronas en el hipocampo, un porcentaje significativamente mayor que en otras áreas de la corteza cerebral (Briend *et al.*, 2020).

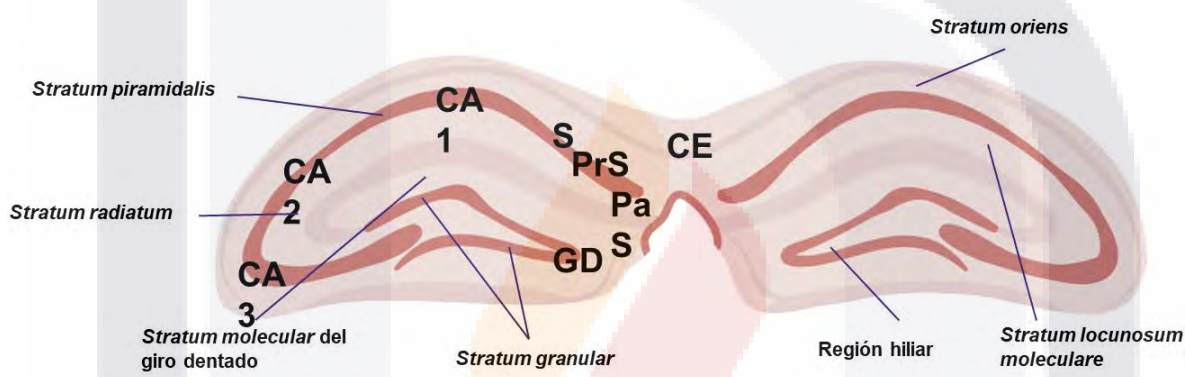


Figura 11. Estructura del hipocampo.

El hipocampo juega un papel clave en los procesos de memoria, especialmente en la memoria episódica a largo plazo que se encuentra regulada por canales iónicos activados por glutamato (Paoletti *et al.*, 2013). El glutamato es un aminoácido no esencial que actúa como neurotransmisor en la mayoría de las funciones cerebrales incluida la memoria, aprendizaje, regulación cognitiva, emocional y endocrina. La mayoría de las neuronas excitadoras del sistema nervioso central son glutamatérgicas, y se estima que aproximadamente el 50% de todas las sinapsis cerebrales liberan este neurotransmisor. Dado que el glutamato no atraviesa la barrera hematoencefálica, su síntesis ocurre directamente en las neuronas a través de dos vías principales: a partir de la glutamina en las neuronas o mediante la transaminación del α -cetoglutarato en células gliales.

Una vez sintetizado, el glutamato es almacenado en vesículas presinápticas de las neuronas glutamatérgicas y liberado en la hendidura sináptica durante la neurotransmisión. Posteriormente, se une a sus receptores específicos en las neuronas postsinápticas, desencadenando una respuesta fisiológica. Existen diferentes tipos de receptores de glutamato, pero los más importantes son los receptores ionotrópicos de Ca^{2+} y/o Na^{2+} , NMDA y AMPA (Palmada y Centelles, 1998). Los receptores NMDA, son heterotetrámeros compuestos por dos subunidades NR1 y dos subunidades regulatorias de unión a glutamato NR2 (NR2A-D). En condiciones de potencial de membrana en reposo se encuentran inactivos debido al bloqueo del canal por Mg^{2+} , para la activación de este receptor además de la unión de glutamato y coactivador, la glicina, debe ocurrir una despolarización de la membrana para expulsar al Mg^{2+} y permitir la apertura del canal (Baez *et al.*, 2018). Los receptores AMPA, están formados por 5 subunidades denominadas GluR1-4, se les atribuye la mayor parte de la neurotransmisión excitatoria rápida en el SNC; su activación produce la despolarización de membrana que conlleva a la apertura de los receptores NMDA; ambos receptores se encuentran asociados a procesos de plasticidad sináptica, responsable de procesos de memoria y aprendizaje por lo que una desregulación en las funciones de estos puede llevar a deterioro cognitivo y disminución de memoria (Yadav *et al.*, 2016).

Dadsetan y colaboradores (2016) plantearon la hipótesis de que las alteraciones cognitivas en ratas con encefalopatía hepática se deben a que la neuroinflamación genera cambios en la expresión de los receptores a glutamato en el hipocampo (Figura 4). González y colaboradores (2018) reportaron que en ratas con hiperamonemia el incremento en niveles de IL-1 β como respuesta a la neuroinflamación en el hipocampo pueden alterar la expresión de las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA en la membrana. Este efecto se observó en ratas en las que el suministro exógeno de TNF- α favoreció el aumento de la expresión de la subunidad GluA1, pero disminuyó la subunidad GluA2. Por el contrario, el suministro de altas concentraciones de IL-1 β

disminuyó la expresión de membrana de GluA1. Adicionalmente, este efecto se ha observado en ratas con APC en donde se relacionó la neuroinflamación con cambios en la expresión de las subunidades GluA1 y GluA2 de los receptores AMPA y subunidades NR1 y NR2A de los receptores NMDA; dichos cambios favorecieron el deterioro de la memoria espacial y aprendizaje en pruebas de laberinto radial y laberinto acuático de Morris (Cabrera *et al.*, 2019).

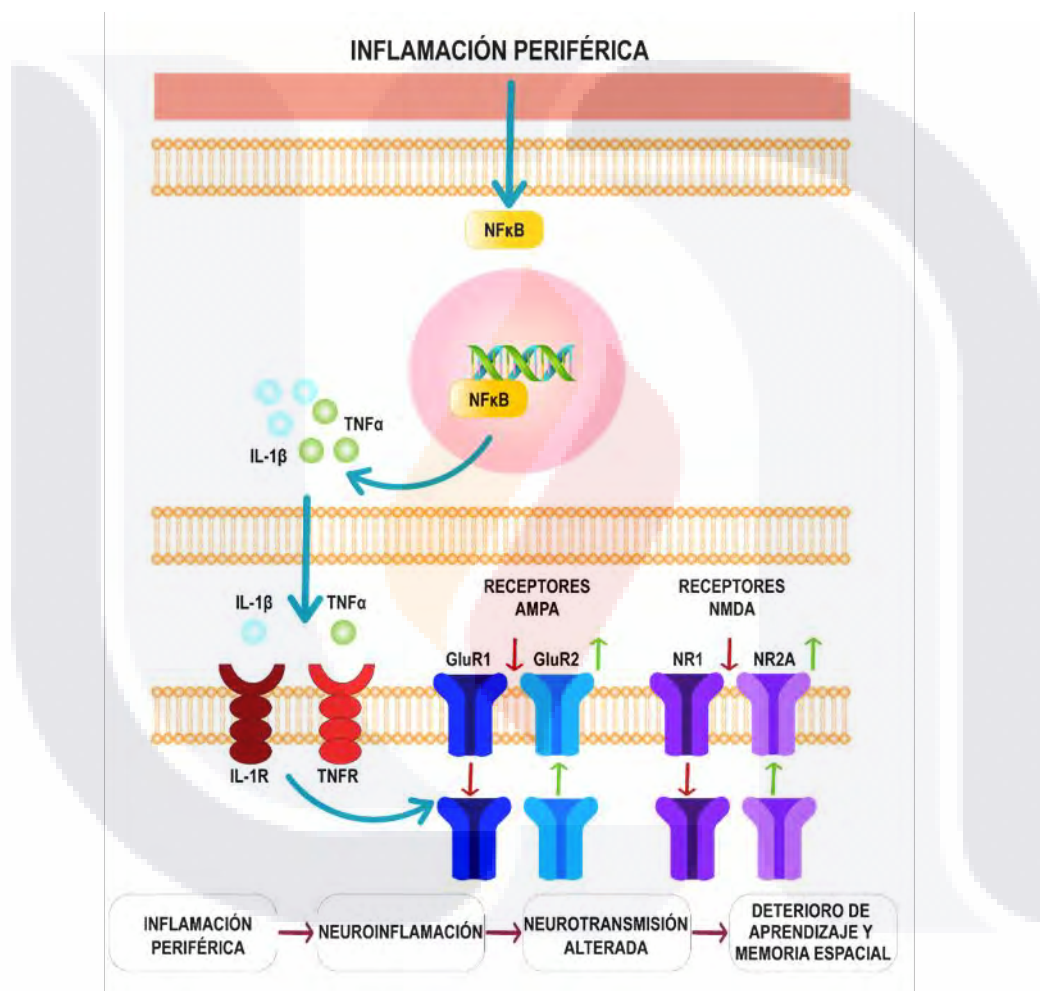


Figura 12. La inflamación afecta la expresión de receptores glutamatergicos en el hipocampo favoreciendo el deterioro de aprendizaje y memoria espacial durante la EH.

En el cerebro adulto, el hipocampo está involucrado en neurogénesis y plasticidad neuronal a través fenómeno neurofisiológico llamado potenciación a largo plazo (LTP). La LTP es una forma de plasticidad sináptica que conduce a un aumento sostenido de

la eficiencia sináptica y se considera la base para algunas formas de aprendizaje y memoria. La inducción de LTP en el hipocampo requiere la modulación de los receptores AMPA y NMDA y consecuentemente activación de la vía glutamato/NO/cGMP/PKG, sin embargo, estudios en hipocampo (región CA1) de ratas con hiperamonemia han revelado la disminución de la activación de esta vía resultando en deterioro de LTP (França, 2019). En otros estudios en neuronas piramidales del hipocampo expuestas a amoníaco (100 μ M) observaron la inhibición de la LTP, indicando que la disminución neurocognitiva en el hipocampo está asociada directamente con la toxicidad del amoníaco (Yuan *et al.*, 2020).

Por otro lado, la EH puede alterar la vía de neurotransmisión glutamatérgica mediante la disrupción de la función de los astrocitos, ya en estos el glutamato intracelular se metaboliza a glutamina. La glutamina recién generada se transporta de regreso a las neuronas permitiendo que sea metabolizado a glutamato y amoníaco. Sin embargo, al inducirse la inflamación de los astrocitos durante la EH se puede afectar esta comunicación entre astrocitos y neuronas y tener un impacto en los niveles de glutamato que conducen a un agotamiento de glutamato intracelular y eventualmente muerte neuronal (Ochoa-Sánchez *et al.*, 2021).

3.5. Tratamientos

Actualmente, la mayoría de los tratamientos utilizados para atenuar los síntomas de la encefalopatía hepática se enfocan en la disminución de los niveles de amonio en sangre, dentro de los más utilizados destacan disacáridos no absorbibles (lactulosa), antibióticos capaces de inhibir ureasas (neomicina, paromomicina, metronidazol, vancomicina y rifaximina), laxantes (polietilenglicol) y agentes que disminuyen el amonio (benzoato, L-Ornitina L-Aspartato, zinc y nitazoxanida), (Morcillo-Muñoz *et al.*, 2020). Adicionalmente, nuevos tratamientos se han implementado para contrarrestar la EH como carbón esférico (AST-120) que absorbe amonio y otros compuestos orgánicos del

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tracto gastrointestinal, trasplante de microbiota fecal con flora bacteriana benéfica como Lachnospiraceae y Ruminococcaceae y el uso de probióticos (Kornerup *et al.*, 2018). Desafortunadamente las estrategias antiamonémicas actuales han demostrado impactar muy poco en la calidad de vida de los pacientes con EH; por este motivo, se están estudiando nuevos blancos terapéuticos capaces de contrarrestar la neuroinflamación, estrés oxidativo y daños neurológicos.

Se han propuesto diversas estrategias terapéuticas dirigidas a reducir la neuroinflamación en la encefalopatía hepática mínima (EHM). Entre ellas, el ibuprofeno ha demostrado ser capaz de restaurar la capacidad de aprendizaje y revertir la hipoquinesia en ratas con EHM. Además, los inhibidores de la proteína quinasa p38 poseen propiedades antiinflamatorias que reducen la activación de la microglía, lo que contribuye a la recuperación de las funciones cognitivas y motoras (Agustí *et al.*, 2011). Asimismo, se han explorado nuevas aproximaciones terapéuticas dirigidas a dianas específicas en el cerebro con el objetivo de mejorar el deterioro cognitivo y motor en pacientes con EHM. Por ejemplo, los inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5), como el sildenafil, incrementan los niveles de GMPc en el cerebelo y han demostrado restaurar las funciones cognitivas en modelos animales de EH (Felipo, 2013).

El-Marasy *et al* en el 2009 evaluaron el efecto de la crisina sobre un modelo de EH inducido por tioacetamida, este flavonoide vegetal se ha relacionado con beneficios farmacológicos como hepatoprotector, antioxidante y antiinflamatorio. Este estudio muestra que la crisina ejerció un efecto antiinflamatorio y antioxidante en ratas con EH, evidenciado por la reducción de los niveles de amonio en sangre, la inactivación de la vía inflamatoria TLR-4/NF- κ B y los efectos antiapoptóticos. En otro estudio elaborado por França y colaboradores en el 2009 se evaluó el efecto de tadalafilo en neuroinflamación, aprendizaje y memoria en ratas inducidas con TAA y encontraron que este fármaco atenúa la neuroinflamación mediante la disminución de expresión de

p38, MAPK, ERK, NF- κ B, IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Además de que el tadalafilo promueve la neurogénesis y la plasticidad y normaliza la expresión de receptores de glutamato en el hipocampo lo que favorece las vías de señalización de aprendizaje y memoria (França *et al.*, 2019). Por otro lado, el tratamiento con sulforafano favoreció la diferenciación de la microglia de su forma proinflamatoria M1 a la antiinflamatoria M2 en ratas con hiperamonemia. Esto se asoció con la reducción de IL-1 β y un incremento en los niveles de IL-4, IL-10, Arg1 y YM-1 en el cerebelo, esto se asoció con la recuperación de la habilidad de aprendizaje en el laberinto en Y, y la coordinación motora en la prueba de barra transversal (Hernández-Rabaza *et al.*, 2016).

La encefalopatía hepática se define como un síndrome reversible después de un trasplante de hígado, sin embargo, estudios han revelado que el 47% de los pacientes presentan complicaciones neurológicas postrasplante que se pueden prolongar por meses o años. Dentro de los síntomas más comunes se encuentran la alteración de la conciencia, desorientación, confusión, deterioro de la memoria, dolores de cabeza, dificultad para concentrarse, déficits motores focales, fatiga, dificultad para dormir y trastornos del estado de ánimo (Ochoa-Sánchez *et al.*, 2021). Es por esto último que la búsqueda de nuevos tratamientos coadyuvantes que disminuyan los daños neurológicos producidos durante la EH es un problema importante por resolver en los años venideros.

3.6. **Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)**

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es un decapeptido, pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly·NH₂, que participa en la regulación del eje reproductivo neuroendocrino. La GnRH es sintetizada por las células neurosecretoras hipotalámicas y liberada de manera pulsátil en la circulación portal hipotálamo-hipófisis, a través de la cual la hormona es transportada a la hipófisis anterior para unirse a su receptor GnRH-R tipo I y permitir la biosíntesis y secreción de las hormonas foliculoestimulante (FSH)

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y luteinizante (LH), que a su vez regulan la secreción gonadal, esteroidogénesis y gametogénesis en ambos sexos (Millar, 2005). Además de esta conocida función endocrina, se ha reportado que la GnRH posee importantes funciones autocrinas y/o paracrinas en ovario, placenta, útero y sistema inmunitario (Cheng y Leung, 2005); ejerciendo una variedad de acciones como el aumento de la esteroidogénesis, proliferación celular, fertilización, implantación embrionaria, adhesión a matriz extracelular y migración celular (Quintanar *et al.*, 2011).

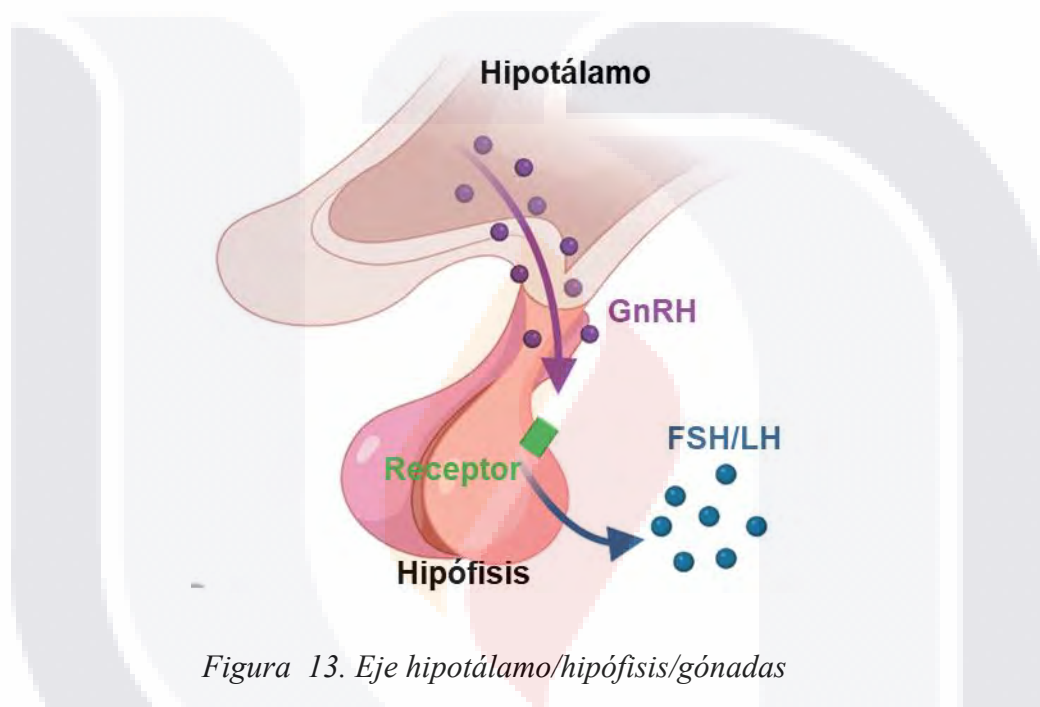


Figura 13. Eje hipotálamo/hipófisis/gónadas

Además de las funciones mencionadas, se ha reportado que la GnRH tiene propiedades neurotróficas. En un estudio realizado en cultivo de neuronas cerebrales de embriones de rata, se observó un incremento en el número y longitud de neuritas, además de un aumento en la expresión de neurofilamentos (Quintanar y Salinas, 2008). Este último efecto fue reportado en un modelo animal de encefalomiелitis experimental autoinmune (EEA) en donde el tratamiento con la hormona favoreció la locomoción como consecuencia del incremento de los neurofilamentos (Quintanar y col., 2011). Por otra parte, un estudio realizado en un modelo de lesión medular por compresión demostró

que la administración de la GnRH mejora la función locomotora y el reflejo de micción de las ratas (Calderón-Vallejo y Quintanar, 2012).

3.6.1. Agonista de la GnRH: Acetato de leuprolida

El acetato de leuprolida (AL) es un nonapéptido sintético análogo de GnRH, con el nombre químico 5-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tir-D-Leu-Leu-Arg-ProNHC₂H₅acetato. El AL es más potente que la GnRH debido a su mayor afinidad por el receptor GnRH-R1, posee una vida media más larga (~3h en comparación con 3-4 minutos), y es resistente a la degradación enzimática gracias al remplazo de Gly6 por D-Leu (Wilson *et al.*, 2007). Este fármaco es ampliamente administrado para el tratamiento de endometriosis, fibromas uterinos, cáncer de próstata y pubertad precoz central, además de ser utilizado para técnicas de fecundación *in vitro*.



Figura 14. Estructura de la GnRH y su análogo acetato de leuprolida.

Estudios recientes han demostrado que el acetato de leuprolida posee propiedades neurotróficas y antiinflamatorias. Díaz-Galindo *et al.*, 2016 administraron AL a ratas con lesión medular y observaron la recuperación de la locomoción a la quinta semana de tratamiento además de la disminución de la microglia activada. Por otro lado, en un modelo de esclerosis múltiple se observaron las propiedades antiinflamatorias del acetato de leuprolida al promover la disminución en la expresión de mRNA de citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-17 α y TNF- α durante la fase de recuperación (Guzmán-Soto

et al., 2016). Sacamoto y colaboradores en el 2003 reportaron que el tratamiento con un agonista de GnRH en endometriosis causo la disminución en la expresión de IL-8 al reducir la activación de TNF α y NF- κ B. Adicionalmente en un modelo de transección completa de nervio ciático se reportó que el tratamiento con LA mejoró la marcha, la velocidad de la marcha, velocidad de conducción nerviosa, la morfometría de los axones y la expresión de MAP-2 (Hernández-Jasso *et al.*, 2020). Dadas las propiedades del agonista de la GnRH ya mencionadas, en este proyecto se plantea evaluar el efecto del acetato de leuprolida en un modelo de encefalopatía hepática.

4. Objetivos

4.1. **Objetivo general**

- Evaluar el efecto del tratamiento con acetato de leuprolida sobre un modelo de encefalopatía hepática.

4.2. **Objetivos específicos**

- Evaluar el comportamiento motor y cognitivo de ratas con encefalopatía hepática tratadas con acetato de leuprolida.

- Analizar estructuras involucradas en el comportamiento motor y cognitivo de ratas con encefalopatía hepática tratadas con acetato de leuprolida.

- Evaluar marcadores de recuperación neurológica en ratas con encefalopatía hepática tratadas con acetato de leuprolida.

- Determinar el efecto de acetato de leuprolida sobre la expresión de marcadores proinflamatorios asociados con encefalopatía hepática.

5. Materiales y métodos

5.1 Diseño experimental

Para la realización del proyecto se utilizaron ratas macho Wistar, con un peso corporal mayor a 250 gramos. Los animales se obtuvieron del bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes y se manejaron de acuerdo con las normas y estándares de bienestar estipulados por dicha institución. Se mantuvieron en ciclo luz/oscuridad (12h/12h) y temperatura controlada (~25°C). El acceso a comida y agua fue *ad libitum*. Los animales se dividieron en 3 grupos (tabla 2).

Tabla 2. Grupos experimentales

Grupo 1	SHAM	Animales con falsa cirugía.
Grupo 2	Solución salina (APC+SS o SS)	Animales con anastomosis porto-cava y administración de solución salina.
Grupo 3	Acetato de leuprolida (APC+AL o AL)	Animales con anastomosis porto-cava y tratamiento con acetato de leuprolida.

El diseño experimental constó de 10 semanas, durante la semana 0 se realizaron las intervenciones quirúrgicas a los grupos SHAM, solución salina y acetato de leuprolida. Posteriormente, a la semana 4 se comenzó con el tratamiento a los grupos SS y AL. A la semana 9 se realizaron las pruebas de función motora y cognitiva a los 3 grupos, y finalmente se efectuó la colecta de los tejidos (hígado, hipocampo y cerebelo) a para su posterior procesamiento.

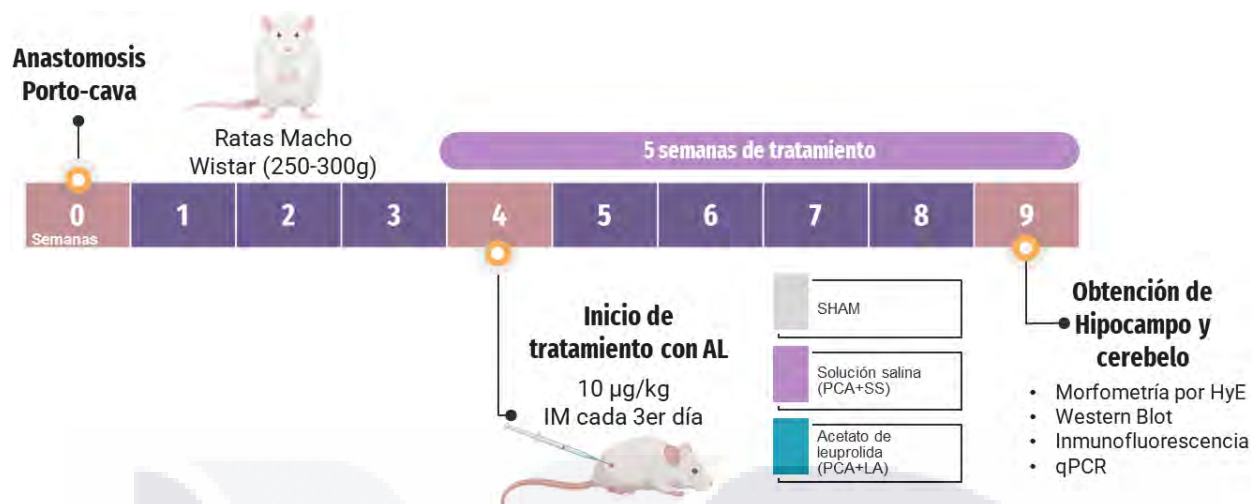


Figura 15. Diseño experimental del proyecto.

5.2 Procedimiento quirúrgico: Anastomosis porto-cava

Con la finalidad de inducir encefalopatía hepática se realizó una anastomosis porto-cava latero-terminal a ratas Wistar macho con un peso de 250 a 300g. El procedimiento se realizó de acuerdo con lo descrito por Lee y Fisher 1961, el cual consiste en desviar la circulación venosa de las vísceras abdominales (vena porta), hacia la vena cava inferior, evitando así la circulación del duodeno hacia el hígado. Para la cirugía las ratas fueron anestesiadas con isoflurano al 3.0% con un flujo de 250ml/min, posteriormente se realizó una laparotomía para acceder a los órganos abdominales, y una vez que se identificó a la vena porta se procedió a separarla suavemente de la arteria hepática y se limpió de grasa y tejido conjuntivo. Posteriormente, la vena porta y la vena cava inferior se ocluyeron simultáneamente por no más de 20 minutos. A continuación, se realizó la anastomosis de ambas venas empleando la técnica de sutura continua con 4-6 puntos a cada lado de la vena cava y la vena porta; para este paso se utilizó sutura de ácido poliglicólico 8-0 unida a una aguja espatulada (2G-EE6980-2-20 atramat). El grupo SHAM fue sometido al mismo procedimiento hasta la supresión del flujo sanguíneo y sin cortar algún vaso. Después de la cirugía a todos los animales se les inyectó 10,000 UI de DEXA-estreptovet (solución de penicilina, estreptomycin y dipirona) en dosis

única. Posteriormente se alojaron a todos los animales en jaulas de plástico de fondo sólido con aserrín y se les permitió acceso ilimitado a alimento y agua, además se les suplemento con solución de glucosa al 10% y galletas los primeros 3 días postcirugía.

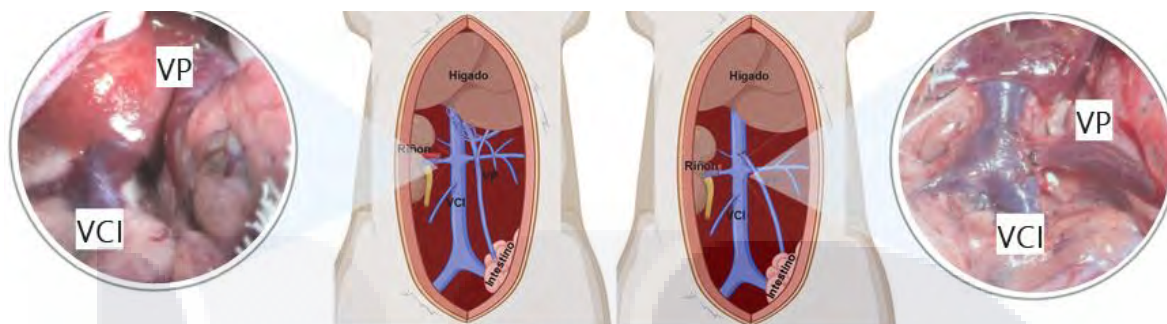


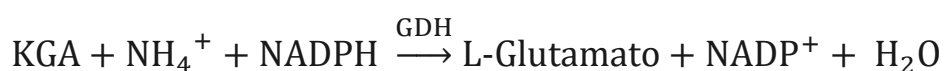
Figura 16. Anastomosis portocava

5.3 Administración de acetato de leuprolida

La administración del acetato de leuprolida se realizó vía intramuscular a una concentración de 10µg/kg por 3 días consecutivos iniciando a partir de la cuarta semana posterior a la cirugía y cada tercer día durante 5 semanas (Hernández-Jasso *et al.*, 2020).

5.4 Determinación de amonio en sangre

A fin de validar que el modelo de anastomosis porto-cava ocasione daño hepático se cuantificaron los niveles de amonio en sangre, esto debido a que una lesión en hígado está directamente asociada al incremento de amonio sistémico (García-Lezana *et al.*, 2017). Dicho procedimiento se realizó con el Ammonia Assay Kit (Sigma-Aldrich #AA0100) el cual determina la concentración de amonio con base en que el amoniaco (NH_4^+) reacciona con el ácido α -cetoglutarico (KGA) y se reduce nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) en presencia de L-glutamato deshidrogenasa (GDH) para formar L-glutamato y nicotinamida adenina fosfato de dinucleótido oxidada (NADP^+).



La disminución de la absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación de NADPH, es proporcional a la concentración de NH_4^+ . Para la cuantificación se utilizaron 100 μl de suero y 1 ml de la mezcla del reactivo A (ácido α -cetoglutarico, NADPH y amortiguadores), se dejó incubando la mezcla durante ~5 minutos a 18–35 °C y se midió la absorbancia de cada muestra a 340 nm. Luego se añadieron 10 μl de la enzima GDH y se dejó incubar la reacción durante ~5 minutos a 18–35 °C, transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 340nm. Como blanco de la reacción se sustituyó el volumen de la muestra de suero por agua. La concentración de amonio se calculó siguiendo la siguiente fórmula:

$$\Delta(\Delta A_{340}) \text{ Muestra} = \Delta(\Delta A_{340}) \text{ Muestra} - \Delta(\Delta A_{340}) \text{ Blanco}$$

5.5 Análisis de suero

Los niveles séricos de urea, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), albumina y proteínas totales se midieron utilizando SPINLAB 0615 (Spinreact, Girona, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.6 Evaluación de la función motora y coordinación

5.6.1 Campo abierto

El campo abierto permite obtener una medida cuantitativa y cualitativa para evaluar la actividad locomotora general, exploratoria y los niveles de ansiedad en roedores, así como la habituación al ambiente (Kraeuter, *et al.*, 2019). Además de lo anterior, durante la prueba se puede determinar la distancia recorrida, deambulación, elevaciones, intentos de fuga, tiempo sin movimiento, ubicaciones en las zonas del campo, movimientos corporales, olfateo, rascado, acicalamiento y exploración visual (Zurita-Jines, 2018). El propósito de esta prueba fue detectar cambios en la actividad locomotora entre roedores sanos, lesionados y con tratamiento. Para la prueba se utilizó una caja de acrílico de 45x45cm acoplada a un sistema de registro IR Actimeter System Panlab. Antes de cada sesión se llevó a cabo el proceso de habituación, en el cual se

colocó la jaula durante 30 minutos en el mismo espacio en donde se efectuó la prueba. La prueba consistió en colocar a los sujetos de estudio en el centro de la caja, en donde se le permitió explorar el espacio durante un tiempo de 300 segundos, los registros obtenidos se analizaron con el software Actitrack para analizar la actividad espontánea y distancia recorrida.

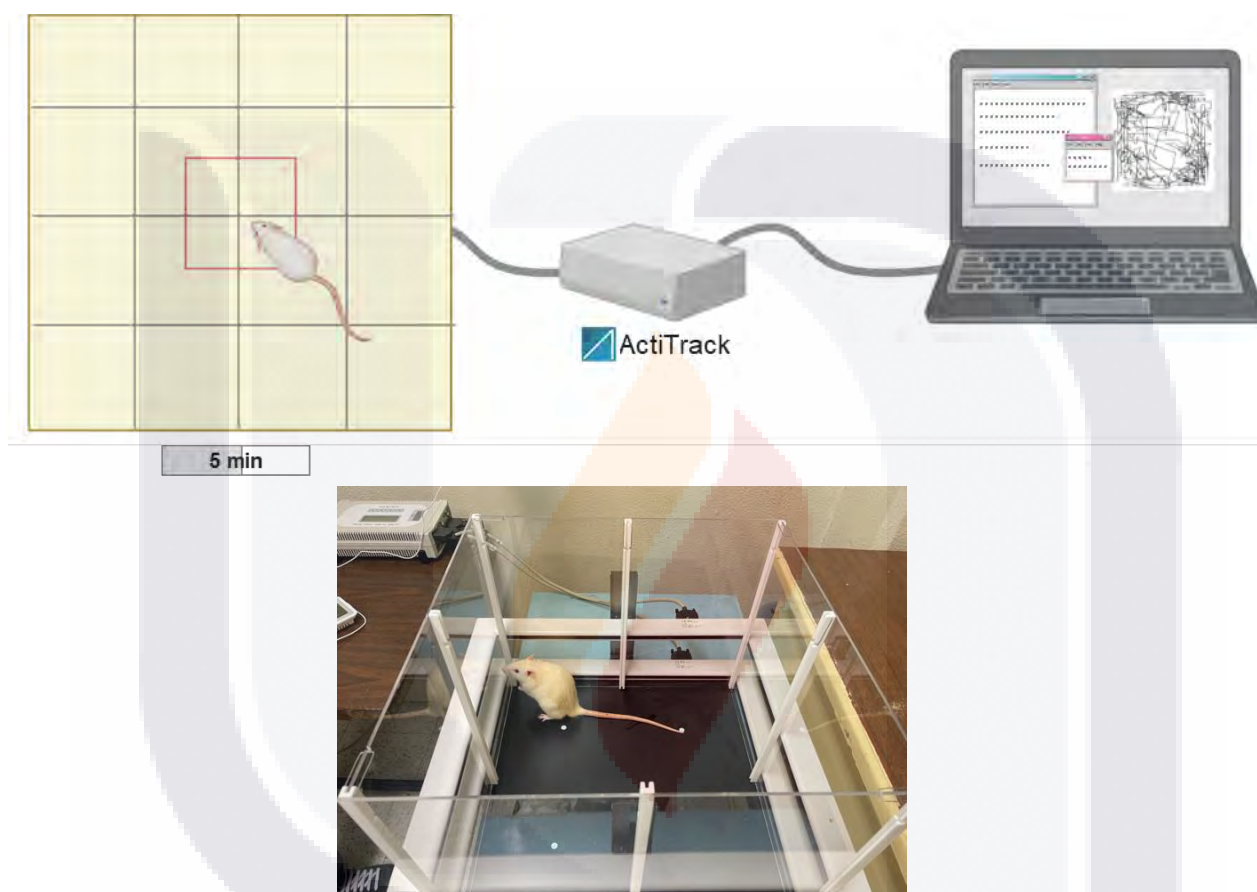


Figura 17. Campo abierto

5.6.2 RotaRod

La coordinación motora de las ratas se evaluó mediante el RotaRod. Esta es una prueba estándar para analizar el equilibrio y fatiga, y es especialmente sensible a la detección de disfunciones en cerebelo de roedores. Consiste en colocar a los sujetos en carriles que giran a diferentes velocidades o bajo aceleración continua, y se registra el tiempo

de latencia de la caída (Stokum *et al.*, 2015). Con el objeto de que los animales de estudio se familiarizaran con el espacio de trabajo se llevó a cabo un proceso de habituación, el cual consistió en colocar la jaula en la misma habitación en donde se encuentra el equipo de RotaRod (Accelerating RotaRod LE8505) antes de cada sesión por un lapso de 30 minutos. Posterior a la habituación se realizó el ensayo que consistió en dos sesiones, la sesión de entrenamiento y la de prueba. Para la primera se colocó la rata sobre el equipo apagado por 60 segundos, inmediatamente después se colocó sobre el cilindro a una velocidad constante de 10 rpm por 60s, este último paso se ejecutó hasta que el animal logró completar el minuto sin alguna caída o por un total de 4 días seguidos con hasta 5 intentos por día. La fase de prueba se realizó durante 4 días consecutivos con una rampa escalonada a una velocidad de 4 a 40 rpm durante 300 segundos en donde se registró la latencia de caída, es decir el tiempo que duro la rata sobre el rotor.



Figura 18. Rotarod

5.6.3 Barra transversal

La prueba de la barra transversal consiste en hacer pasar a los sujetos de estudio sobre una serie de vigas estrechas y elevadas para llegar a una plataforma de escape cerrada, esto con la finalidad de poder evaluar parámetros como la coordinación motora y el

equilibrio (Carter *et al.*, 2001). Para el ensayo se utilizaron dos barras de madera, una de 20mm y otra de 10mm de diámetro, de 1 m de largo ubicadas aproximadamente a 80 cm sobre el suelo, en uno de los extremos se colocó una caja con el propósito de proporcionar un ambiente agradable en donde los roedores pudieran refugiarse. Como primer paso se realizó el entrenamiento que constó de 2 días en donde se acostumbró a los animales a atravesar la barra (un máximo de 5 intentos por día). Cada prueba tuvo una duración de 1 min y durante esta se evaluaron el tiempo que demoró la rata en alcanzar la caja (latencia de escape) y el número de tropiezos.

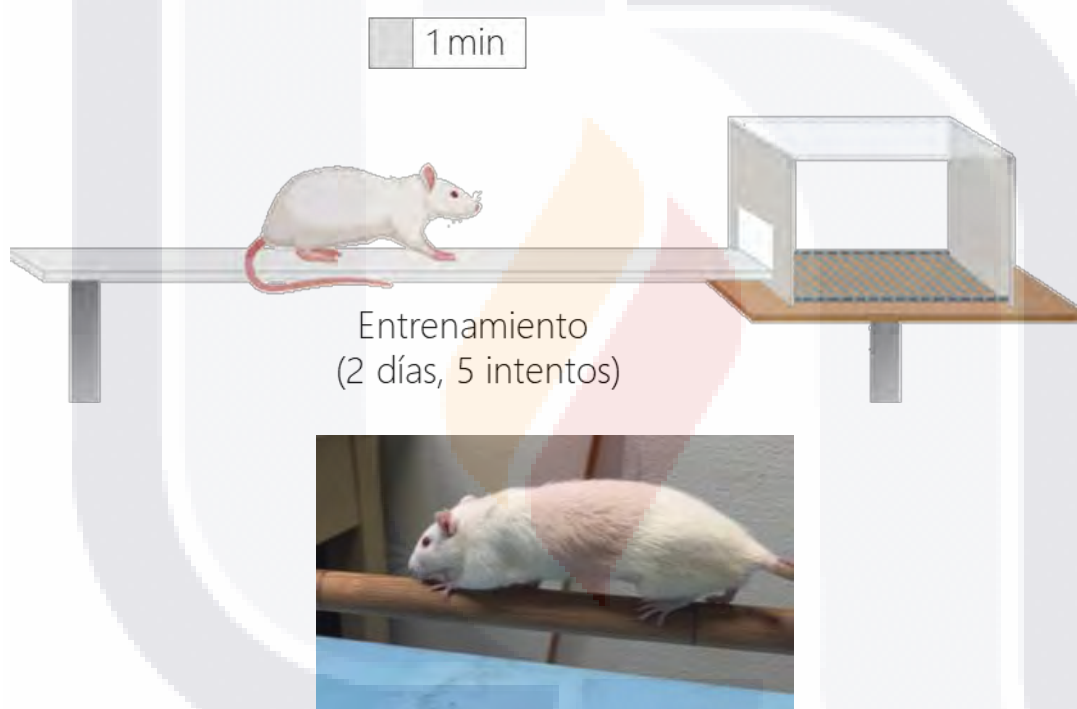


Figura 19. Barra transversal

5.7 Evaluación cognitiva

5.7.1 Prueba de laberinto en Y

El laberinto en Y se puede utilizar para evaluar la memoria de referencia espacial a corto plazo en roedores. Como primer paso se llevó a cabo un proceso de habituación al área de trabajo por un lapso de 30 min, seguido de esto se realizó la sesión de entrenamiento

en donde se colocó cada sujeto en el laberinto con un brazo cerrado (este brazo se designó como brazo nuevo) y se permitió explorar los dos brazos restantes por 10 min, inmediatamente después se regresó al roedor a su jaula durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se continuó con la sesión de prueba, la cual consistió en colocar de nuevo a cada rata en el laberinto ahora con el brazo nuevo abierto. El número de entradas en el nuevo brazo se comparó con las entradas en los otros brazos para evaluar el grado de memoria espacial, una rata que no mostró preferencia por ninguno de los brazos durante la sesión de prueba es una indicación de memoria espacial deteriorada, lo que puede indicar alteración del funcionamiento del hipocampo (Kraeuter *et al.*, 2019).

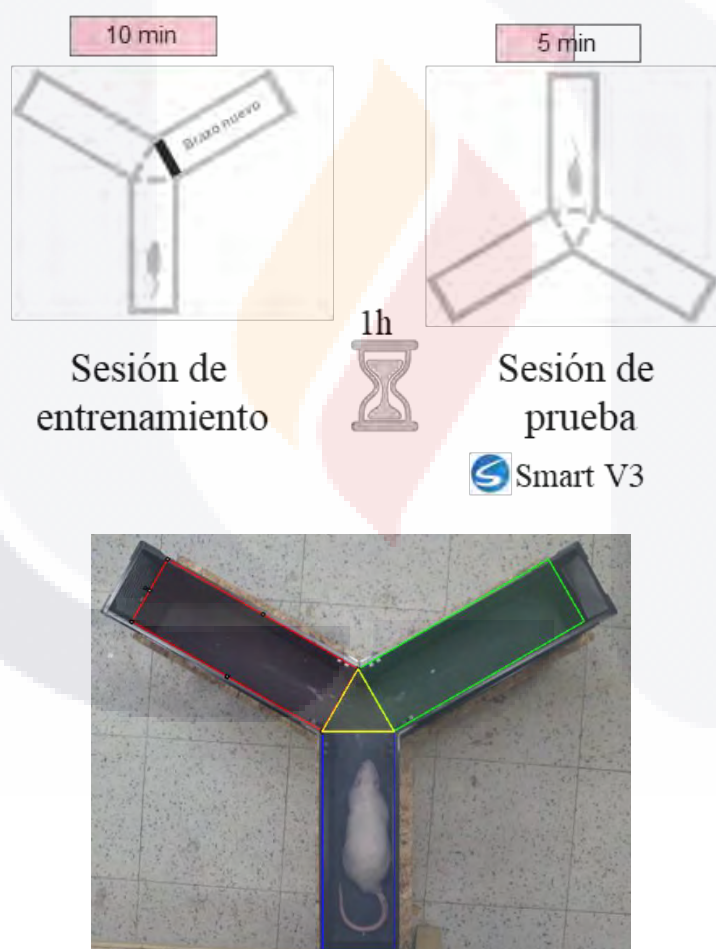


Figura 20. Prueba de laberinto en T elevado

El laberinto en T elevado es un aparato que se usa ampliamente para evaluar los niveles de ansiedad, memoria y aprendizaje en roedores (Asth *et al.*, 2012). El aparato utilizado consistió en un laberinto en forma de T elevado sobre el piso, con dos brazos opuestos abiertos y un brazo cerrado con un techo abierto. El procedimiento consistió en dos sesiones, una de entrenamiento y otra prueba. Antes de la prueba se llevó a cabo la habituación al espacio de trabajo como se mencionó anteriormente. En la sesión de entrenamiento, cada sujeto fue colocado al final del brazo cerrado del laberinto y se le permitió explorar durante un máximo de 300 s. La prueba se dio por terminada cada vez que la rata colocaba las cuatro patas en uno de los brazos abiertos del laberinto, después de salir del brazo cerrado la rata se colocó en aislamiento en una caja por 30 s. Este último paso se repitió hasta que cada rata logró permanecer en el brazo cerrado durante 300s o en un máximo de 10 ensayos. En la sesión de prueba, las ratas se colocaron en el brazo cerrado y se registró el tiempo que les tomó para entrar en uno de los brazos abiertos (González-Torres *et al.*, 2019).



Figura 21. Laberinto en T elevado

5.8 Sacrificio y obtención de muestras

Al término de la 9ª semana postcirugía, los animales fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital y perfundidos con solución salina al 0.9% vía intracardiaca. Se tomó muestra sanguínea de la aorta y se extrajeron el hígado, el cerebelo e hipocampo para su posterior análisis.

5.9 Histología

Esta técnica nos permite comparar tejidos alterados experimentalmente con muestras sanas o controles para realizar una evaluación histopatológica (Slaoui y Fiette, 2011). Para dicho análisis se colectaron los tejidos, hígado y encéfalo, y se sumergieron inmediatamente en formalina neutra 10% para su fijación, posteriormente con ayuda de un equipo de Histoquinet se deshidrataron con soluciones crecientes de etanol, a

continuación, se aclararon con xilol y se infiltraron en parafina. Luego se incluyeron en parafina y se realizaron cortes con un espesor de 5 μm , se montaron en portaobjetos y se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina (cerebelo e hipocampo) y con tricrómico de Masson (hígado).

5.10 Evaluación de fibrosis mediante la tinción tricrómica de Masson

Para el análisis morfométrico se utilizaron cortes de hígado procesados con la tinción tricrómica de Masson, la cual tiene como fundamento la utilización de 3 colorantes para resaltar distintas estructuras celulares; el citoplasma de color rojizo, los núcleos de color morado y las fibras de colágeno tipo I de color azul (Stevens y Lowe., 2006). Se realizó un análisis de los cortes del tejido por medio del programa Image J con la herramienta de deconvolutado de colores para separar el azul correspondiente a la colágena tipo I, se analizaron 10 fotos de triada porta y 10 fotos de vena centrolobulillar de al menos 10 cortes de hígado por 3 ratas de 3 grupos que fueron SHAM, SS y AL, tomando el objetivo de 40x. Para un análisis de los resultados obtenidos se empleó el programa GraphPad Prism versión 8.0.1.

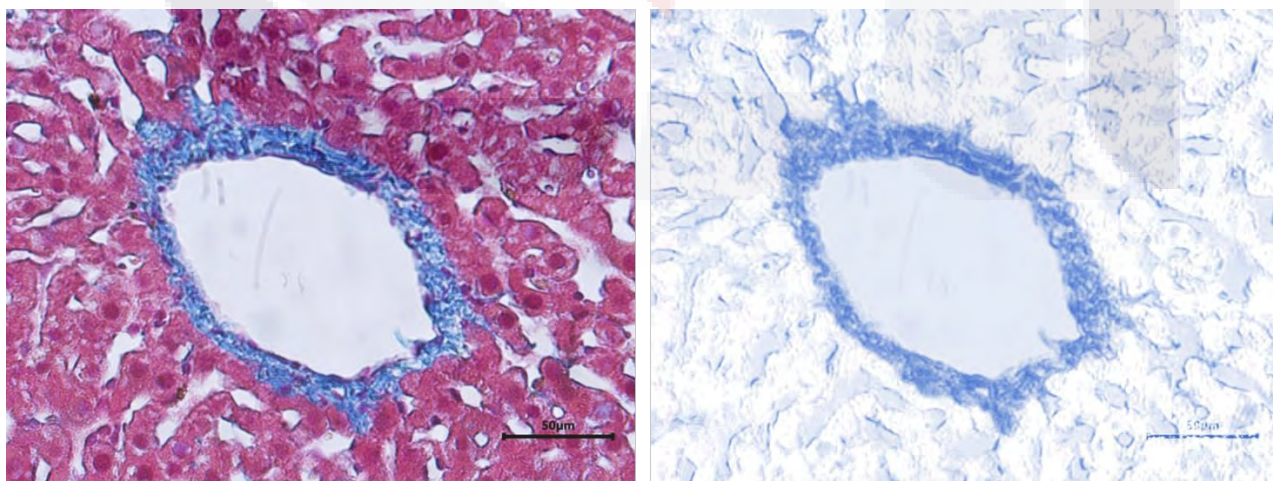


Figura 22. Cuantificación de área fibrótica mediante la herramienta de deconvolutado de colores en el programa Image J.

5.11 Evaluación de grosor de capas de cerebelo y densidad lineal de células de Purkinje

Cortes histológicos de cerebelo fueron teñidos con hematoxilina y eosina y analizados mediante fotomicrografías capturadas con un microscopio Zeiss Axiostar Plus, utilizando un objetivo de 10X y una cámara AmScope MU1803. Para ello se evaluaron 10 fotos de 3 secciones de tres ratas diferentes por grupo. Posteriormente por medio de morfometría, es decir un análisis cuantitativo, se evaluó, el grosor de la capa granular y molecular, la densidad y área de las células de Purkinje (Louis *et al.*, 2013).

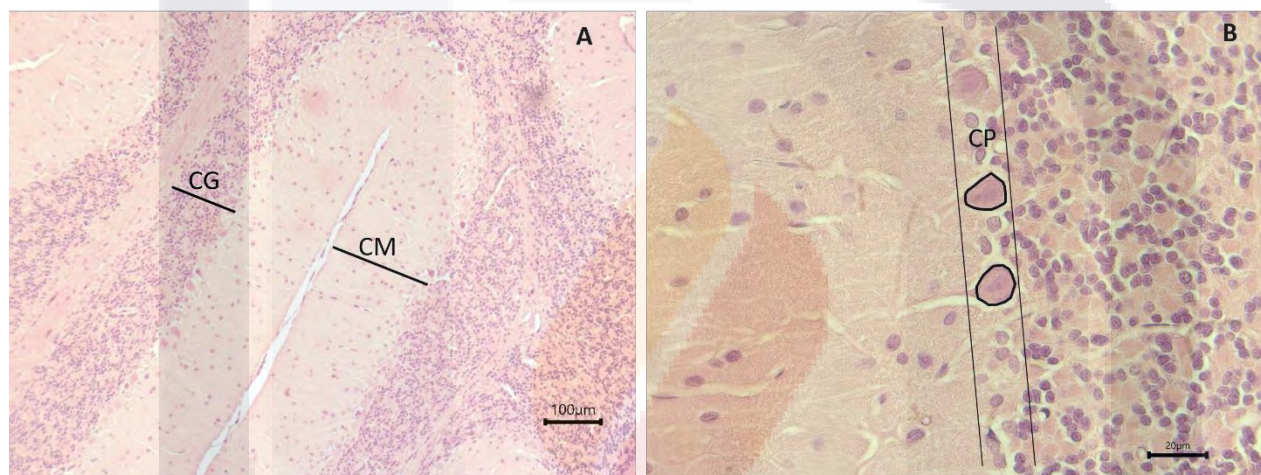


Figura 23. A) Medición del grosor de la capa granular (CG), capa molecular (CM). B) Medición del área y densidad de las células de Purkinje (CP) Objetivo 10x.

5.12 Evaluación de grosor, área nuclear y densidad neuronal en hipocampo

Se obtuvieron cortes del hipocampo dorsal en la región del bregma (-3.36 mm), de acuerdo con las coordenadas establecidas en el atlas de Paxinos y Watson (2006). Las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina y analizadas mediante fotomicrografías capturadas con un microscopio Zeiss Axiostar Plus, utilizando un objetivo de 40X y una cámara AmScope MU1803. El análisis fue realizado por dos observadores independientes y cegados, quienes evaluaron nueve campos aleatorios en tres secciones por grupo y área. Se analizaron la densidad neuronal,

el grosor y el área nuclear en las regiones CA1, CA3 y el giro dentado (DG). Los resultados se presentan en función del campo visual examinado.

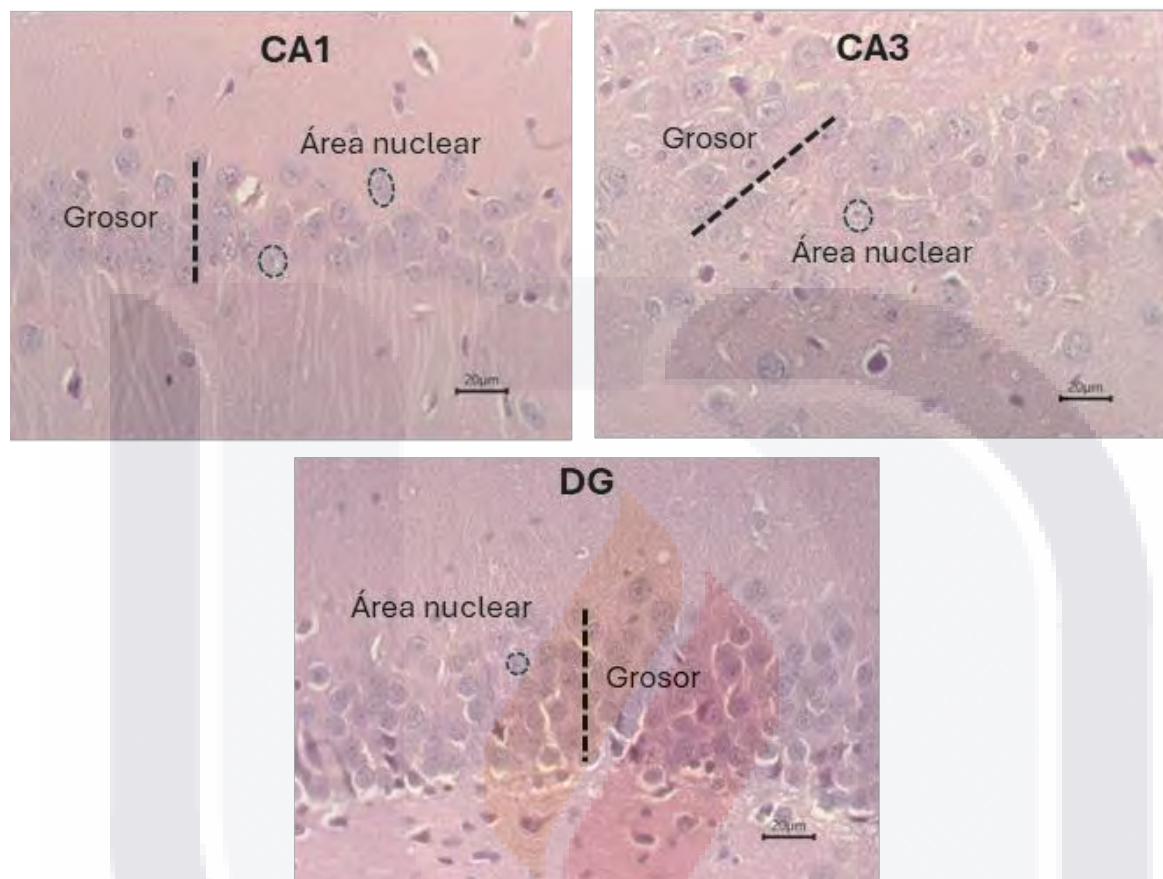


Figura 24. Medición de grosor y área nuclear en las tres zonas del hipocampo (CA1, CA3 y DG)

5.13 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (qPCR) es una técnica de biología molecular que permite la detección y cuantificación de un fragmento de ARN determinado en una muestra (Kukielka *et al.*, 2008). La metodología de qPCR inició con la extracción de ARN total utilizando el reactivo Trizol. Para ello, se añadió 1 mL del reactivo a la muestra y se homogeneizó completamente, seguido por la adición de 200 µL de cloroformo por cada mL de trizol, agitación vigorosa y una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 12,000g

durante 15 minutos a 4°C para separar las fases, recuperando la fase acuosa donde se encontraba el ARN. La precipitación se realizó con 500 µL de isopropanol, seguido de una incubación a -20°C durante 10 minutos y una centrifugación a 12,000g por 10 minutos a 4°C. El pellet obtenido se lavó con etanol al 75% y se centrifugó nuevamente a 7,500g por 5 minutos a 4°C. Finalmente, el ARN se resuspendió en 20-50 µL de agua libre de nucleasas y su calidad y concentración fueron evaluadas mediante espectrofotometría (Nanodrop) y electroforesis en gel de agarosa. La síntesis de ADNc, se llevó a cabo en un termociclador con las siguientes condiciones: 25°C por 10 minutos para la hibridación de primers, 42°C por 60 minutos para la síntesis de ADNc y una inactivación enzimática a 85°C por 5 minutos. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso en la qPCR.

La cuantificación relativa de los genes de interés se realizó mediante qPCR. El protocolo de amplificación consistió en una activación inicial de la polimerasa a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos, alineamiento a 60°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos. Finalmente, se realizó una curva de disociación de 60 a 95°C para verificar la especificidad del amplicón. Los datos de qPCR se analizaron mediante el método $\Delta\Delta C_t$, utilizando como gen de referencia β -actina para la normalización.

Tabla 3. Oligonucleotidos utilizados para el análisis de qPCR

Constitutivo		
β -Actina	r β Actina_F	GTCGTACCACTGGCATTGTG
	r β Actina_R	GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA
Citocinas proinflamatorias		
TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa)	rTNF- α _F	AACACACGAGACGCTGAAGT
	rTNF- α _R	TCCAGTGAGTTCCGAAAGCC
IL1 β (Interleucina 1 beta)	rIL1 β _F	ATGGCAACTGTCCCTGAACT
	rIL1 β _R	CGAGATGCTGCTGTGAGATT
Gliosis reactiva		

Iba1 (Molécula adaptadora de unión de calcio ionizado 1)	rIba1_F	GCCTCATCGTCATCTCCCCA
	rIba1_R	AGGAAGTGCTTGTGATCCCA
Receptores a glutamato		
NR1 (Subunidad NR1 del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA))	rNR1f_1	GTCCACCAGACTGAAGATTGTGAC
	rNR1r_1	CTCCTCCTTGCATGTCCCA
NR2α (Subunidad NR2 alfa del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA))	rNR2Af_1	GAGATGACACGGACCAGGAG
	rNR2Ar_1	GGAAGAACGTGGATGTCGGA
Factores neurotróficos		
BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro)	rBDNff_1	TCCACCAGGTGAGAAGAGTGATG
	rBDNFr_1	TCACGCTCTCCAGAGTCCCATG
NGF (factor de crecimiento nervioso)	rNGFf_1	CCCCGAATCCTGTAGAGA
	rNGFr_1	CACGCAGGCTGTATCTAT

5.14 Análisis de proteína mediante la técnica de Western Blot

Western Blot es una técnica semicuantitativa de biología celular y molecular para la identificación de proteínas. El método implica el uso de electroforesis en gel para separar las proteínas de la muestra, las cuales serán transferidas del gel a la superficie de una membrana para posteriormente identificarlas mediante la adición de anticuerpos específicos capaces de reconocerla e interactuar con ella (Barboza, 2021). El hipocampo y cerebelo de cinco animales por grupo fue disecado rápidamente y homogeneizado en un cóctel de extracción que contenía inhibidores de proteasas (20 mM Tris/HCl, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 mM Cl₂Mg, 0.6 mM aprotinina y 2 μM leupeptina). La concentración de proteínas se determinó mediante el método del ácido bicinónico (BCA) (23227 Thermo Scientific Pierce). Se separaron 25 μg de proteína en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) mediante electroforesis y posteriormente se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno.

Las membranas fueron incubadas durante la noche con los anticuerpos primarios anti-NF200, anti-GFAP, anti-espinofilina y anti-GAPDH (Tabla 4). Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo secundario IgG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante dos horas a temperatura ambiente. La detección se realizó mediante

quimioluminiscencia, y las señales fueron visualizadas con el software Image Lab™ (Bio-Rad). La densidad relativa de las bandas se analizó utilizando FIJI (ImageJ2) y se normalizó con la intensidad de la señal de GAPDH.

Tabla 4. Tabla de anticuerpos utilizados para la técnica de Western Blot

Proteína	Anticuerpo primario (dilución)	Anticuerpo secundario (dilución)	Peso molecular
Neurofilamentos 200 kDa	Monoclonal Sigma N0142 (1:1000)	Anti-Rabbit(1:10,000)	200 kDa
Espinofilina	Policlonal Sta. Cruz A20 (1:500)	Anti- Goat (1:2000)	140 kDa
GFAP Proteína acida glial fibrilar	Monoclonal ABCAM AB7260 (1:1000)	Anti-Mouse (1:10,000)	53 kDa
GAPDH	Policlonal Sigma G9545 (1:5000)	Anti-Rabbit (1:10,000)	36 kDa

5.15 Inmunofluorescencia

La técnica de inmunofluorescencia se llevó a cabo para la detección y localización de proteínas de interés en tejido cerebral. Las secciones fueron fijadas en formalina neutra al 10% y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.3%. Posteriormente, se bloquearon con leche al 5% para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos. Las muestras fueron incubadas con anticuerpos primarios específicos dirigidos contra la proteína de interés, seguidos de anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos. Tras lavados con PBS, las secciones fueron montadas en portaobjetos utilizando DAPI para el contraste nuclear. Las imágenes fueron adquiridas mediante un microscopio de epifluorescencia y un microscopio confocal, las cuales se analizaron por medio del software FIJI.

Finalmente se realizó el análisis estadístico por medio del programa Graph Prism versión 9.0.

Tabla 5. Tabla de anticuerpos utilizados para la técnica de inmunofluorescencia

Proteína	Anticuerpo primario (dilución)	Anticuerpo secundario (dilución)
GFAP	Monoclonal	Anti-Mouse (1:1000)
Proteína acida glial fibrilar	ABCAM MAB300 (1:500)	
III β -Tubulina	Policlonal ABCAM AB78087 (1:500)	Anti-Mouse (1:2000)
Sinaptofisina	Policlonal ABCAM AB9272 (1:1000)	Anti-Rabbit (1:1000)
BDNF	Policlonal Termo Fisher PA585730 (1:1000)	Anti-Rabbit (1:1000)

6 Resultados y discusiones

6.1 Validación de daño hepático en ratas con anastomosis portocava

6.1.1 Evaluación de peso corporal y tejido hepático

Con la finalidad de validar si el procedimiento de anastomosis portocava logró ocasionar daño hepático, se monitoreo tanto el peso de los animales experimentales, como el peso fresco del hígado. Lo que se observó al final del esquema de tratamiento fue una disminución del peso corporal de las ratas con APC. Siendo del 15% para el grupo de solución salina (APC+SS o SS) y del 8% en el grupo de acetato de leuprolida (APC+AL o AL). En cuanto al porcentaje de peso hepático, se apreció la disminución de este, presentando valores de $1.94 \pm 0.08\%$ p.c en APC+SS y $1.88 \pm 0.08\%$ p.c en APC+AL (Tabla 6). Por lo anterior, y apoyados de reportes previos (Vázquez-Martínez *et al.*, 2019; Navarro-González *et al.*, 2023; Cauli *et al.*, 2007), se logró corroborar que la APC favoreció el daño hepático. Sin embargo, algo importante a resaltar fue el aumento de peso corporal en ratas tratadas con AL en comparación con las no tratadas; existe evidencia de este mismo efecto en un modelo de esclerosis múltiple, y aunque si bien no se conoce el papel de dicho fármaco sobre las funciones metabólicas, este podría ejercer un efecto positivo al regular el apetito a nivel hipotalámico (Guzmán-Soto *et al.*, 2012).

Tabla 6. Peso corporal y peso de hígado en los grupos experimentales.

	SHAM	APC+SS	APC+AL
Peso inicial (g)	293.4 ± 12.4	320.6 ± 10	324.4 ± 5.9
Peso final (g)	362.4 ± 17.4	260.4 ± 19.9^{ac}	297.7 ± 9.9^{ab}

Peso hígado (% p.c) 3.34 ± 0.17 1.94 ± 0.08^a 1.88 ± 0.08^a

a: Diferencia significativa con SHAM, b: diferencia significativa con SS y c: diferencia significativa con AL. * $p < 0.05$, SHAM $n=5$, SS $n=10$, AL $n=11$.

6.1.2 Análisis de marcadores de daño hepático

Una vez corroborado que la APC logró causar la disminución de peso corporal y la atrofia anatómica del hígado, se prosiguió a evaluar de manera cuantitativa el daño hepático en ambos grupos lesionados. Para ello fueron analizados diversos marcadores en suero como amonio, urea, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), albumina y proteínas totales. En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos para cada marcador. En cuanto a los niveles de amonio se observó un aumento significativo en ambos grupos lesionados (APC+SS: $4.65 \pm 0.99 \mu\text{g/ml}$ y APC+AL: $4.04 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$), indicando un estado de hiperamonemia (Cauli *et al.*, 2007).

Tabla 7. Marcadores de daño hepático

	SHAM	APC+SS	APC+AL
NH₄ ($\mu\text{g/ml}$)	1.97 ± 0.03	$4.65 \pm 0.99^*$	$4.04 \pm 0.36^*$
Urea (mg/dL)	53.77 ± 0.18	$46.73 \pm 1.17^+$	57.47 ± 1.0
AST (U/L)	149.7 ± 49.46	142.7 ± 22.39	176.6 ± 33.84
ALT (U/L)	50 ± 6.0	$69.33 \pm 0.33^{*+}$	57 ± 2
Albumina (g/dL)	3.4 ± 0.05	$2.9 \pm 0.05^*$	3.7 ± 0.14
Proteína total (g/dL)	7.4 ± 0.25	6.9 ± 0.26	7.3 ± 0.06

* $p < 0.05$ (ANOVA estadístico de Tukey), $n=3$. * Diferente a SHAM, + Diferente a APC+AL.

En cuanto a la concentración de urea en suero se apreció su disminución en el grupo APC+SS al compararlo con los grupos SHAM y APC+AL, lo que sugirió una posible alteración en la capacidad del hígado para convertir el amonio en urea. Por otro lado, a pesar de que no se encontraron diferencias significativas en cuanto a los marcadores de

AST y proteínas totales, la disminución de los niveles de albumina así como el incremento de ALT en el grupo SS en comparación con los grupos AL y SHAM, podría ser indicativo de la presencia de fallo hepático, este efecto ha sido previamente reportado en ratas con APC en donde el procedimiento induce la disminución de albúmina en suero, así como el aumento de ácidos biliares, fosfatasa alcalina, AST, ALT, lactato deshidrogenasa, creatinina, urea y amonio. Además de dichos marcadores, la APC se ha relacionado con la aparición de claros signos de daño histopatológico, como necrosis y apoptosis hepática, inflamación portal, proliferación biliar, esteatosis y fibrosis (Vázquez-Martínez *et al.*, 2019). Para determinar si efectivamente la APC permitió el establecimiento de alteraciones estructurales, se realizó un análisis histopatológico de hígado de los animales experimentales.

6.1.3 Histología del hígado

Además de lo previamente mencionado, las alteraciones histopatológicas relacionadas a la anastomosis portocava incluyen engrosamiento de paredes arteriales, cambios en fibras colágenas estromales, infiltración de células inflamatorias, pleomorfismo, células binucleadas, y vacuolización (Muñoz-Ortega *et al.*, 2021). En las figuras 25D y 25G se logra apreciar que en los grupos de SS y AL hay presencia de vacuolización en los hepatocitos cercanos a la vena central, mientras que en la triada portal se observó engrosamiento de las paredes de la arteria hepática, así como la presencia de más de un conducto biliar (figura 25E y 25H), sin embargo, en la triada portal del grupo AL se observa la disminución de los vasos sanguíneos en comparación con los de SS, además de presentar una mejoría en la distribución de los cordones de hepatocitos (figura 9H).

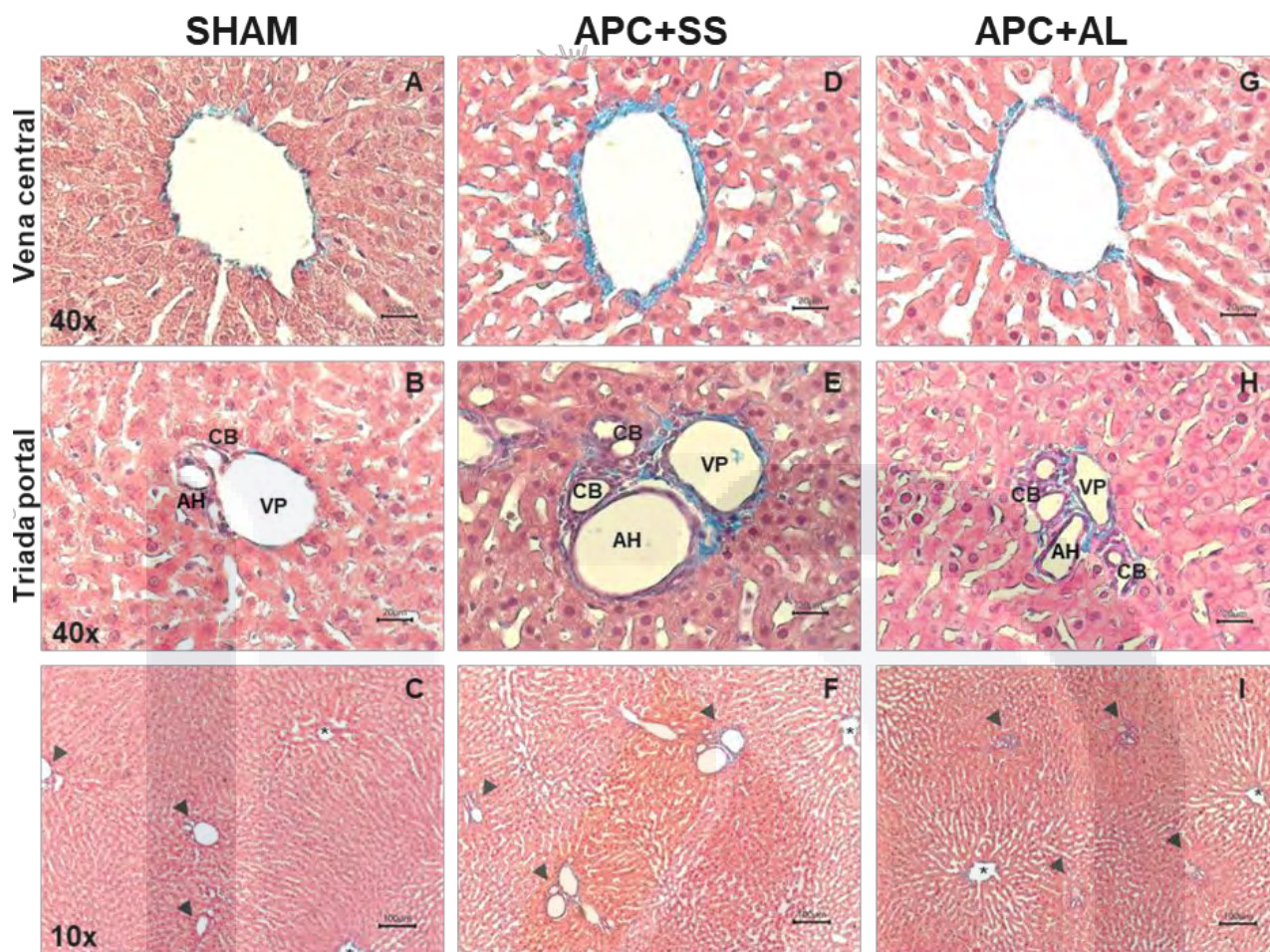


Figura 25. Hígados teñidos con tricrómico de Masson. A) Vena central de grupo SHAM 40x. B) Triada portal de grupo SHAM 40x. C) Triada portal SHAM 10x. D) Vena central de grupo SS 40x. E) Triada portal de grupo SS 40x. F) Triada portal SS 10x. G) Vena central de grupo AL 40x. H) Triada portal de grupo AL 40x. I) Triada portal AL 10x. Punta de flecha: triada portal. Asterisco: vena central. n=3.

Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio morfométrico para evaluar la fibrosis mediante la tinción tricrómica de Masson, la cual permite visualizar las fibras de colágeno tipo I en color azul. La intensidad de esta coloración es proporcional al grado de fibrosis, de modo que, a mayor área de azul, mayor es la cantidad de tejido fibroso en la muestra analizada. En la gráfica 26C se puede apreciar el aumento significativo en el área fibrótica de la zona periportal en los grupos APC+SS ($2.70 \pm 0.25\mu\text{m}^2$) y APC+AL ($1.91 \pm 0.25\mu\text{m}^2$) en comparación con el SHAM ($1.04 \pm 0.02\mu\text{m}^2$). Este mismo efecto se observó en la zona pericentrolobulillar en donde se obtuvieron valores

de $4.26 \pm 0.23 \mu\text{m}^2$ para el grupo SS y de $3.53 \pm 0.21 \mu\text{m}^2$ para el grupo de AL (Figura 26D).

La fibrosis inducida por la APC está bien documentada, ya que la redistribución del flujo sanguíneo provoca una circulación hiperdinámica, con un aumento del gasto cardíaco y el flujo sanguíneo, lo que genera estrés mecánico en las paredes vasculares. Esto desencadena un proceso inflamatorio en la vena porta y la arteria hepática, acompañado de hipoxia tisular y estrés oxidativo en la mucosa intestinal. El estrés oxidativo afecta la función epitelial y libera ROS, que activan factores de transcripción como NF- κ B aumentando la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL- 1β , lo que activa las células estrelladas hepáticas. Estas células, al ser activadas, producen colágeno tipo I, lo que contribuye a la fibrosis hepática, efecto que se corroboró en ambos grupos lesionados (Muñoz-Ortega *et al.*, 2021).

Un hallazgo interesante fue la disminución de la fibrosis hepática y la mejora en marcadores de daño hepático como urea, AST, ALT y albúmina en ratas lesionadas tratadas con AL. Aunque Kyritsi y colaboradores (2017) demostraron la expresión y secreción de GnRH en los colangiocitos, sugiriendo su papel en la proliferación biliar y la fibrosis hepática, nuestros resultados contrastan con estos informes. Esto podría explicarse por el uso de dosis mayores a las reportadas por Kyritsi *et al.*, lo que podría haber provocado un efecto contrario, relacionado con una retroalimentación negativa. Es importante destacar que existen pocos estudios que vinculen a la GnRH o sus análogos con el funcionamiento hepático, lo que hace que nuestros hallazgos abran nuevas líneas de investigación en este campo.

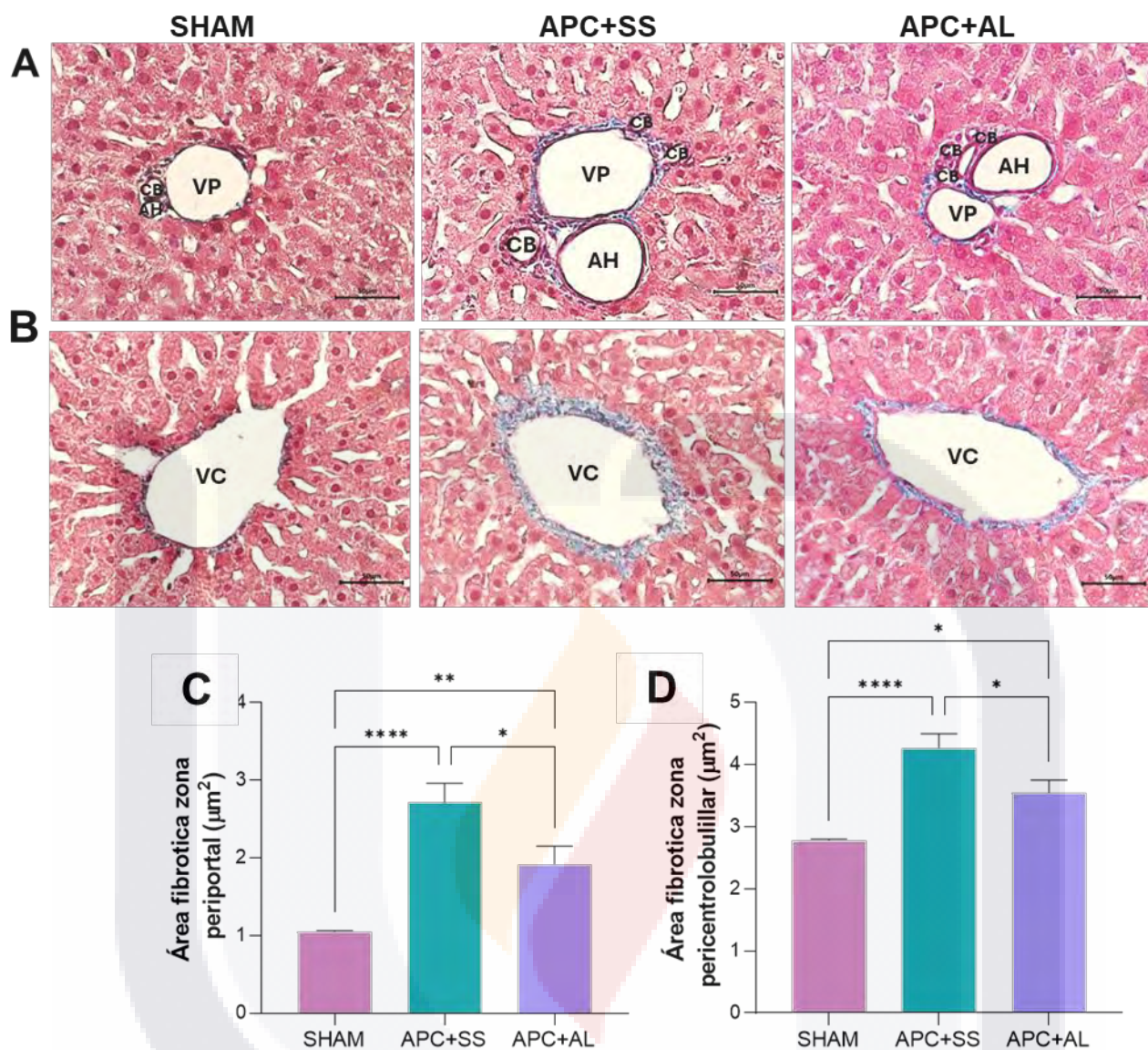


Figura 26. Análisis de fibrosis por medio de la tinción tricrómica de Masson en los grupos SHAM, SS y AL. A) zona periportal, B) zona pericentrolobulillar, C) área de fibrosis periportal, D) área de fibrosis pericentrolobulillar. **** $p < 0.00001$ (ANOVA estadístico Tukey), $n=3$.

6.2 Efecto del acetato de leuprolida sobre cerebelo de ratas con anastomosis portocava

Las funciones del cerebelo son fundamentales para mantener el equilibrio, la precisión y el ritmo de los movimientos. Sin embargo, durante la encefalopatía hepática, esta estructura se ve afectada, lo que provoca ataxia, temblores y alteraciones en los movimientos lentos (Butz *et al.*, 2010). Debido a que los grupos con APC presentaron hiperamonemia, se evaluó el desarrollo de la encefalopatía hepática y el efecto del acetato de leuprolida en su progresión, utilizando pruebas de función motora como campo abierto, RotaRod y barra transversal.

6.2.1 Evaluación de funciones motoras

6.2.1.1 Campo abierto

Durante esta prueba se observó una disminución significativa en la actividad espontánea entre los grupos APC+SS (1032 ± 53.46) y APC+AL (1067 ± 75.82) con respecto al grupo SHAM (1359 ± 109.4), lo que sugiere una posible alteración de las funciones motoras debido a la hiperamonemia. Sin embargo, al evaluar la distancia recorrida, no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos.

En modelos de APC se ha reportado que la función motora se ve afectada en la prueba de campo abierto, con una reducción tanto en la actividad como en la distancia recorrida a las semanas 6 y 13 postcirugía (López-Cervantes *et al.*, 2021). En este estudio, aunque la actividad espontánea disminuyó en ambos grupos APC, las ratas lograron explorar todo el campo, lo que sugiere que la locomoción no se vio completamente comprometida. Por ello, fue necesario evaluar pruebas más específicas para determinar si la coordinación motora se vio afectada por el procedimiento.

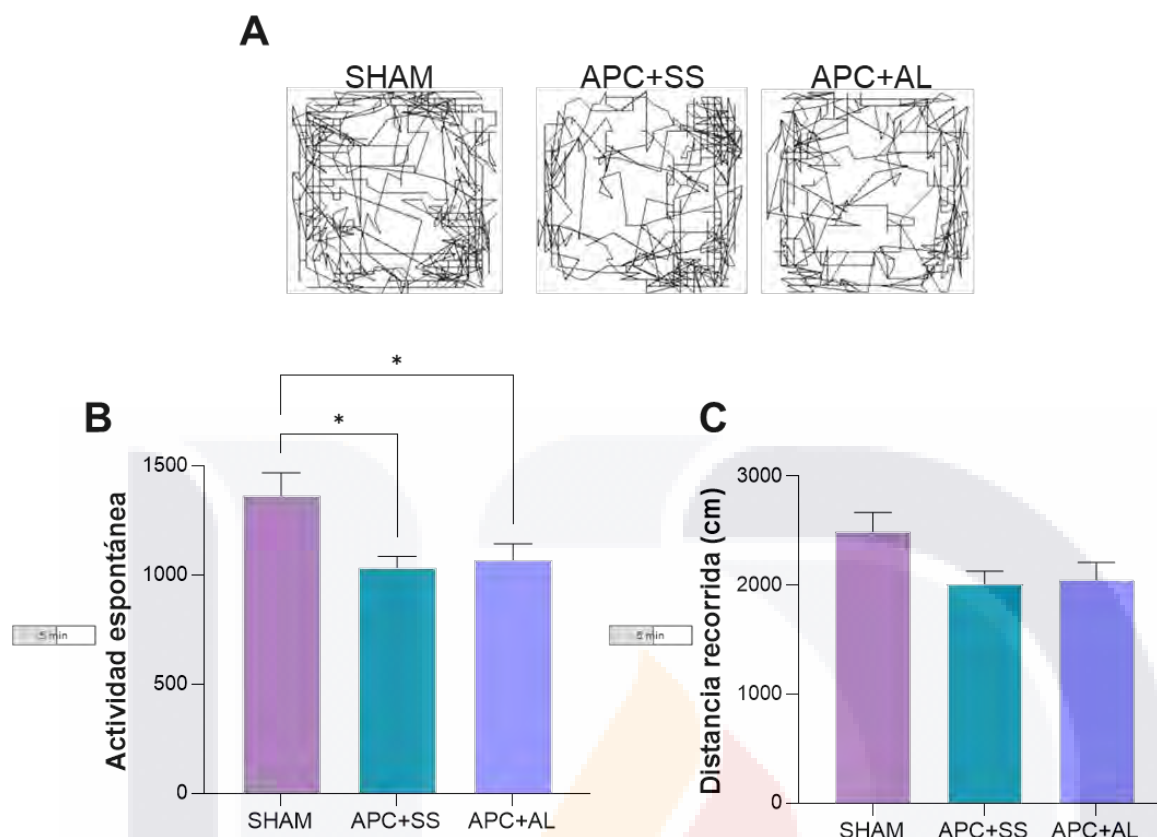


Figura 27. Prueba de campo abierto de los grupos SHAM, SS y AL. A) Patrón de actividad durante la prueba de campo abierto. B) Actividad espontánea, C) Distancia recorrida. * $p < 0.05$ (ANOVA estadístico de Tukey), $n=5-11$.

6.2.1.2 RotaRod

En la prueba de RotaRod, se observó una reducción en el tiempo de caída en los grupos APC+SS ($89.88 \pm 10.67s$) y APC+AL ($149.1 \pm 9.38s$) en comparación con el grupo SHAM ($188.9 \pm 14.49s$) (Figura 28). López-Cervantes y colaboradores (2021) reportaron que la APC reduce la coordinación motora desde la semana 3, y hasta las 13 semanas postcirugía, relacionando la severidad del déficit en equilibrio con la pérdida de células de Purkinje, lo que podría también afectar el aprendizaje, especialmente a las 13 semanas. Sin embargo, el grupo APC+AL mostró una mejora significativa en comparación con el grupo APC+SS. Estos hallazgos sugieren que el aumento en la latencia de caída en el grupo tratado podría estar vinculado al mantenimiento y

protección de las células de Purkinje, lo que, a su vez, podría reflejarse en una mejora de la coordinación motora en comparación con el grupo sin tratamiento.

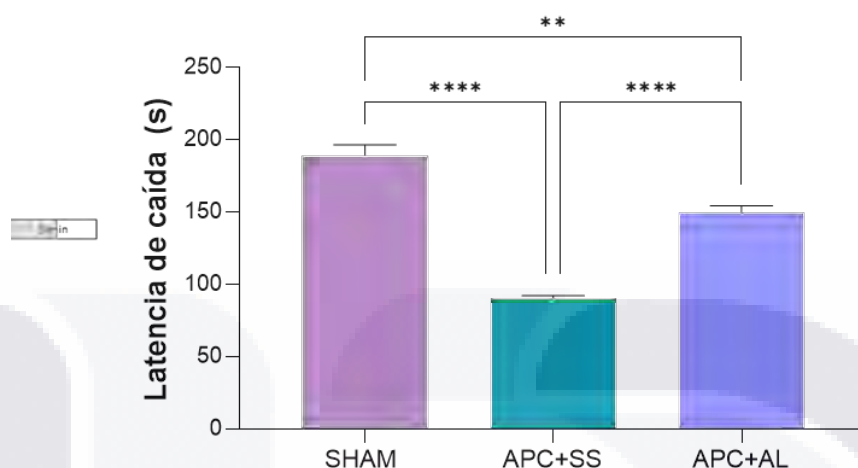


Figura 28. Prueba de RotaRod de los grupos SHAM, SS y AL. **** $p < 0.00001$ (ANOVA estadístico Tukey), $n = 5-11$.

6.2.1.3 Barra transversal

En esta prueba se apreció un mayor número de tropiezos en las ratas del grupo APC+SS en las barras de 1 y 2 cm (4.5 ± 1.3 y 3.8 ± 0.73 respectivamente) en comparación con el grupo SHAM (0.8 ± 0.4 y 0.4 ± 0.25) y APC+AL (1.0 ± 0.31 y 1.0 ± 0.41), (Fig. 29). Los déficits motores observados en las ratas APC+SS respaldan el mecanismo propuesto por Cabrera-Pastor (2019), según el cual el deterioro motor en la encefalopatía hepática ocurre de la siguiente manera: la insuficiencia hepática induce hiperamonemia e inflamación periférica, lo que desencadena en neuroinflamación. Esta, a su vez, altera la neurotransmisión y la conectividad neuronal, afectando tanto las funciones motoras como cognitivas.

Por otro lado, al igual que en la prueba de RotaRod, el grupo APC+AL mostró una mejora significativa en comparación con el grupo sin tratamiento. Estudios previos han atribuido el deterioro motor en ratas con APC a la pérdida neuronal y la atrofia estructural del cerebelo, lo que sugiere que el tratamiento podría estar ejerciendo un

efecto positivo en esta área, promoviendo el restablecimiento de las funciones motoras (Cauli *et al.*, 2006–2014; Dadsetan *et al.*, 2016; Agustí *et al.*, 2017). Para confirmar si el tratamiento con el agonista de la GnRH favorece la integridad neuronal y estructural del cerebelo, se realizó un análisis histológico en todos los grupos experimentales.

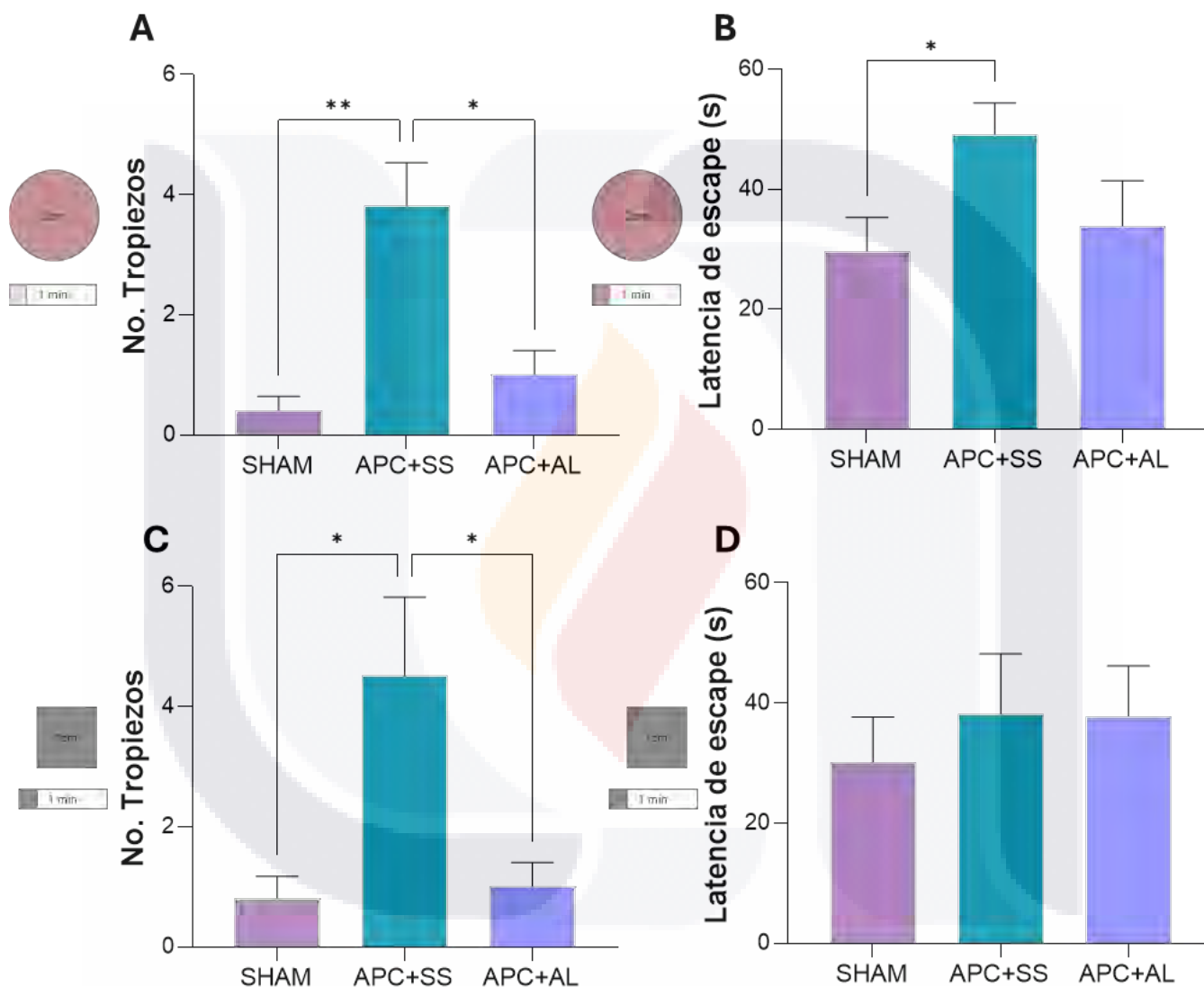


Figura 29. Prueba de barra transversal de los grupos SHAM, SS y AL. A y B) Numero de tropiezos y latencia de escape en barra circular de 2cm. A y B) Numero de tropiezos y latencia de escape en barra cuadrada de 1cm. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ (ANOVA estadístico de Tukey), $n=6-7$.

6.2.2 Análisis histológico de cerebelo

El análisis histológico en ratas APC+SS reveló la presencia de vacuolas de distintos tamaños en la capa molecular, un hallazgo que coincide con la degeneración cerebelosa descrita en pacientes con encefalopatía hepática (Butterworth, 2019). López-Cervantes *et al.* (2021) fueron los primeros en documentar la degeneración espongiiforme en el cerebelo de ratas con APC tras 13 semanas, comparándola con trastornos neurodegenerativos amiloidogénicos, caracterizados por la agregación patológica de proteínas como priones, β -amiloide, tau y α -sinucleína. Por otro lado, en la capa de Purkinje se observó la pérdida significativa de las neuronas de ratas APC+SS en comparación con el grupo control y APC+AL (SHAM 29.3 ± 0.96 , APC+SS 20.57 ± 0.90 , APC+LA 29.23 ± 0.72). No obstante, las neuronas remanentes en el grupo sin tratamiento presentaron alteraciones morfológicas evidentes, como deformación y reducción del área nuclear (figura 30 y figura 31).

Se ha demostrado que la pérdida de neuronas de Purkinje en ratas APC está estrechamente relacionada con alteraciones morfológicas y apoptosis de la glía de Bergmann. Garcia-Lezana (2017) reportó este efecto apenas 4 semanas después de la cirugía, mientras que López-Cervantes *et al.* (2021) observaron efectos similares a las 13 semanas postcirugía. Este proceso degenerativo podría estar relacionada a múltiples factores, como la hiperamonemia, la alteración en la transmisión glutamatérgica, la sobreactivación de la microglía y cambios en los astrocitos, que en conjunto contribuyen a la muerte neuronal.

La administración de acetato de leuprolida mejoró significativamente la supervivencia neuronal y el mantenimiento de la estructura de la corteza del cerebelo. En este grupo, se observó un aumento en las neuronas de Purkinje en comparación con el grupo sin tratamiento, además de una disminución considerable en la aparición de vacuolas en la

capa molecular en las ratas con APC. Aunque los mecanismos específicos de su acción en el cerebelo aún no están completamente esclarecidos, la evidencia respalda su papel neurotrófico. Alberson y colaboradores (2008) identificaron la presencia de receptores de la GnRH en el cerebelo, particularmente en las células de Purkinje, las cuales desempeñan un papel fundamental en el control motor y la cognición a través de la inhibición mediada por la liberación de GABA. Además, se ha demostrado que la administración de GnRH modula los niveles de GABA y glutamato en el cerebelo (Pasha & Vijayan, 1992), lo que podría favorecer la funcionalidad de las células de Purkinje y mejorar la coordinación motora.

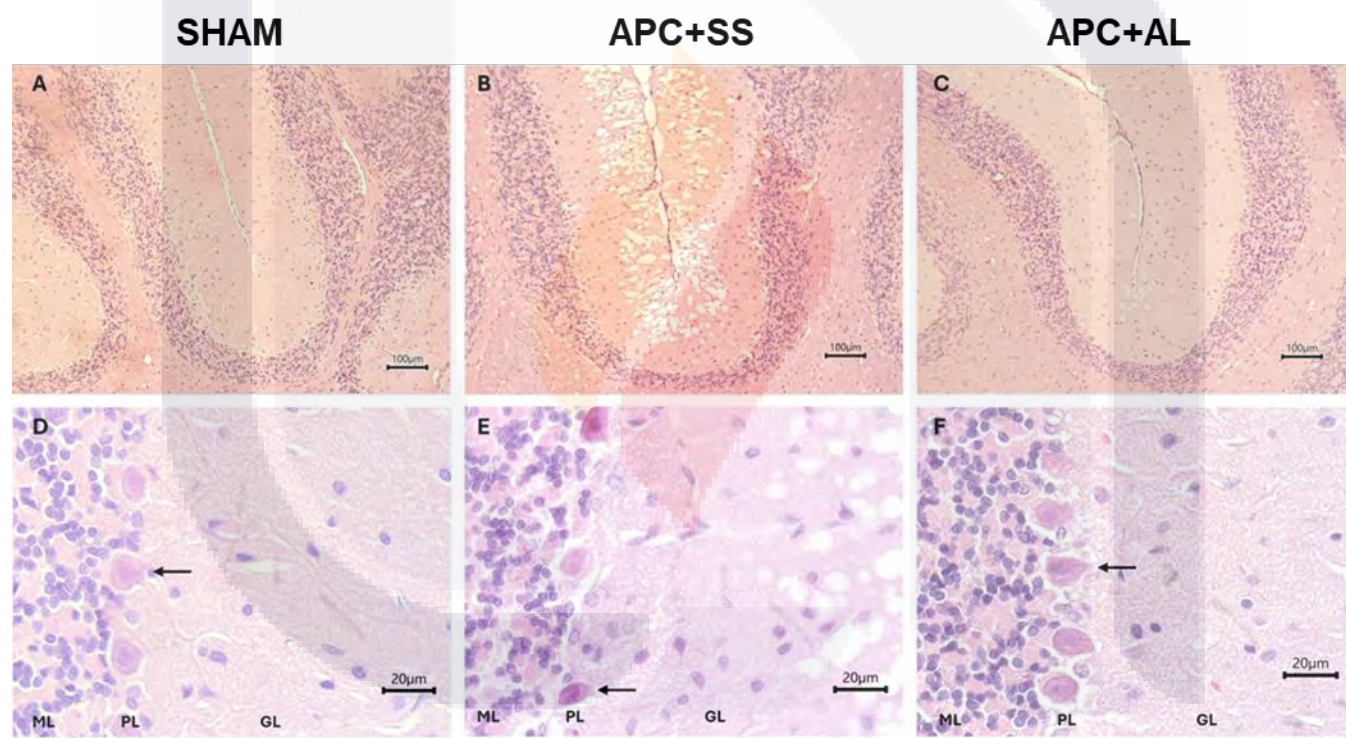


Figura 30. Histología de cerebelo de los grupos SHAM, SS y AL. A) Capas de corteza cerebelar de grupo SHAM a 10x. D) Células de Purkinje grupo SHAM 40x. B) Capas de corteza cerebelar de grupo SS a 10x. E) Células de Purkinje grupo SS 40x. C) Capas de corteza cerebelar de grupo AL a 10x. F) Células de Purkinje grupo AL 40x. n=3.

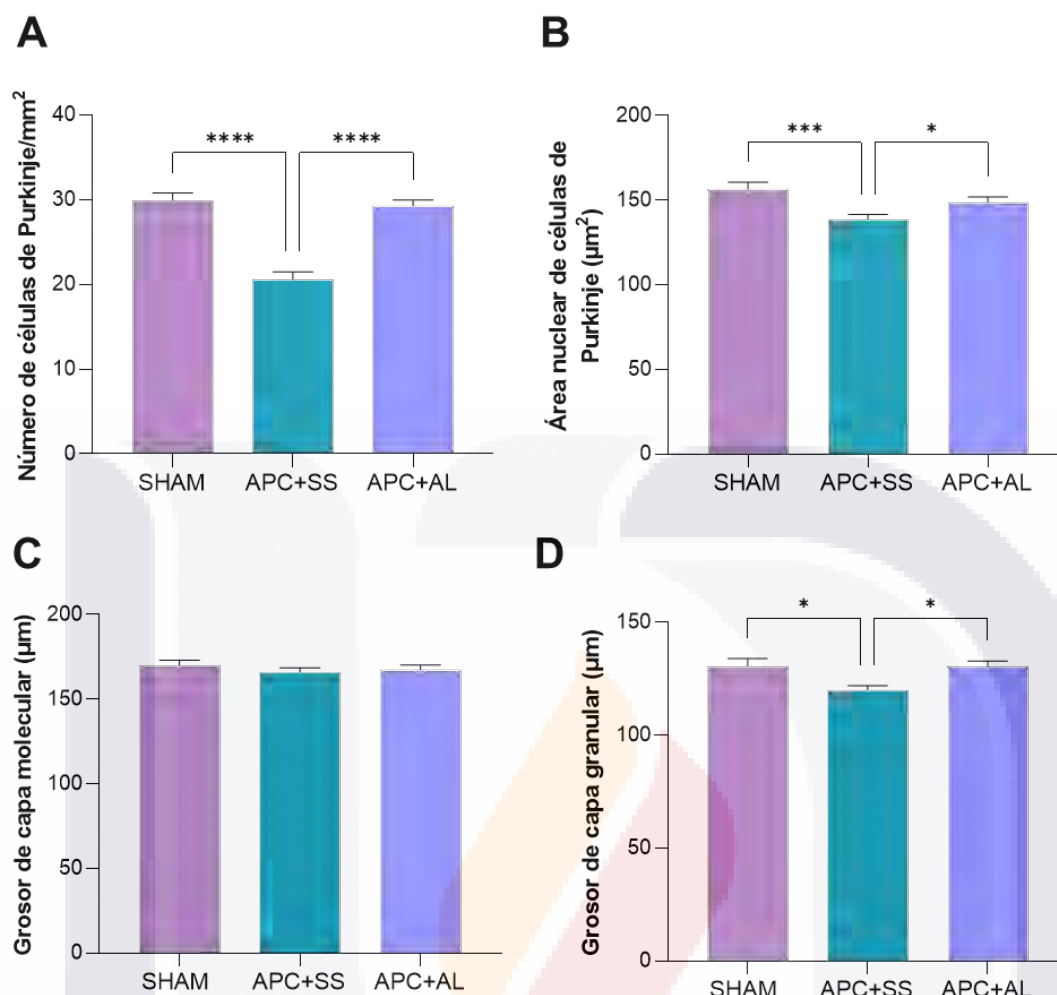


Figura 31. G) Grosor de capa granular, H) Número de células de Purkinje, I) Grosor de capa molecular en los grupos SHAM, SS y AL. * $p < 0.05$ (ANOVA prueba Tukey), $n=3$.

6.2.3 Evaluación de marcadores de integridad neuronal en cerebelo

A fin de poder corroborar si es que el AL tiene un efecto directo sobre la integridad neuronal del cerebelo se analizó la expresión de 3 proteínas implicadas en la estructura neuronal: espinofilina, NF200 y tubulina. El análisis de la expresión de espinofilina en cerebelo demostró una disminución significativa en el grupo de APC+SS en comparación con SHAM y APC+AL (SHAM; 92.87 ± 2.9 , APC+SS; 61.12 ± 7.9 , APC+AL: 83.32 ± 3.05), (Fig.32). La espinofilina es una proteína clave localizada en las

espinas dendríticas, donde desempeña un papel fundamental en la recepción de señales sinápticas excitatorias y en el mantenimiento de la morfología y densidad de las espinas. Su función es esencial para la plasticidad y estabilidad sináptica, ya que vincula la transmisión excitatoria con las adaptaciones estructurales en las sinapsis (Verdugo-Sivianes & Carnero, 2023).

La desregulación de esta proteína se ha asociado con fallos sinápticos y déficits cognitivos, como se ha evidenciado en modelos de encefalopatía hepática mínima (EHM) y en ratas con ligadura del conducto biliar (BDL). En estos modelos, la reducción en la densidad de espinas dendríticas en las células de Purkinje subraya el impacto de la encefalopatía hepática en la microestructura neuronal del cerebelo (Wang *et al.*, 2021; Mosso, 2021). El papel crucial de la espinofilina en las funciones motoras y cognitivas se respalda en estudios que muestran que la eliminación del gen que la codifica en modelos animales provoca déficits significativos en el desempeño del RotaRod y en el aprendizaje (Kristi *et al.*, 2017).

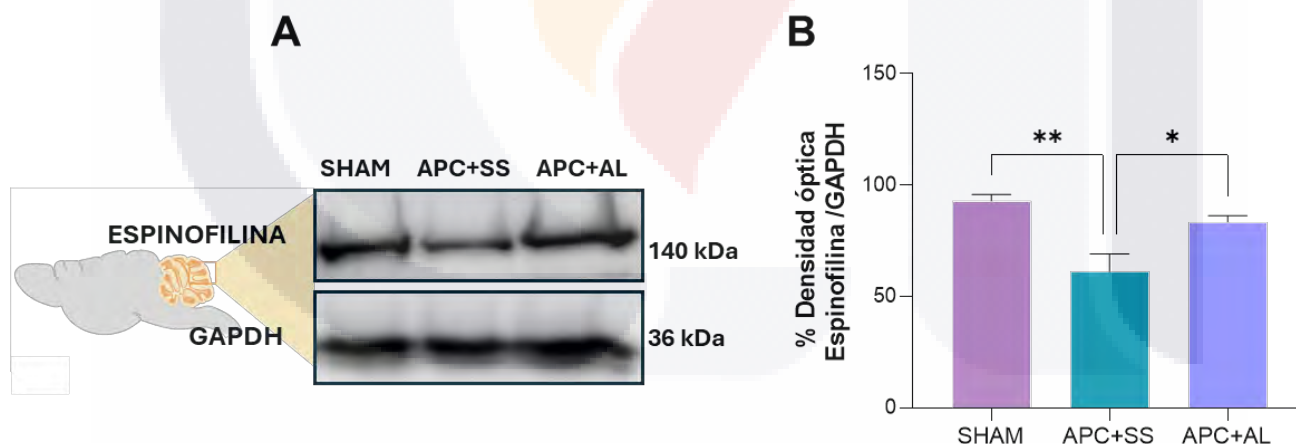


Figura 32. Expresión de espinofilina en ratas SHAM, SS y AL (n=5). A) Expresión en cerebelo B) expresión en hipocampo. Los resultados se muestran como media y SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la expresión de NF200 en el cerebelo (PCA+SS: $90.78 \pm 13.8\%$, PCA+LA: $86.9 \pm 18.7\%$). Este resultado podría

contrastar con los hallazgos previos, ya que mediante análisis histológico se observó una disminución en el número de células de Purkinje y una reducción en el grosor de la capa granular. Los neurofilamentos son proteínas estructurales clave en las neuronas y desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de su integridad. Existen tres subunidades con distintos pesos moleculares: ligera (68 kDa), media (160 kDa) y pesada (200 kDa) (Yuan *et al.*, 2017). La ausencia de cambios en la expresión de NF200 detectada mediante Western Blot podría deberse a que esta subunidad se mantuvo estable, mientras que la expresión de las otras isoformas de neurofilamentos podría haber sido alterada. Futuros estudios serán necesarios para evaluar específicamente estas otras subunidades y así dilucidar el impacto de la APC en la integridad estructural de las neuronas cerebelosas.

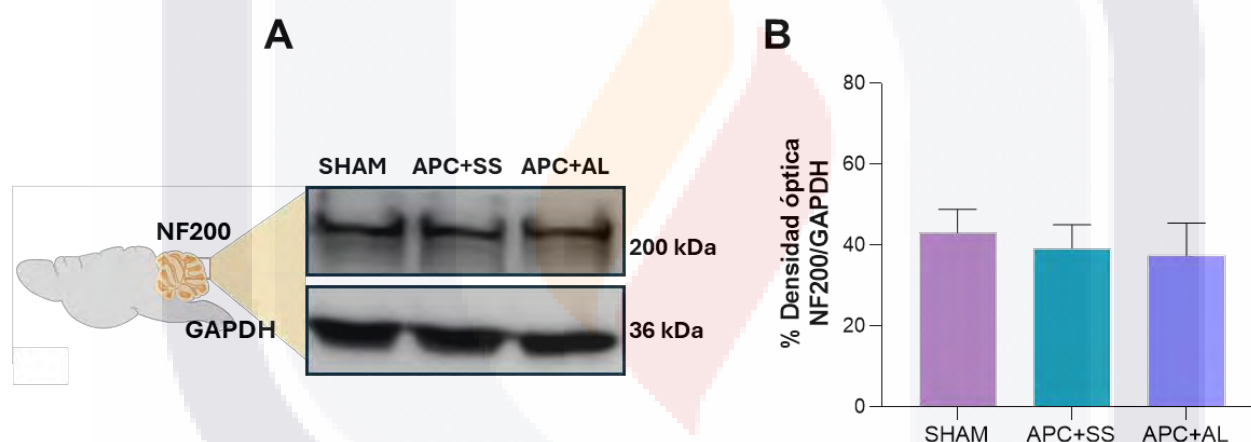


Figura 33. Expresión de NF200 en ratas SHAM, SS y AL (n=5). A) Expresión en cerebelo B) porcentaje de densidad óptica respecto a GAPDH. Los resultados se muestran como media y SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

Al no haber obtenido significancia en la expresión de NF200 y a fin de evaluar la estructura neuronal, se continuo a analizar la expresión de tubulina en la capa granular y molecular del cerebelo por medio de la técnica de inmunofluorescencia. Los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa en la expresión de tubulina en el grupo APC+SS en ambas capas del cerebelo. La EH podría generar un entorno neurotóxico e inflamatorio que compromete la integridad del citoesqueleto, lo

que desencadenaría la disfunción o muerte de las células cerebelosas (Hammond *et al.*, 2008). Además, diversos marcadores han sido utilizados para evaluar el daño neuronal asociado a la EH. França *et al.* (2009) reportaron una disminución del marcador neuronal NeuN en ratas con hiperamonemia, asociándolo con un proceso de neuroinflamación en el cerebelo

Por otro lado, se observó una mejora significativa en la expresión de tubulina en el grupo APC+AL. Estos hallazgos respaldan lo observado durante las pruebas de función motora y en los análisis histológicos, en donde la estructura celular del grupo tratado parece mantenerse más estable a pesar del estado de hiperamonemia. Aunque los efectos neurotróficos de la GnRH en el cerebelo aún no han sido ampliamente estudiados, la evidencia disponible indica que esta hormona modula el contenido de neurotransmisores cerebelares, en particular glutamato y GABA (Pasha & Vijayan, 1992). Esta regulación podría influir en la interacción y funcionalidad sináptica de las células de Purkinje. Además, se ha documentado que la GnRH desempeña un papel neurotrófico en otros contextos, donde regula la neuroinflamación y preserva la integridad neuronal (Martínez-Moreno *et al.*, 2023, Baca-Alonso y Quintanar, 2024). Por lo que el tratamiento con AL podría tener efectos neurotróficos en las neuronas cerebelares, ayudando a mitigar los déficits estructurales y funcionales asociados con la hiperamonemia y la degeneración cerebelosa.

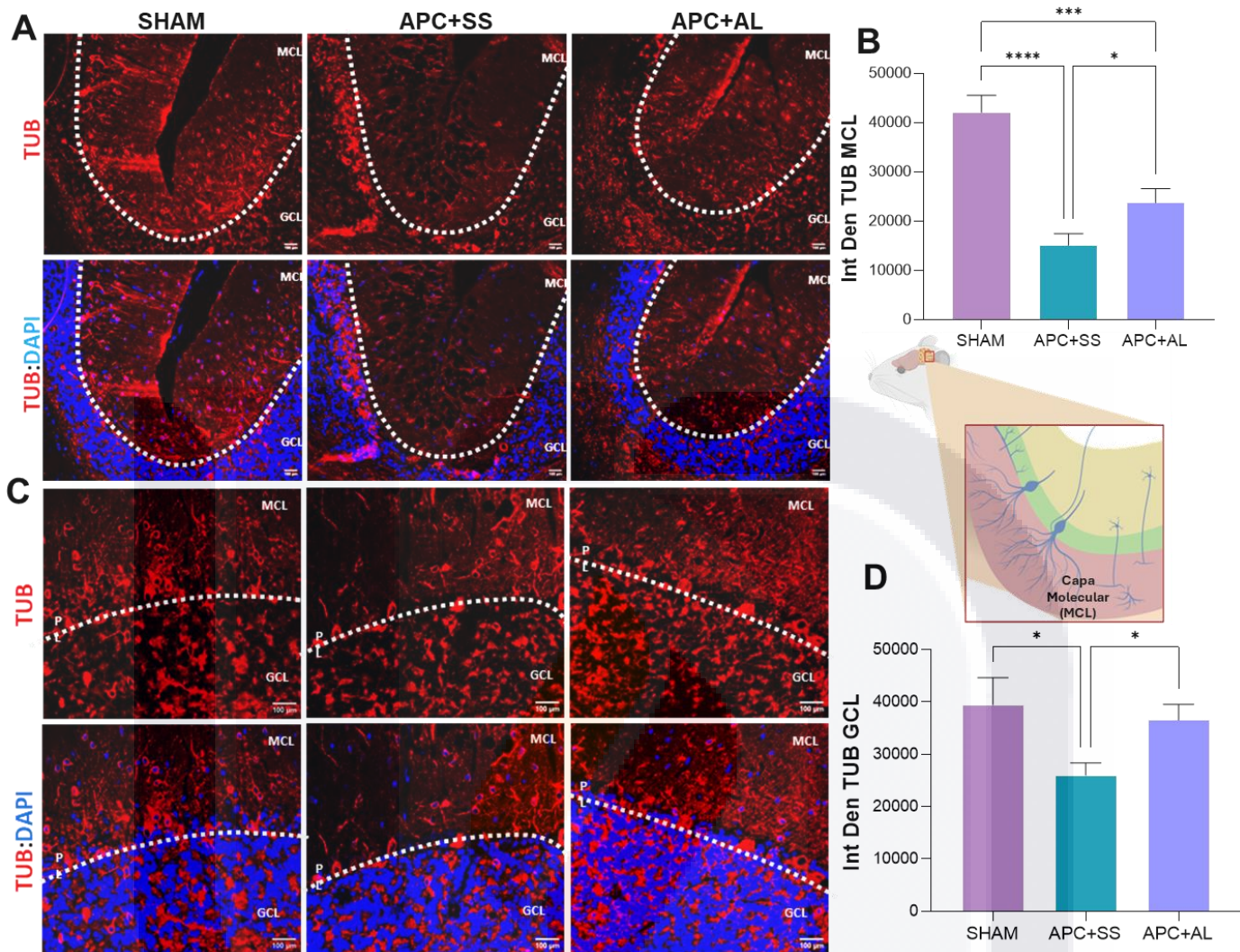


Figura 34. Expresión de tubulina por medio de la técnica de inmunofluorescencia A y B expresión en la capa molecular de cerebelo de ratas. C y D expresión en la capa granular. Los resultados se muestran como densidad integrada y SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc ($n=3$)

6.2.4 Evaluación de marcadores de gliosis reactiva

Para evaluar el efecto del tratamiento con AL en los astrocitos, se analizó la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un marcador de activación astrocitaria, mediante Western Blot e inmunofluorescencia. En el cerebelo, se observó un aumento en la expresión de esta proteína en el grupo APC+AL en comparación con los grupos SHAM y APC+SS (SHAM: 100.5 ± 5.67 ; APC+SS: 105.3 ± 9.49 ; APC+AL:

137.4±14.58). De manera interesante, en el grupo sin tratamiento (APC+SS) se detectó un bandeo adicional por debajo de la banda esperada de 53 kDa, con dos señales más intensas en comparación con SHAM y AL. Este fenómeno podría estar relacionado con la presencia de isoformas de GFAP, las cuales han sido implicadas en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Gogishvili *et al.*, 2025). Ante estos resultados y con el objetivo de analizar mejor el fenómeno, se decidió evaluar la expresión de GFAP mediante inmunofluorescencia.

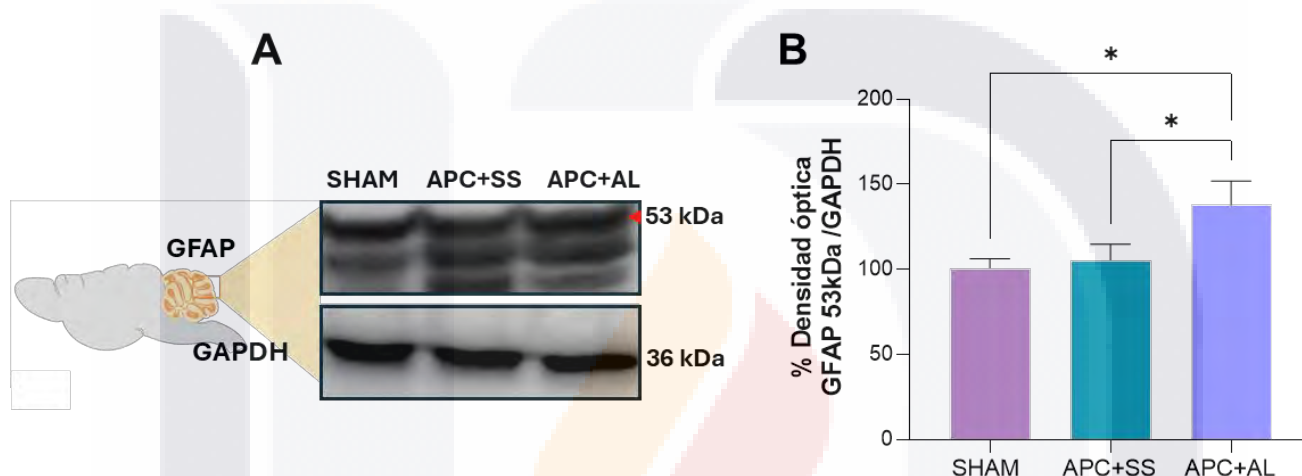


Figura 35. Expresión de GFAP en ratas SHAM, SS y AL (n=5). A) Expresión en cerebelo B) porcentaje de densidad óptica respecto a GAPDH. Los resultados se muestran como media y SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

El análisis de la expresión de GFAP en la capa molecular del cerebelo demostró un aumento significativo en el grupo APC+SS en comparación con el control (SHAM: 20400±3021, APC+SS: 39013±8861, APC+AL: 17999±1961).). Los astrocitos desempeñan un papel fundamental en el soporte estructural del tejido y en el mantenimiento de la homeostasis. Un marcador ampliamente utilizado para identificar astrocitos es GFAP, una proteína del citoesqueleto intermedio presente en la mayoría de los astrocitos del sistema nervioso central. Su función principal es proporcionar soporte mecánico y contribuir a la integridad de la barrera hematoencefálica (BBB) (Jurga *et al.*, 2021). La sobreexpresión de GFAP se ha asociado con la astrogliosis reactiva, una alteración característica de la morfología y función de los astrocitos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

observada en diversos trastornos neurológicos, como neurotrauma, accidente cerebrovascular isquémico y enfermedades neurodegenerativas (Pekny *et al.*, 2016). La astrogliosis también ha sido reportada en pacientes con EH y en ratas con derivación portosistémica (Agarwal y Mais, 2019; Cruz y Duffy, 1983).

A diferencia de lo observado en la capa molecular, en la capa granular se registró una notable disminución en la expresión de GFAP en los grupos lesionados en comparación con el grupo control (SHAM: $41,119 \pm 3,371$; SS: $19,155 \pm 1,666$; AL: $23,681 \pm 774.2$). Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos AL y SS, se observó una tendencia al aumento de GFAP en el grupo tratado en comparación con el grupo sin tratamiento (Fig. 36). La reducción en la expresión de GFAP ha sido previamente reportada en un modelo de APC, donde a las 13 semanas postcirugía se evidenció una disminución en la capa granular, lo que sugiere una pérdida de astrocitos (López-Cervantes *et al.*, 2021).

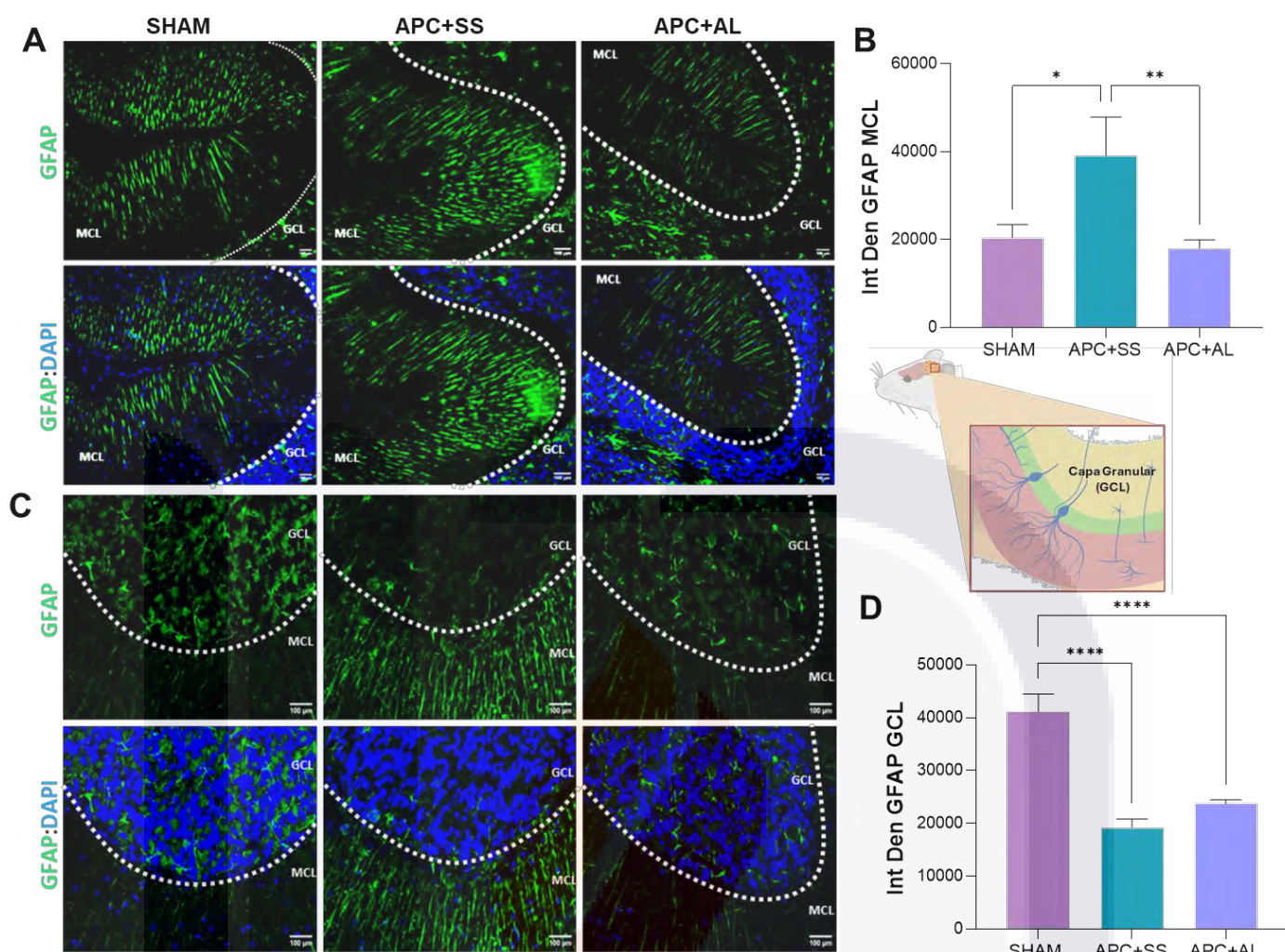


Figura 36. Expresión de GFAP por medio de la técnica de inmunofluorescencia A y B expresión en capa molecular de cerebelo, C y D expresión en la capa granular del cerebelo (n=3). Los resultados se muestran como densidad integrada y SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

Además de la evaluación de gliosis reactiva mediante GFAP, se utilizó Iba1 (molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1) como marcador de microglia. Iba1 es una proteína de 17 kDa expresada predominantemente en microglia y macrófagos periféricos, con un papel clave en la remodelación del citoesqueleto de actina, esencial para la motilidad y fagocitosis microglial. Su sobreexpresión se asocia con activación microglial, por lo que es un marcador ampliamente empleado en el estudio de

neuroinflamación en diversas enfermedades neurodegenerativas. Los resultados muestran un incremento en la expresión del ARNm de Iba1 en el grupo sin tratamiento en comparación con el control y el tratado con AL (SHAM: 1.02 ± 0.08 ; APC+SS: 3.26 ± 0.18 ; APC+AL: 1.26 ± 0.07). Estudios previos han demostrado que la hiperamonemia inducida por una dieta con 20% de acetato de amonio genera activación de astrocitos y microglia en el cerebelo (Cabrera-Pastor *et al.*). Asimismo, en un modelo de APC, la activación microglial y astrocitaria se ha vinculado con un aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β (Dadsetan *et al.*, 2016). En este estudio, la microgliosis y astrogliosis observadas en ratas con APC, evidenciadas por el aumento en los niveles de Iba1 y GFAP, fueron normalizadas con el tratamiento con AL, lo que indica que este compuesto reduce la neuroinflamación cerebelosa en un modelo de encefalopatía hepática (EH).

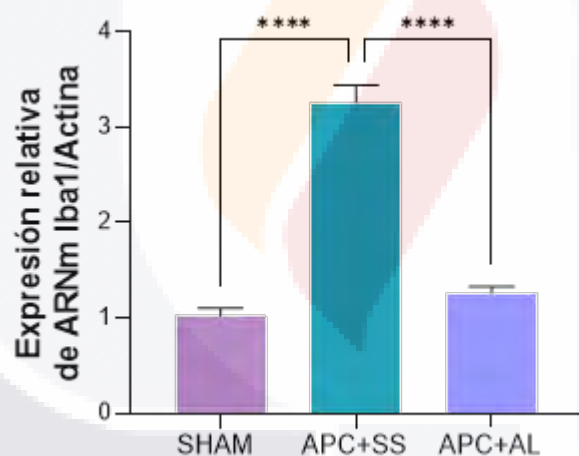


Figura 37. Expresión relativa de ARNm Iba 1 en ratas SHAM, SS y AL ($n=3$). Los resultados como expresión relativa con respecto a actina y SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, **** $p < 0,00001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

6.2.5 Evaluación de marcadores de inflamación

Con el objetivo de evaluar el efecto del acetato de leuprolida sobre los marcadores de inflamación, se midió la expresión relativa del ARN mensajero de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-6, IL-1 β e iNOS). Se observó un aumento significativo

en la expresión de IL-1 β en el grupo APC+SS (2.3 ± 0.19) en comparación SHAM (0.9 ± 0.15). En contraste, en el grupo tratado con AL (1.77 ± 0.18) no se encontraron diferencias con respecto al grupo control, pero sí una reducción significativa en comparación con el grupo sin tratamiento. Al analizar la expresión de TNF α , se observó un incremento en el grupo APC+SS (0.94 ± 0.47) en comparación con el grupo control SHAM (0.5 ± 0.15). En el grupo tratado con AL (0.21 ± 0.02), no se detectaron diferencias significativas en relación con los grupos control y SS; sin embargo, se observó una tendencia a la disminución en comparación con el grupo SS.

En modelos de hiperamonemia crónica, se ha descrito un proceso de neuroinflamación en el cerebelo caracterizado por la activación de microglia y astrocitos, así como un aumento en los niveles de IL-1 β y TNF α . Este fenómeno se acompaña de una mayor expresión en membrana del receptor TNFR1 para TNF α . Además, se ha observado que esta respuesta inflamatoria está asociada con un incremento en la expresión nuclear de NF- κ B, el cual activa la transcripción de una serie de genes proinflamatorios, incluidos IL-1 β y TNF α . Por otro lado, el efecto antiinflamatorio del acetato de leuprolida (AL) ha sido reportado previamente por Guzmán-Soto y colaboradores (2012) en un modelo de esclerosis múltiple. En dicho estudio, se observó que el tratamiento con AL favoreció la disminución en la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-17A y TNF- α , lo cual se asoció con una menor activación de la vía de señalización de NF- κ B.

Al analizar la expresión de iNOS en el grupo de APC+SS (5.98 ± 0.69), se observó un aumento significativo en comparación con el control SHAM (1.9 ± 0.25). En contraste, en el grupo tratado con acetato de leuprolida (AL) (1.95 ± 0.58), no se encontraron diferencias respecto al control, pero sí una disminución significativa en comparación con el grupo sin tratamiento (SS). De manera similar, al evaluar la

expresión de IL-6, se evidenció un aumento en el grupo SS (3.43 ± 0.13) en comparación con el control SHAM (1.52 ± 0.2). Sin embargo, en el grupo AL (1.28 ± 0.07), no se observaron diferencias en relación con el control, pero sí una disminución significativa frente al grupo SS. Estudios previos, como el de Cauli *et al.*, han demostrado el aumento en la expresión de marcadores inflamatorios como iNOS y COX en la corteza cerebral de ratas con APC. Además, la hiperamonemia se ha asociado con un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) a citocinas proinflamatorias, facilitando así la producción de iNOS. La sobreexpresión de iNOS, a su vez, se ha vinculado con el deterioro cognitivo (Sedik *et al.*, 2023).

En nuestro estudio, encontramos que el tratamiento con AL logró reducir significativamente los niveles de IL-6 e iNOS. Estos resultados son consistentes con los reportados por Martínez-Moreno *et al.* (2023), quienes observaron que el tratamiento con GnRH redujo significativamente la expresión de IL-6 e iNOS a los 21 días post-lesión, sugiriendo un efecto antiinflamatorio similar al observado en nuestro modelo experimental. De manera similar, Guzmán-Soto *et al.* informaron una disminución en la expresión de IL-1 β , IL-17A y TNF- α en modelos de encefalomielitis autoinmune experimental, atribuyendo este efecto a la inhibición de la vía de NF- κ B. Esta evidencia resalta la doble acción del AL: por un lado, mejora la función motora, y por otro, reduce la neuroinflamación a través de su impacto en neuronas y células gliales. En conjunto, estos hallazgos sugieren que el AL podría representar una estrategia terapéutica prometedora con efectos neurotróficos y antiinflamatorios en disfunciones cerebelosas asociadas a la hiperamonemia y otras condiciones inflamatorias.

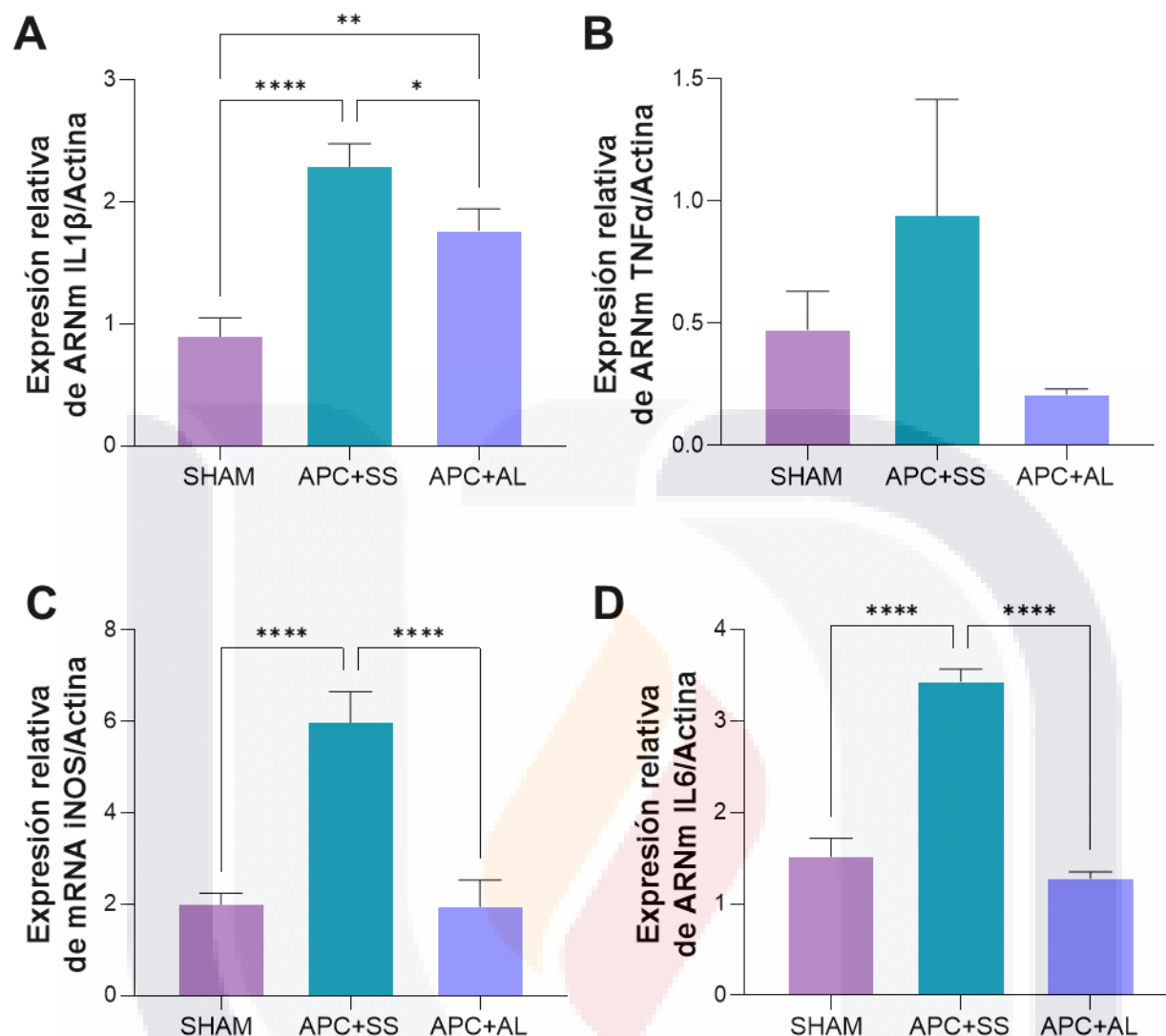


Figura 38. Expresión relativa de ARNm de TNF α , IL-6, IL-1 β e iNOS en ratas SHAM, SS y AL ($n=3$). Los resultados como expresión relativa con respecto a actina y SEM. * $p<0,05$, ** $p<0,001$, **** $p<0,00001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

Por otro lado, al examinar la expresión de la citocina antiinflamatoria IL4 no se observó significancia entre los tres grupos experimentales, sin embargo, se puede apreciar una tendencia al decremento en el grupo de APC+SS (1.97 ± 0.93) en comparación con el control SHAM (2.9 ± 1.15) y el de AL (2.4 ± 0.6). Al analizar la expresión de TGF β no se apreciaron diferencias significativas entre los tres grupos experimentales.

Finalmente, al analizar la expresión de IL10 se apreció una disminución significativa de los grupos APC+AL (0.63 ± 0.06) y APC+SS (0.49 ± 0.1) con el SHAM (0.94 ± 0.11).

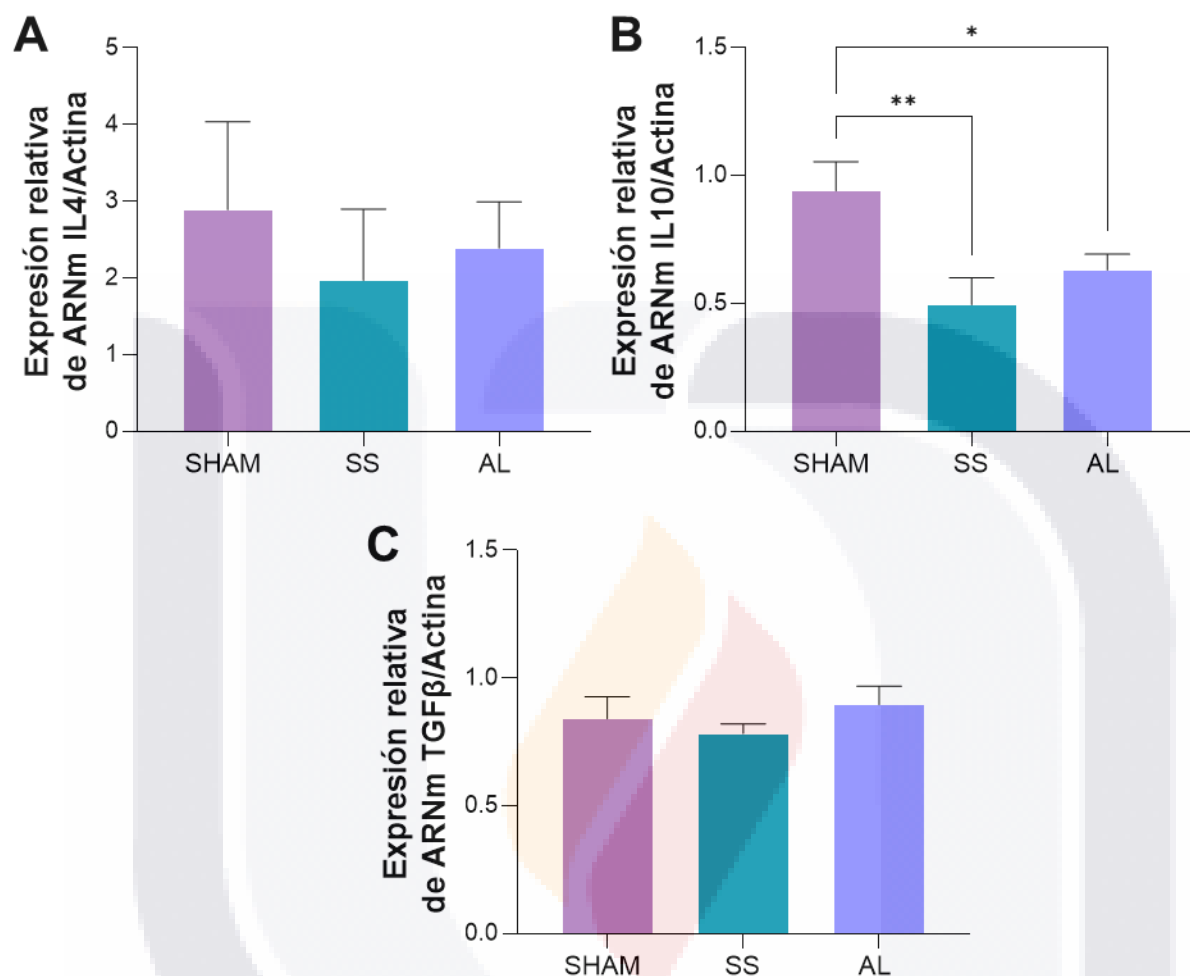


Figura 39. Expresión relativa de ARNm de IL4, IL1 y TGFβ en ratas SHAM, SS y AL ($n=3$). Los resultados como expresión relativa con respecto a actina y SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, **** $p < 0,00001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

6.2.6 Evaluación de factores neurotróficos en cerebelo

La expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el cerebelo mostró una disminución significativa en el grupo SS en comparación con el grupo control, tanto a nivel proteico como en la expresión de ARNm (SHAM: 40.09 ± 1.4 ; APC+SS: 26.6 ± 2.3 en inmunodetección; SHAM: 1.09 ± 0.08 ; APC+SS: 0.89 ± 0.04 en ARNm de BDNF). Asimismo, se observaron diferencias en la expresión de ARNm de BDNF entre

los grupos SS y AL, siendo mayor en el grupo AL (AL: 36.5 ± 3.8) (Fig. 25). BDNF desempeña un papel esencial en el desarrollo, mantenimiento y función del cerebelo, regulando la morfología y diferenciación de las células granulares y de Purkinje. Su señalización a través de TrkB (quinasa del receptor de tropomiosina B) favorece la supervivencia de las células granulares y facilita la plasticidad sináptica en las células de Purkinje, procesos fundamentales para la función cerebelosa y el almacenamiento de memoria a largo plazo. Diversos estudios han señalado que la disfunción astrocítica o la exposición a amonio pueden reducir los niveles de BDNF, afectando la conectividad sináptica. Dichas alteraciones han sido observadas en condiciones como la encefalopatía hepática (EH), donde la senescencia astrocítica y la disminución de BDNF comprometen la función neuronal y sináptica. Martínez-Moreno *et al.* (2024), reportó que el tratamiento con GnRH en un modelo de lesión medular en rata incrementó la expresión de ARNm de neurotrofinas, incluyendo BDNF, NGF y NT3 en tejido medular. El restablecimiento en la expresión de BDNF tras el tratamiento con AL podría asociarse con la mejoría en pruebas de coordinación motora y con la protección neuronal en el cerebelo. Dado que BDNF está estrechamente ligado a la supervivencia neuronal, su modulación representa un objetivo terapéutico prometedor para la degeneración cerebelosa, los trastornos motores y las enfermedades neurodegenerativas.

Al analizar la expresión del factor de crecimiento nervioso (NGF), observamos un aumento en el grupo APC+SS en comparación con los grupos SHAM y APC+AL. Este hallazgo es particularmente interesante, ya que se esperaba una reducción de este neurotrófico en el grupo sin tratamiento. Sin embargo, estudios previos han reportado que, tras un trauma cortical, la respuesta inflamatoria desencadenada por citocinas puede inducir un incremento en la expresión de NGF tanto en la corteza como en el cerebelo. Además, NGF desempeña un papel neurotrófico al prevenir la apoptosis de las neuronas de Purkinje causada por la privación de factores tróficos. De manera

similar, se ha demostrado que los astrocitos cerebelosos en cultivos primarios responden selectivamente al ácido kaínico y a la exposición a citocinas inflamatorias aumentando la producción de NGF (Gelfo *et al.*, 2011). Por lo tanto, el incremento de NGF en el grupo APC+SS podría estar directamente relacionado con la mayor expresión de citocinas proinflamatorias observada en este grupo.

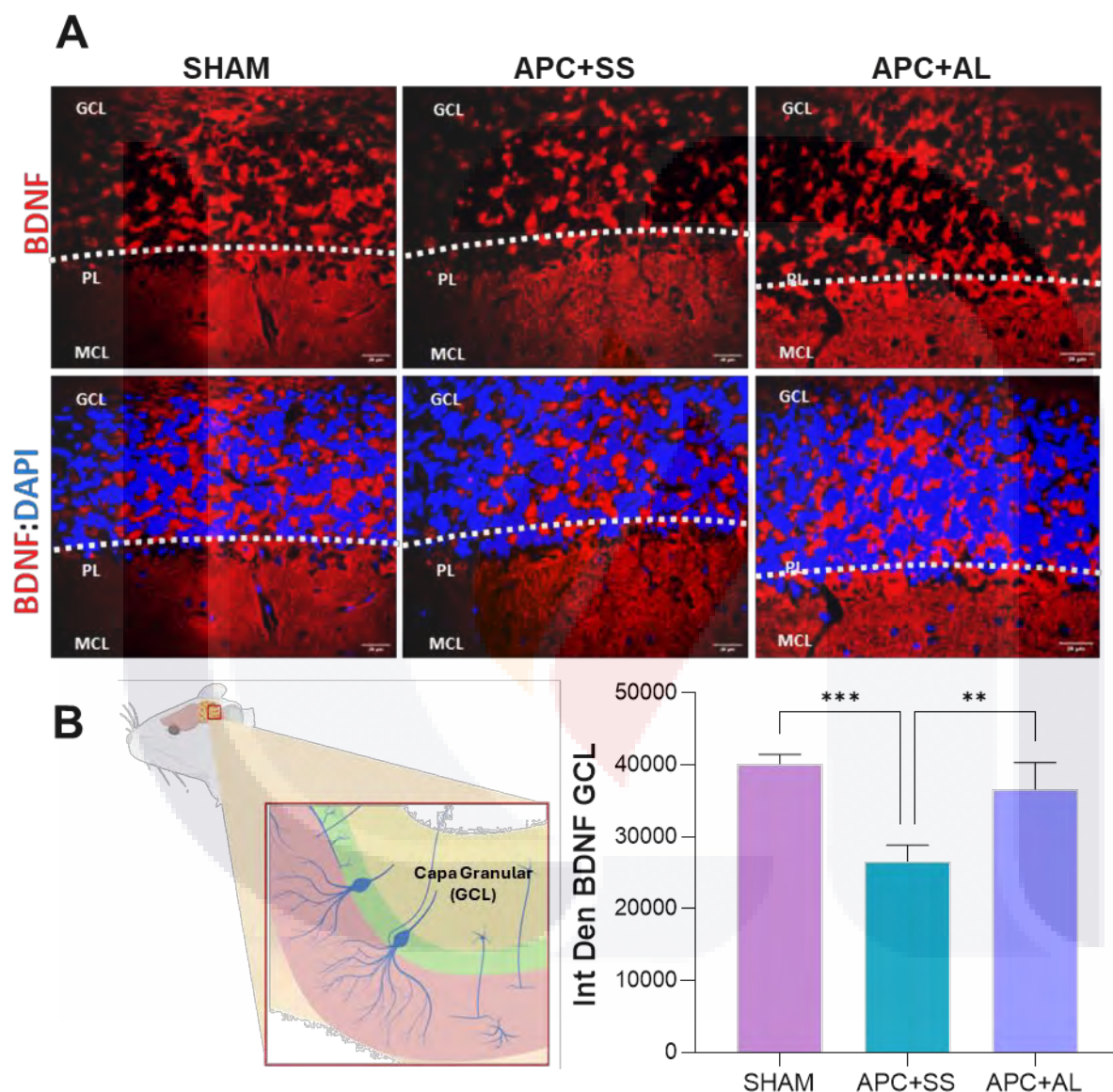


Figura 40. Expresión de BDNF en cerebelo de ratas SHAM, SS y AL ($n=3$). Los resultados se muestran como densidad integrada y SEM. $*p<0,05$, $**p<0,001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

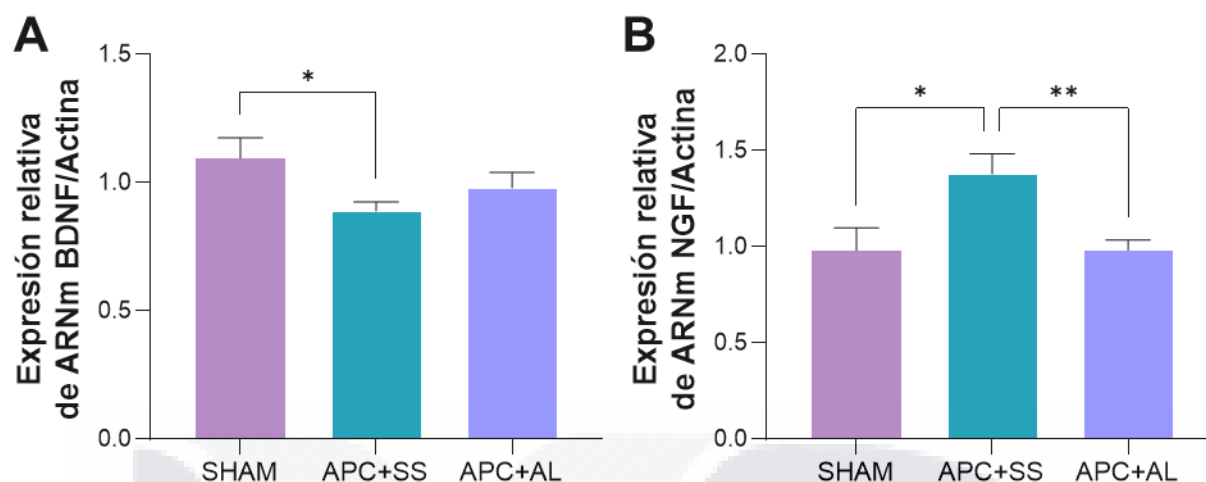


Figura 41. Expresión relativa de ARNm de BDNF y NGF en ratas SHAM, SS y AL ($n=3$). Los resultados como expresión relativa con respecto a actina y SEM. * $p<0,05$, ** $p<0,001$, **** $p<0,00001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

6.2.7 Evaluación de marcadores involucrados en proceso de neurotransmisión en cerebelo

La sinaptofisina es una proteína integral de la membrana sináptica que se utiliza comúnmente como marcador de densidad sináptica (Cousin, 2021). El análisis de la expresión de sinaptofisina demostró un aumento significativo en el grupo APC+SS en comparación con el control y AL (SHAM: 34766 ± 2725 ; APC+SS: 42250 ± 2640 ; APC+AL: 33123 ± 1466), (Fig.42). Este incremento resulta interesante, ya que en otros modelos de hiperamonemia se ha reportado la disminución en los niveles de sinaptofisina, lo que sugiere alteraciones en la plasticidad sináptica y la función neuronal (França *et al.*, 2019).

Sin embargo, algunos estudios han señalado que la activación microglial y astrocítica inducida por la hiperamonemia promueve la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF α , IL1 β e IL6, lo que podría modular la sinaptogénesis al regular la expresión de proteínas sinápticas, incluida la sinaptofisina. Por otro lado, otra explicación podría ser que, en respuesta al daño neuronal inducido por la hiperamonemia, el sistema nervioso puede intentar compensar la disfunción sináptica mediante un aumento en la

expresión de sinaptofisina para fortalecer las conexiones existentes o la formación de nuevas sinapsis (Popek *et al.*, 2022).

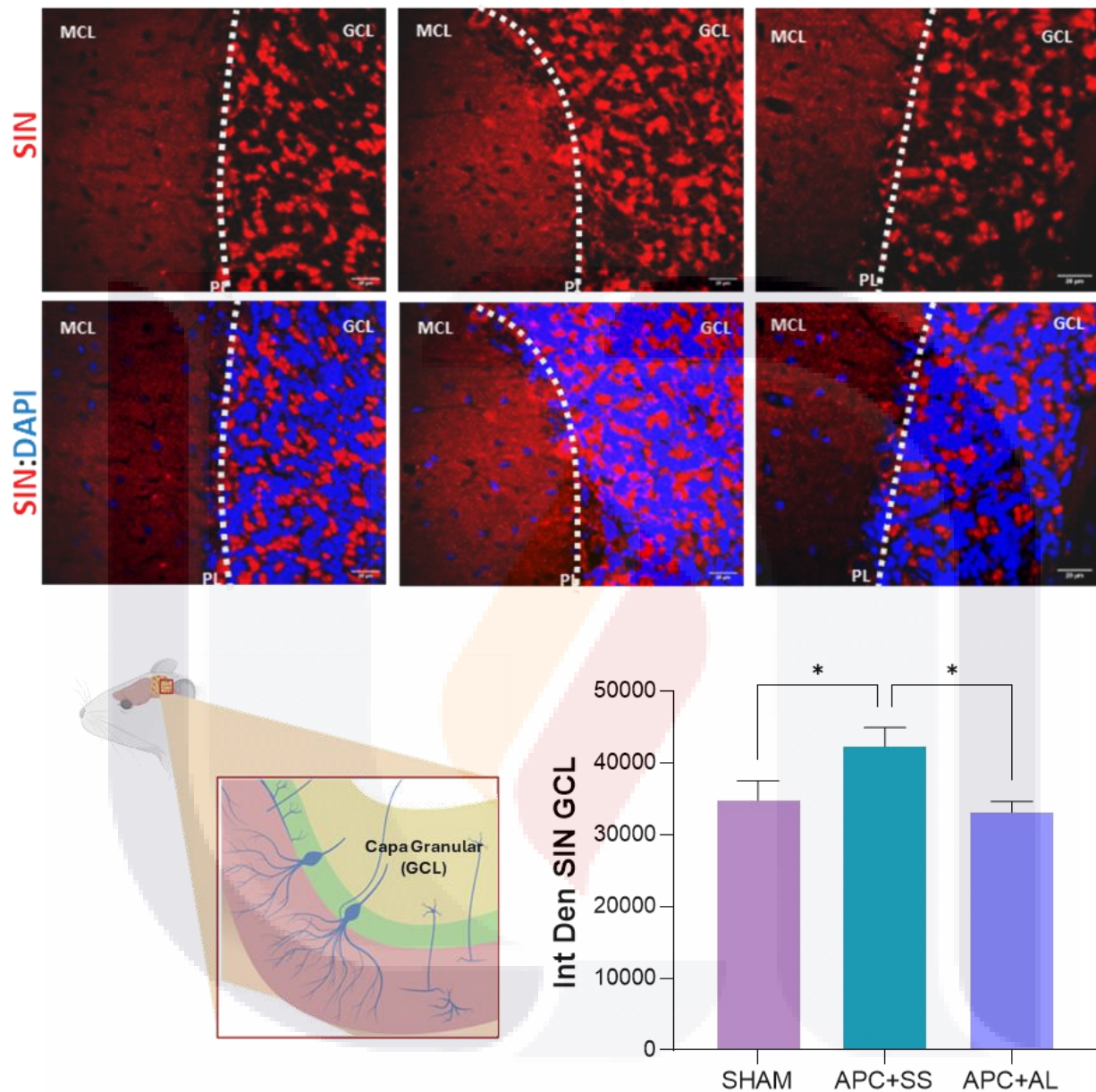


Figura 42. Expresión de sinaptofisina en cerebelo de ratas SHAM, SS y AL ($n=3$). Los resultados se muestran como densidad integrada y SEM. * $p<0,05$, ** $p<0,001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

Se evaluó la expresión de receptores a glutamato NMDA, estos son heterotetrámeros compuestos por dos subunidades NR1 y dos subunidades regulatorias de unión a glutamato NR2 (NR2A-D). La expresión del ARNm de las subunidades NR1 y NR2

mostraron una disminución significativa en el grupo de APC+SS al compararlo con el SHAM (SHAM: 1.09 ± 0.08 NR1 y 1.16 ± 0.05 NR2A; APC+SS: 0.89 ± 0.04 NR1 y 0.94 ± 0.05 NR2A). No obstante, el grupo de APC+AL: mostro un aumento significativo en la expresión de NR2A, no siendo así en el NR1 sin embargo también se notó una tendencia a aumentar en comparación con el grupo no tratado (APC+AL: 1.41 ± 0.14 NR1 y 1.27 ± 0.05 en NR2A).

En el cerebelo, todas las clases de neuronas reciben proyecciones glutamatérgicas. Las células granulares reciben proyecciones glutamatérgicas de las fibras musgosas, y la activación de los receptores NMDA es importante para la función fisiológica de estas sinapsis (Llansola *et al*, 2005). Además, en las células de Purkinje, la expresión de estos receptores en ratas adultas tiene una participación en la protección de estas, las cuales son altamente susceptibles a la excitotoxicidad mediada por glutamato modulando así la entrada excesiva de calcio. Alternativamente, la señalización de calcio mediada por los receptores NMDA podría permitir que la entrada de señales provenientes de las fibras trepadoras contribuya a la señalización de calcio necesaria para la inducción de la depresión a largo plazo (LTD), que, a diferencia de lo observado en hipocampo, la señalización de los receptores NMDA en el cerebelo es necesaria para la inducción de LTD, pero no para la potenciación a largo plazo (LTP) (Piochon *et al*, 2010). La LTD es un mecanismo clave en el aprendizaje motor y la coordinación, ya que ajusta la fuerza de las conexiones sinápticas en respuesta a experiencias previas. No existen reportes que hablen acerca de la expresión de los receptores NMDA en el cerebelo durante la EH, sin embargo, la expresión de ARNm de la subunidad del receptor NR1 ha sido estudiada en ratas con BDL en donde la expresión de dicha subunidad disminuyó significativamente en la corteza prefrontal, mientras que aumentó en el hipocampo; sin embargo, en el cuerpo estriado no se observaron cambios significativos. Por lo que la hiperamonemia podría alterar la expresión de los receptores NMDA a nivel de ARNm afectando el proceso de neurotransmisión en diferentes etapas de la EH.

Por otro lado, el restablecimiento de los niveles de las subunidades NR1 y NR2A en el grupo APC+AL sugiere una posible regulación en la neurotransmisión glutamatergica, con implicaciones en la plasticidad sináptica y la excitabilidad neuronal. La subunidad NR1 es fundamental para la formación de receptores NMDA funcionales, ya que está presente en todos ellos. Por su parte, la subunidad NR2A modula las propiedades del receptor, regulando su tiempo de apertura y la cantidad de calcio que ingresa a la célula tras la activación. El aumento en la expresión de ambas subunidades indica una mayor cantidad de receptores NMDA ensamblados y activos en la membrana neuronal, lo que podría estar relacionado con mecanismos de compensación neuronal y adaptación sináptica (Flores-Soto *et al.*, 2012).

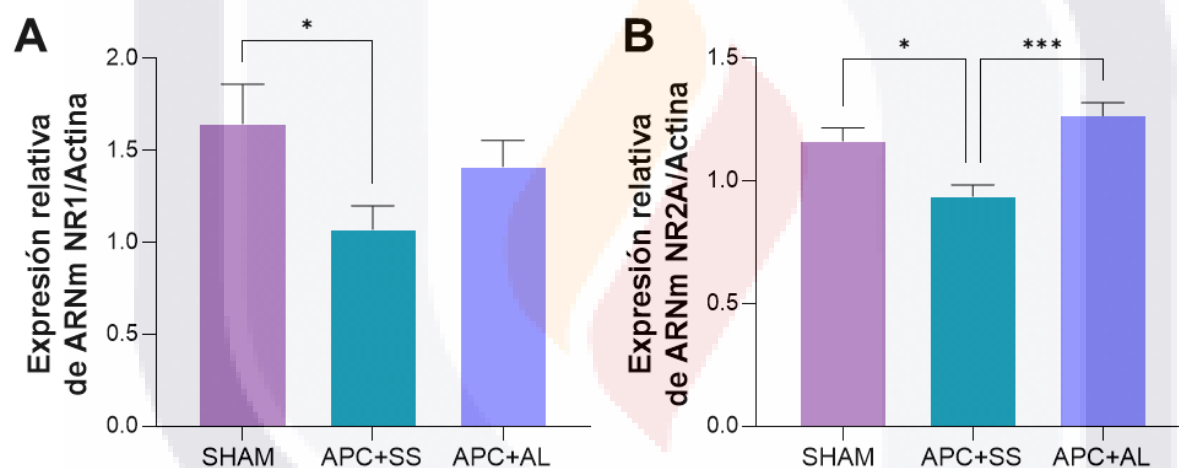


Figura 43. Expresión relativa de ARNm de NR1 y NR2A en ratas SHAM, SS y AL ($n=3$). Los resultados como expresión relativa con respecto a actina y SEM. * $p<0,05$, ** $p<0,001$, **** $p<0,00001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

6.3 Evaluación del efecto del acetato de leuprolida sobre hipocampo de ratas con EH.

6.3.1 Evaluación de funciones cognitivas

6.3.1.1 Laberinto en Y

El laberinto en Y nos permitió evaluar la memoria espacial a corto plazo de los animales experimentales, durante esta prueba el número de entradas en el nuevo brazo se comparó con las entradas en los otros brazos para evaluar el grado de memoria espacial, una rata que no muestra preferencia por ninguno de los brazos es una indicación de memoria espacial deteriorada, lo que puede indicar alteración del funcionamiento del hipocampo (Kraeuter *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos de esta prueba muestran una diferencia entre el porcentaje de entradas del grupo de APC+SS ($26.07 \pm 2.29\%$) en comparación con los grupos de APC+AL (37%) y SHAM ($46.31 \pm 7.71\%$).

Este deterioro cognitivo podría estar asociado al aumento en la captación de amonio en el cerebro, ya que diversos estudios han señalado que niveles elevados de este compuesto afectan los procesos cognitivos. Erceg *et al.* (2005) reportaron una reducción en la capacidad de aprendizaje en la prueba del laberinto en Y en ratas con APC, así como en modelos de hiperamonemia sin insuficiencia hepática. Asimismo, Cauli *et al.* (2007) demostraron que las ratas con APC presentaban una menor capacidad para aprender una tarea de discriminación condicional en la prueba del laberinto en Y, probablemente debido a la inflamación y la hiperamonemia, las cuales afectan la función de la vía glutamato–NO–cGMP en el cerebro. Por otro lado, el aumento en el porcentaje de número de entradas al brazo nuevo en el grupo AL podría ser indicativo de la disminución de dichas alteraciones a nivel cerebral.

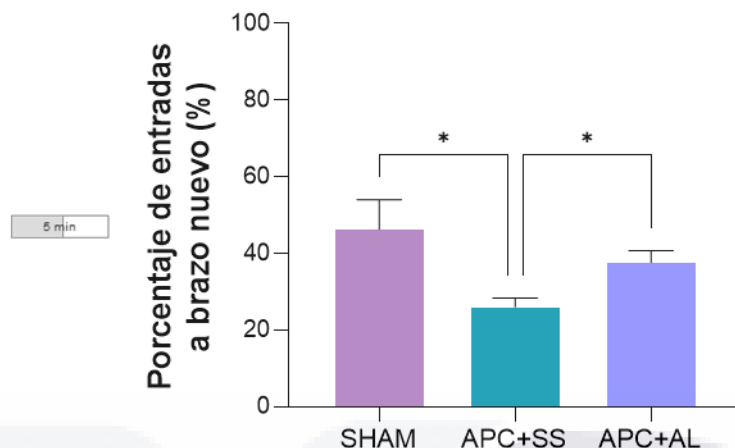


Figura 44. Prueba de laberinto en Y a los grupos SHAM, SS y AL. * $p < 0.05$, * $p < 0.001$ (ANOVA prueba Kruskal-Wallis), $n = 12-18$.

6.3.1.2 Laberinto en T elevado

La prueba del laberinto en T mostró una reducción significativa en la latencia de escape en el grupo sin tratamiento en comparación con el grupo tratado (APC+SS: $174.4 \pm 54.91s$ vs. APC+AL: $300 \pm 0.0s$), lo que sugiere una incapacidad para aprender la tarea. Por el contrario, el grupo APC+AL presentó un aumento en la latencia de escape en comparación con el grupo SHAM, lo que indica que el tratamiento con AL favoreció el aprendizaje durante la prueba (SHAM: $243.17 \pm 31.8s$ vs. APC+AL: $300 \pm 0.0s$). Este efecto también fue evidente al evaluar el porcentaje de sujetos que alcanzaron el criterio de 300s, donde las ratas tratadas con LA lograron una puntuación perfecta, superior tanto al grupo control como al grupo SS (SHAM: $66.67 \pm 21.08\%$, APC+SS: $20.0 \pm 20.0\%$, APC+AL: $100.0 \pm 0\%$) (Fig. 45). La reducción en la capacidad de aprendizaje ha sido previamente documentada en modelos de hiperamonemia, donde, en condiciones crónicas, se observa una disminución significativa en la potenciación a largo plazo y en la transmisión sináptica glutamatérgica, ambos procesos fundamentales para el aprendizaje y la memoria (Muñoz *et al.*, 2000; Hernández-Rabaza *et al.*, 2015; Méndez *et al.*, 2010). Además, en ratas con BDL, se ha reportado que los cambios en la actividad electrofisiológica de las neuronas piramidales en la región CA1 podrían estar

involucrados en las alteraciones cognitivas (Tahamtan *et al.*, 2017). Resulta interesante que, al igual que en la prueba del laberinto en Y, estas alteraciones no se observaron en el grupo tratado, el cual mostró una mejoría significativa en comparación con el grupo sin tratamiento. González-Torres *et al.* (2019) reportaron que la mejora en el aprendizaje de ratas envejecidas gonadectomizadas tratadas con GnRH está relacionada con un aumento en la expresión de espinofilina, lo que a su vez se asocia con un mayor número de contactos dendríticos.

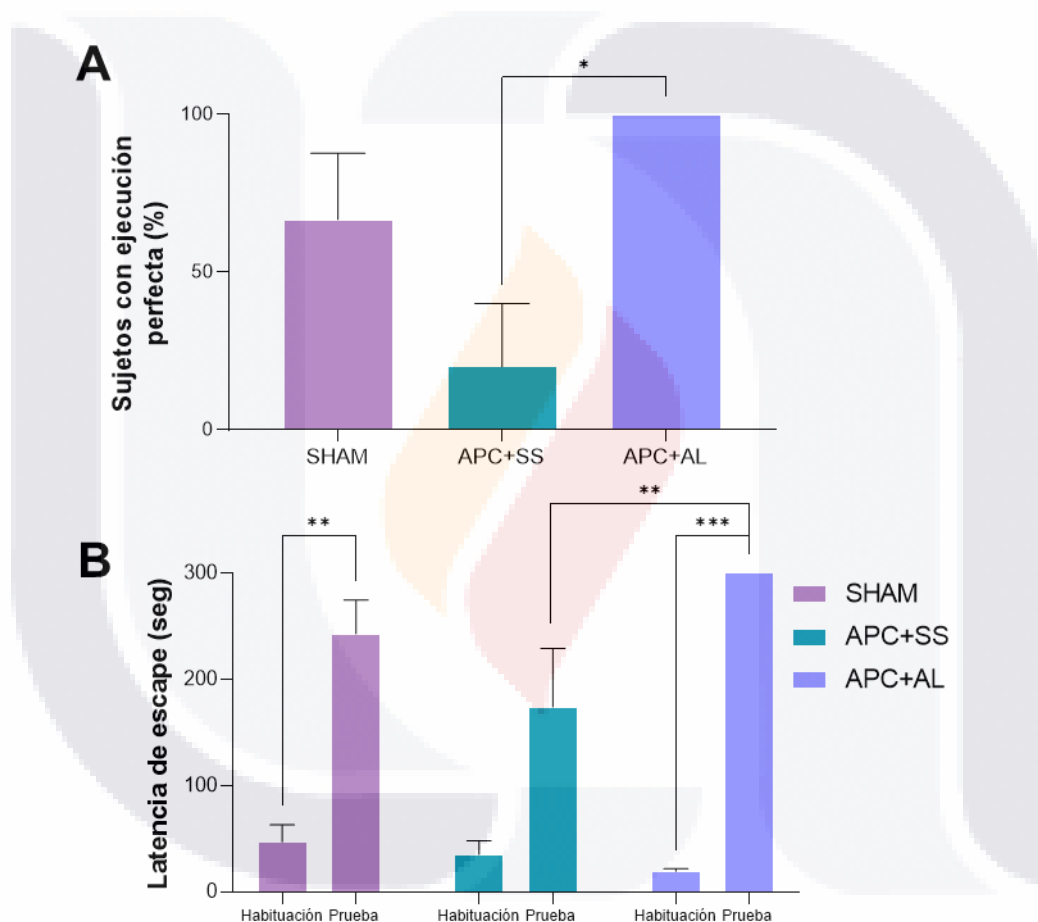


Figura 45. Prueba de laberinto en T elevado de los grupos SHAM, SS y AL. A) Latencia para explorar brazos abiertos * $p < 0.05$ (ANOVA prueba Tukey). B) Sujetos con ejecución perfecta ** $p < 0.001$ (ANOVA prueba Kruskal-Wallis), $n = 6$.

6.3.2 Histología de hipocampo

Se realizó un análisis cuantitativo de la densidad neuronal, el grosor de la capa y el área nuclear en las regiones CA1, CA3 y DG del hipocampo. La densidad de neuronas en las áreas CA1 y CA3 disminuyó en ambos grupos de APC en comparación con el control (SHAM CA1: 36.67 ± 2.82 , APC+SS CA1: 27.0 ± 2.74 , APC+SS: 29.33 ± 1.98 ; SHAM CA3: 22.33 ± 2.32 , APC+SS CA3: 14.83 ± 2.15 , APC+AL CA3: 16.17 ± 2.46). Sin embargo, en el área del DG del grupo con tratamiento el número de neuronas fue significativamente mayor que en el grupo SS, pero no diferente del grupo SHAM (SHAM: 102.08 ± 3.0 , APC+SS: 86.58 ± 4.77 , APC+AL: 101.83 ± 4.65).

Por otra parte, los resultados del área nuclear revelaron que no hay diferencias entre los tres grupos en las regiones CA1 y CA3. Por el contrario, en el DG del grupo tratado el área nuclear aumentó significativamente respecto al grupo no tratado, aunque no difirió del grupo control (SHAM: 46.89 ± 2.15 , APC+SS: 41.06 ± 1.24 , APC+AL: 49.5 ± 1.68). Finalmente, en el espesor de capa del área CA1 se observó una disminución significativa en el grupo APC+SS en comparación con el grupo SHAM (SHAM: 51.15 ± 2.37 , APC+SS: 42.73 ± 2.18). Cuando se analizó el CA3, se observó una reducción en ambos grupos de APC en comparación con el control (SHAM: 67.45 ± 3.87 , APC+SS: 53.90 ± 2.07 , APC+AL: 53.78 ± 3.9). Sin embargo, en el DG, se observó un aumento en el espesor de la capa en las ratas tratadas frente al grupo no tratado (APC+SS: 55.41 ± 1.07 , APC+AL: 61.86 ± 2.4).

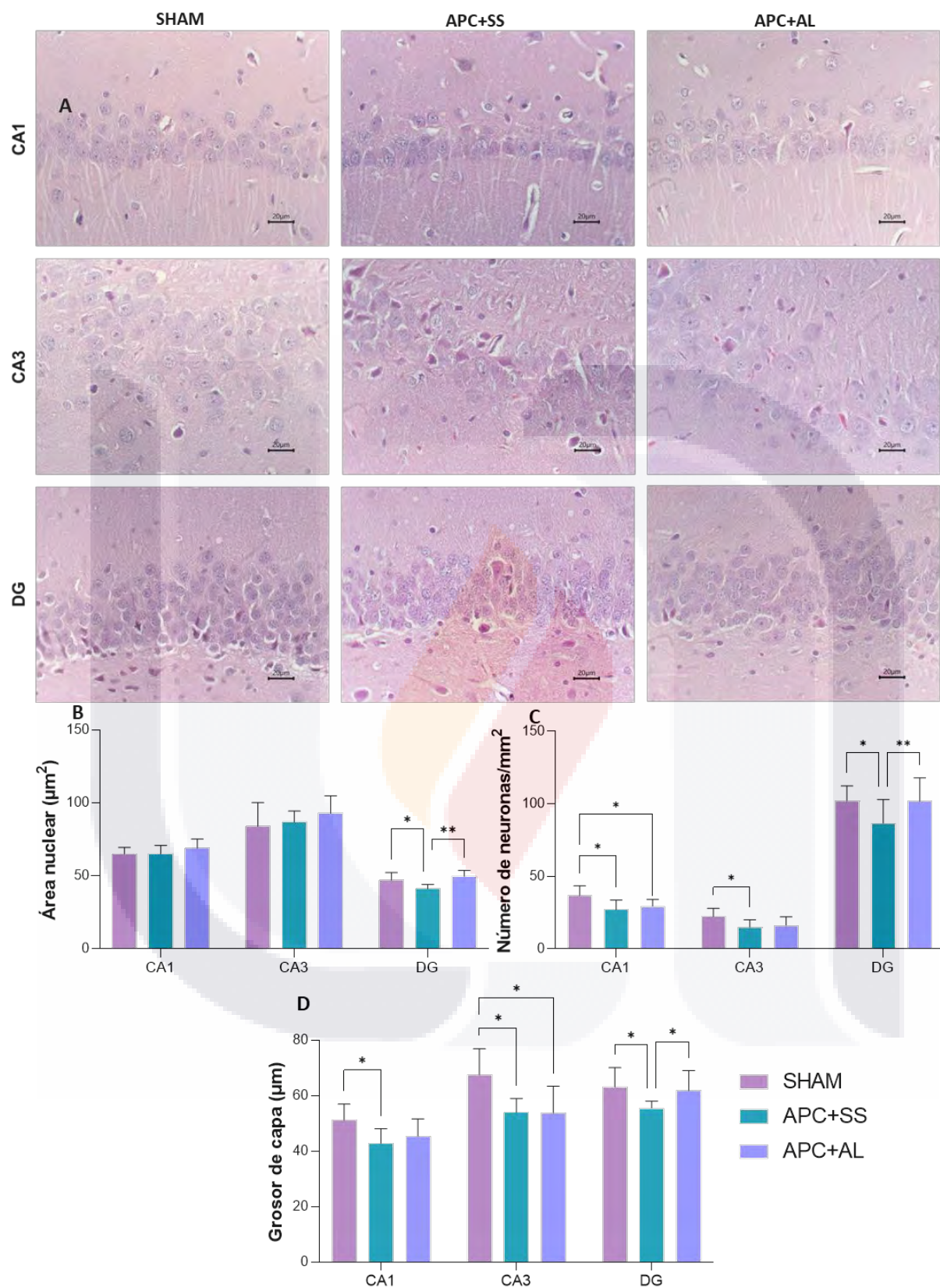


Figura 46. Análisis morfométrico de las áreas CA1, CA3 y GD del hipocampo de grupos experimentales,

Sorprendentemente, a pesar de las alteraciones observadas en las áreas CA1 y CA3, las ratas tratadas con AL mostraron una mejora significativa en las pruebas cognitivas en comparación con el grupo no tratado. Esta mejora parece estar asociada con un aumento en el número y tamaño de las neuronas granulares en la región del DG del hipocampo. Montoya-García *et al.* (2023) reportaron una densidad significativamente mayor de neuronas en el área del DG de ratas con lesión cerebral por isquemia-reperfusión tratadas con AL. De manera interesante, el área del DG se mantuvo intacta en el grupo APC+AL, lo cual es relevante dado que esta es la región donde ocurre la neurogénesis (Hainmueller y Bartos, 2020). Se ha descrito que el aprendizaje espacial regula la neurogénesis en el hipocampo adulto al controlar la sobrevivencia y el desarrollo de neuronas recién nacidas (Tronel *et al.*, 2010). Por lo tanto, el efecto de AL sobre la memoria espacial y el aprendizaje podría estar vinculado con la proliferación y supervivencia de estas neuronas. Además, es probable que el análogo de GnRH disminuya la apoptosis en el DG del hipocampo, lo que contribuiría a la mejora cognitiva observada en las ratas APC tratadas con el agonista de GnRH (Chu *et al.*, 2008).

6.3.3 Evaluación de marcadores de integridad neuronal en hipocampo

Para evaluar el efecto del tratamiento con AL sobre las neuronas del hipocampo, se analizó la expresión de espinofilina, NF200 y tubulina. El análisis de la expresión de espinofilina mostró una disminución significativa en el grupo APC+SS respecto al control. No se observaron diferencias en el grupo APC+AL con los demás grupos; sin embargo, se observó una tendencia al aumento de la expresión en comparación con el grupo no tratado (APC+SS: $45.83 \pm 9.36\%$ APC+AL: $67.38 \pm 8.87\%$) (Fig. 47). Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias que emergen de los ejes dendríticos y reciben la mayoría de la entrada excitatoria en el sistema nervioso central (Feng *et al.*, 2000). La espinofilina, también conocida como neurabin II, es una proteína que se une

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

a la actina y a la fosfatasa de proteínas-1 (PP1), y se encuentra altamente concentrada en las espinas dendríticas. Su localización y propiedades funcionales sugieren una posible conexión entre la transmisión sináptica y las alteraciones en la estructura y función de las espinas dendríticas (Grossman *et al.*, 2004). En este estudio, observamos una disminución significativa en la expresión de espinofilina en ratas con APC+SS en comparación con el grupo control.

La hiperamonemia se ha asociado con una reducción en la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales del CA1 del hipocampo en ratas con ligadura de conductos biliares (Chen *et al.*, 2014). La pérdida de actividad sináptica ha sido vinculada con la desaparición de espinas dendríticas y, en consecuencia, con un deterioro en los procesos de aprendizaje (Feng *et al.*, 2000). Además, los receptores NMDA y AMPA de glutamato están implicados en la plasticidad sináptica, esencial para la memoria y el aprendizaje. La desregulación de estos receptores puede inducir deterioro cognitivo y pérdida de memoria (Llansola *et al.*, 2013). Durante episodios de aumento de amonio se han documentado alteraciones en la transmisión de glutamato (Llansola *et al.*, 2005, 2013; Cauli *et al.*, 2009). Por otro lado, Monfort *et al.* (2007) observaron una reducción en la activación de los receptores NMDA y AMPA en cortes de hipocampo de ratas con APC, lo que llevó a una alteración en la neurotransmisión y en la comunicación neuronal. Así, la disminución de la expresión de espinofilina en el hipocampo de ratas con APC pueden atribuirse a una alteración en la transmisión sináptica, lo que contribuye a las disfunciones cognitivas observadas en las pruebas del laberinto en Y y laberinto elevado en T.

Por otro lado, aunque no se observaron diferencias significativas entre las ratas APC tratadas con AL y las no tratadas, se detectó una tendencia hacia un aumento en la expresión de espinofilina. González-Torres *et al.* (2019) reportaron que la mejora del aprendizaje en ratas gonadectomizadas tratadas con GnRH está asociada con un mayor

número de contactos dendríticos y un aumento en la expresión de esta proteína. Investigaciones previas con cultivos de neuronas de médula espinal de embriones de ratas demostraron que la incubación con GnRH promovió un mayor número de contactos neuríticos, consistente con el aumento en la expresión de espinofilina (Quintanar *et al.*, 2016). Además, se ha demostrado que, a través de la activación de su receptor en cultivos primarios de células hipocampales, la GnRH estimula la expresión de dos genes clave en la plasticidad neuronal: sinaptofisina y espinofilina (Schang *et al.*, 2011). Esto resulta en un incremento en la densidad de espinas dendríticas y en una mayor excitación neuronal mediada por los receptores ionotrópicos de glutamato. Diversas evidencias sugieren que la GnRH modula la función y plasticidad del hipocampo, ya que esta estructura posee la mayor densidad de receptores GnRHR en el cerebro (Jennes *et al.*, 1988). Por lo tanto, la GnRH puede ejercer efectos neuromoduladores sobre el hipocampo (Ferris *et al.*, 2015).

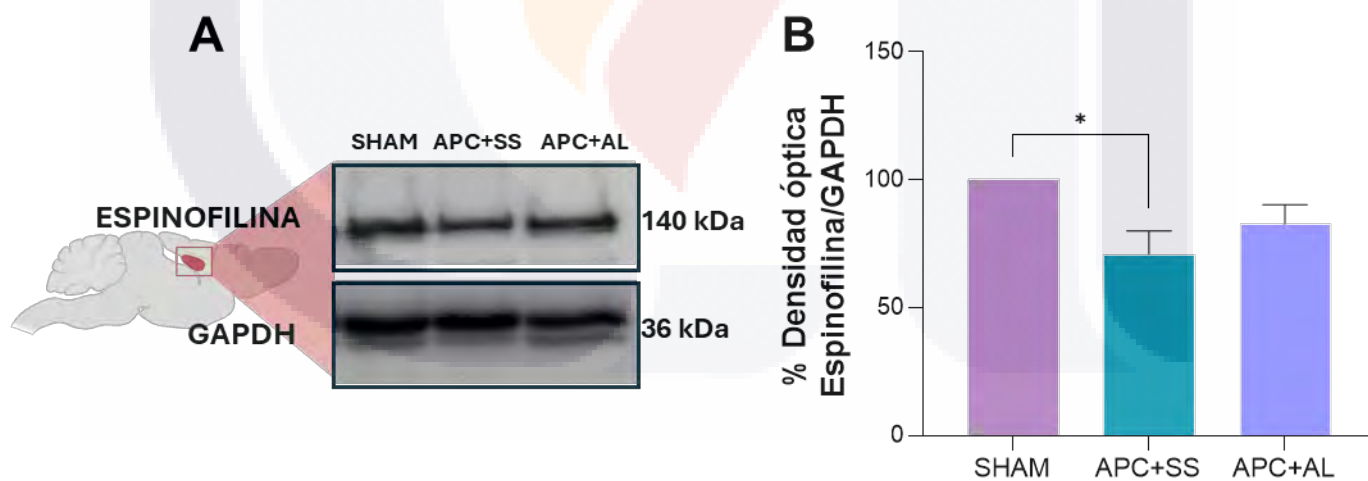


Figura 47. Expresión de espinofilina en ratas SHAM, SS y AL ($n=5$). A) Expresión en hipocampo B) Porcentaje de densidad óptica respecto a GAPDH. Los resultados se muestran como media y SEM. * $p<0,05$, ** $p<0,001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

Por otro lado, la expresión de NF200 en las ratas tratadas con AL mostró un aumento significativo en comparación con el grupo no tratado, pero no presentó diferencias con el control (APC+SS: $32.26 \pm 9.3\%$, APC+AL: $65.25 \pm 7.79\%$) (Fig. 48). NF200 es crucial para las interacciones con los microtúbulos, la asociación con otras proteínas y el transporte axonal. Las alteraciones en estos neurofilamentos pueden modificar la estructura del citoesqueleto axonal, lo que contribuye al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Porseva *et al.*, 2013).

En nuestro estudio, se observó una disminución en la expresión de NF200 en el hipocampo de ratas con APC sin tratamiento. Estos resultados sugieren cambios en la morfología neuronal y en la extensión de las neuritas, factores que dependen de la integridad del citoesqueleto. Hallazgos similares fueron reportados en ratas con ligadura parcial de la vena porta, que presentaron una reducción significativa en la expresión de NF200 en CA1, lo cual indica una disminución en las neuritas (Tallis *et al.*, 2014).

Por el contrario, los animales APC tratados con AL mostraron un aumento significativo en la expresión de NF200 en comparación con los no tratados. Estudios previos han demostrado que la GnRH incrementa la expresión de NF200 y NF68 en neuronas corticales y de la médula espinal en embriones de ratas, lo que provoca un aumento tanto en el número como en la longitud de las neuritas (Quintanar y Salinas, 2008; Quintanar *et al.*, 2016). Además, se ha confirmado una expresión elevada de NF200 en diversos modelos de lesión tratados con GnRH o acetato de leuprolida, como lesión de médula espinal, encefalomielitis autoinmune experimental e isquemia cerebral por reperusión (Calderón-Vallejo y Quintanar, 2012; Guzmán-Soto *et al.*, 2012; Montoya-García *et al.*, 2023).

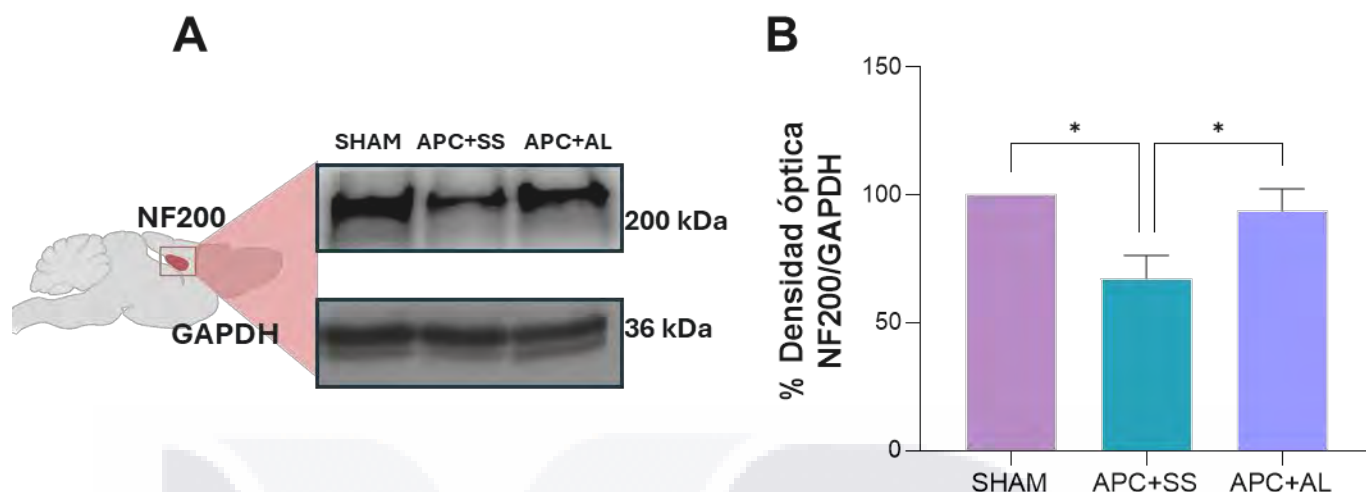


Figura 48. Expresión de espinofilina en ratas SHAM, SS y AL (n=5). A) Expresión en cerebelo B) expresión en hipocampo. Los resultados se muestran como media y SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

El análisis de la expresión de tubulina demostró una disminución significativa en ambos grupos lesionados. No hubo diferencias en el AL y SS; sin embargo, observamos una tendencia a aumentar la expresión de tubulina en comparación con el grupo no tratado (SHAM: 43182 ± 1477 , APC+SS: 27321 ± 2879 , APC+AL: 30544 ± 916), (Fig.49).

Este resultado coincide con lo observado en el marcador neuronal NF200, ya que la menor expresión de ambos marcadores en ratas con APC sugiere alteraciones en la integridad del citoesqueleto, cambios morfológicos y modificaciones en la extensión de las fibras axónicas. Además, el incremento en la expresión de tubulina en el giro dentado del grupo APC+AL refuerza esta asociación con NF200. Martínez-Moreno *et al.* (2024) reportaron un aumento en la expresión de tubulina en ratas con lesión medular tratadas con GnRH. Estos hallazgos sugieren que la GnRH y su análogo AL podrían actuar como factores neurotróficos, favoreciendo la expresión de neurofilamentos y tubulina.

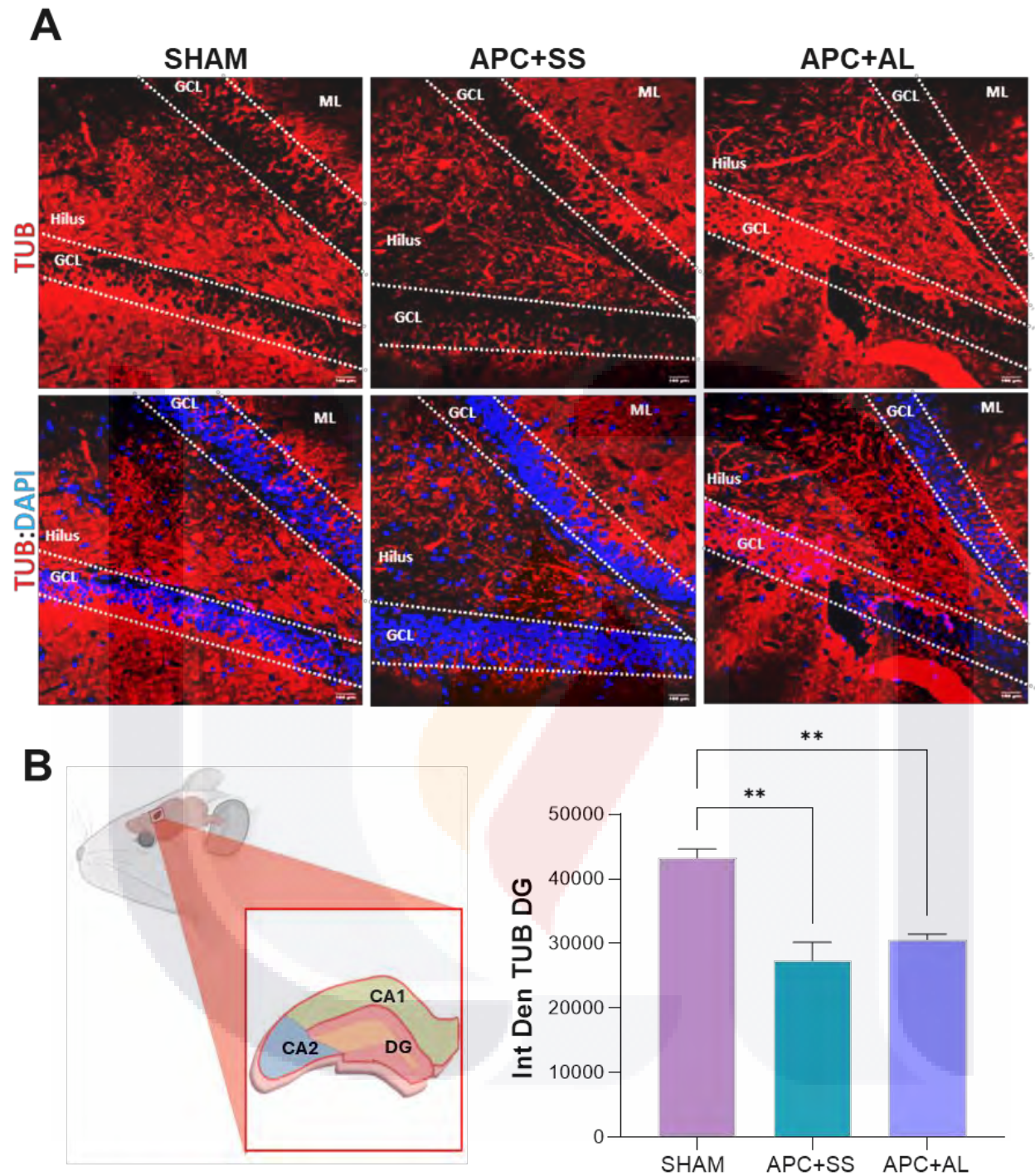


Figura 49. Expresión de tubulina en giro dentado de ratas SHAM, SS y AL ($n=3$). Los resultados se muestran como densidad integrada y SEM. $*p<0,05$, $**p<0,001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

6.3.4 Evaluación de marcadores de gliosis reactiva en hipocampo

Al analizar la expresión de GFAP en hipocampo por Western Blot se observó un aumento significativo en el grupo APC+SS, mientras que en el grupo APC+AL se observó una reducción en comparación con el grupo APC+SS (APC+SS: $140.7 \pm 17.23\%$, APC+AL: $92.85 \pm 11.73\%$) (Fig. 50). El mismo efecto se obtuvo al analizar la expresión de dicha proteína en el *hilus* del giro dentado por la técnica de inmunofluorescencia, en donde se observó un aumento significativo en el grupo SS en comparación con el control y AL (SHAM: 22843 ± 2551 , APC+SS: 39981 ± 7954 , APC+AL: 22629 ± 2217), (Fig.51).

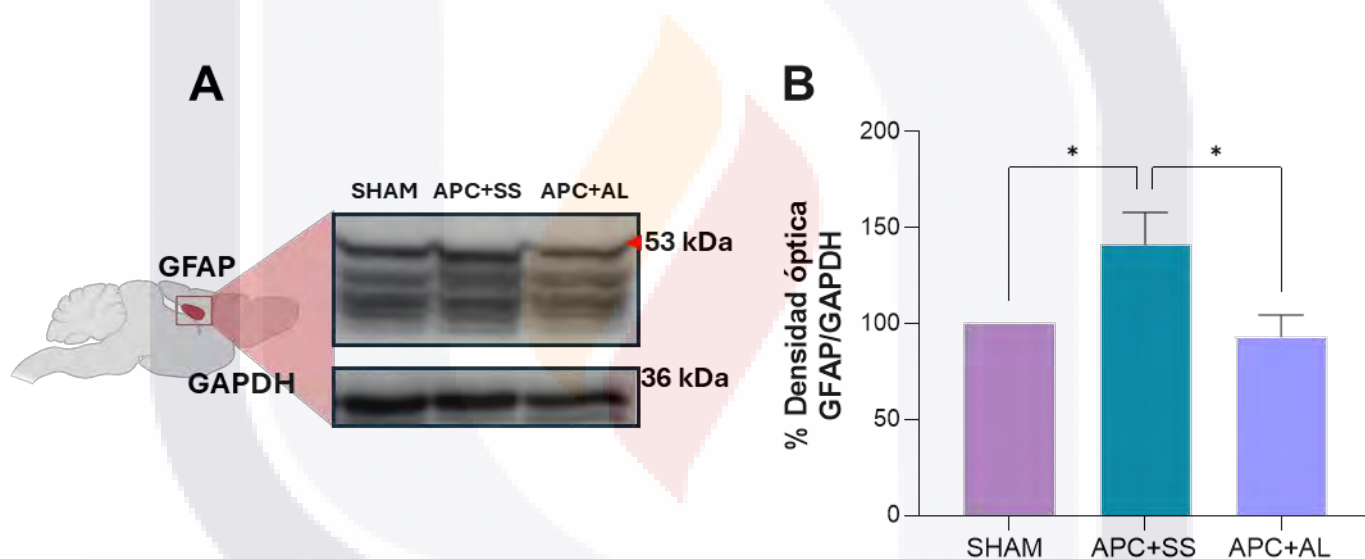


Figura 50. Expresión de GFAP en ratas SHAM, SS y AL ($n=5$). A) Expresión en hipocampo B) porcentaje de densidad óptica respecto a GAPDH. Los resultados se muestran como media y SEM. * $p<0,05$, ** $p<0,001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

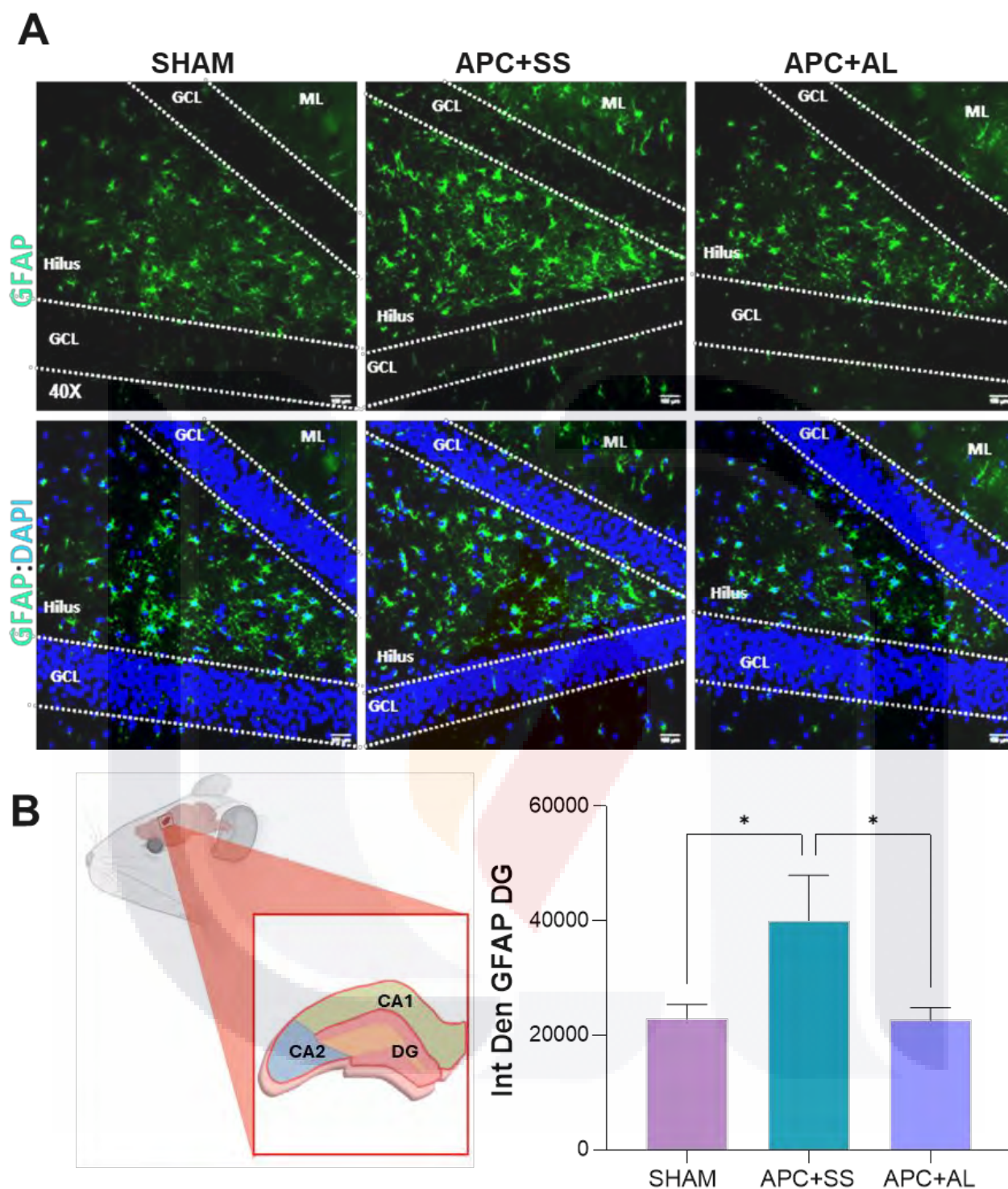


Figura 51. Expresión de GFAP en giro dentado de ratas SHAM, SS y AL ($n=3$). Los resultados se muestran como densidad integrada y SEM. $*p<0,05$, $**p<0,001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

Los astrocitos desempeñan un papel fundamental en el soporte estructural del tejido y en el mantenimiento de la homeostasis. Un marcador ampliamente utilizado para identificar astrocitos es GFAP, una proteína del citoesqueleto intermedio presente en la mayoría de los astrocitos del sistema nervioso central. Su función principal es proporcionar soporte mecánico y contribuir a la integridad de la barrera hematoencefálica (Jurga *et al.*, 2021). La sobreexpresión de GFAP se ha asociado con la astrogliosis reactiva, una alteración característica de la morfología y función de los astrocitos observada en diversos trastornos neurológicos, como neurotrauma, accidente cerebrovascular isquémico y enfermedades neurodegenerativas (Pekny *et al.*, 2016). La astrogliosis también ha sido reportada en pacientes con EH y en ratas con derivación portosistémica (Agarwal y Mais, 2019; Cruz y Duffy, 1983).

Los resultados aquí presentados muestran un aumento en la expresión de GFAP en el grupo APC+SS en comparación con el grupo control y el grupo APC+AL. Hallazgos similares se han observado en ratas con hiperamonemia, en donde la inmunodetección de GFAP en la región CA1 del hipocampo reveló un incremento en su expresión en comparación con el grupo SHAM (França *et al.*, 2019). Además, un análisis de la morfología astrocitaria en ratas con ligadura parcial de la vena porta mostró que los astrocitos positivos para GFAP en la región CA1 del hipocampo presentaban cuerpos celulares agrandados y prolongaciones más tortuosas y gruesas, lo que indica una reacción astrogliótica (Tallis *et al.*, 2014). Estos hallazgos sugieren que el aumento de GFAP en el hipocampo de las ratas APC+SS podría indicar un estado de astrogliosis reactiva.

Por otro lado, las ratas APC tratadas con AL mostraron una reducción en la expresión de GFAP en comparación con las ratas no tratadas. De manera similar, se ha reportado una disminución en GFAP en ratas con lesión medular tratadas con GnRH, donde se observó una reducción en la inmunorreactividad de GFAP en tejido medular, lo que

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sugiere una menor actividad glial (Martínez-Moreno *et al.*, 2023). Estudios previos han demostrado que la supresión de GFAP en modelos animales reduce los procesos de gliosis reactiva y favorece la neurogénesis en el hipocampo, tanto en condiciones normales como tras una lesión, lo que indica que GFAP desempeña un papel modulador en la regulación astrocitaria de la neurogénesis (Wilhelmsson *et al.*, 2012). En consecuencia, la reducción en la expresión de GFAP inducida por el tratamiento con AL podría contribuir a la regulación de la neurogénesis en el hipocampo de ratas APC, lo que potencialmente favorecería la mejora del desempeño cognitivo.

En modelos de encefalopatía hepática (EH), se ha observado un aumento en la expresión de Iba1 en el hipocampo, lo que indica activación microglial y un estado de neuroinflamación. Esta activación se ha relacionado con deterioro cognitivo, particularmente con déficits en la memoria de trabajo a corto plazo. Por ejemplo, en un modelo de EH inducido por tioacetamida (TAA) en ratas, se reportó una sobreexpresión de Iba1 en el hipocampo, la cual se correlacionó con alteraciones cognitivas (Shao *et al.*, 2020). De manera similar, en un modelo de EH por ligadura del conducto biliar (BDL) en ratones, análisis de inmunofluorescencia mostraron una expresión elevada de Iba1 en el hipocampo, acompañada de déficits en memoria y aprendizaje (Yang *et al.*, 2024). Estos hallazgos sugieren que la activación microglial, evidenciada por el incremento de Iba1 en el hipocampo, desempeña un papel clave en la disfunción cognitiva observada en la EH.

Asimismo, se ha demostrado que el AL suprime la expresión de marcadores de activación glial (Iba1, CD86, CD206, vimentina y GFAP) en lesiones de la médula espinal, favoreciendo la recuperación sensorial (Martínez-Moreno *et al.*, 2023). Además, las propiedades antiinflamatorias del AL refuerzan aún más su potencial terapéutico. En modelos de encefalopatía hipóxico-isquémica, Pedroza-García (2023)

demostró que el AL reduce la expresión de citocinas proinflamatorias en hipocampo (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , CXCL-1) durante las fases agudas de la lesión.

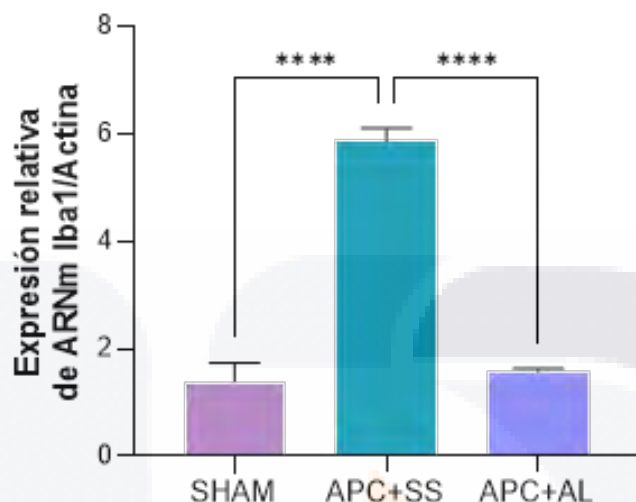


Figura 52. Expresión relativa de ARNm de *Iba1* en ratas SHAM, SS y AL ($n=3$). Los resultados como expresión relativa con respecto a actina y SEM. * $p<0,05$, ** $p<0,001$, **** $p<0,00001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

6.3.5 Evaluación de marcadores de inflamación en hipocampo

Se observó un aumento significativo en la expresión de IL1 β en hipocampo del grupo de APC+SS (1.07 ± 0.18) en comparación con el control SHAM (1.75 ± 0.18). Adicionalmente, en el grupo de APC+AL (1.05 ± 0.2) no se observaron diferencias contra el grupo control, pero si una disminución significativa en comparación con el grupo SS. Por otro lado, al analizar la expresión de TNF α se apreció un aumento en el grupo de APC+SS (3.8 ± 1.7) en comparación con el control SHAM (1.5 ± 0.5). En cuanto al grupo de APC+AL (2.1 ± 1.2) no se observaron diferencias contra el grupo control y SS, pero si una tendencia a la disminución en comparación con el grupo SS.

Al examinar la expresión de iNOS en hipocampo del grupo de APC+SS (4.1 ± 0.5) se observó un aumento significativo en comparación con el control SHAM

(1.1±0.2). por otro lado, en el grupo de APC+AL (1.1±0.2) no se observaron diferencias contra el grupo control, pero si una disminución significativa en comparación con el grupo SS. De igual forma al analizar la expresión de IL6 en se apreció un aumento en el grupo de APC+SS (3.9±0.14) en comparación con el control SHAM (1.4±0.06). por otro lado, en el grupo de APC+AL (1.54±0.06) no se observaron diferencias contra el grupo control, pero si una disminución significativa en comparación con el grupo SS. Diversos estudios han reportado que la hiperamonemia crónica induce neuroinflamación en el hipocampo, caracterizada por la activación de microglia y astrocitos, así como un aumento en las citocinas proinflamatorias como IL6, IL1 β , TNF α e IL4, junto con una reducción en IL-10 (Dadsean *et al.*, 2016, Cabrera *et al.*, 2019).

Por otro lado, la disminución en la expresión de las citocinas IL1 β , TNF α , IL6 e iNOS en hipocampo de ratas con APC tratadas con AL podría ser indicativo de su efecto antiinflamatorio. En un modelo de encefalopatía hipóxico-isquémica, se demostró que el tratamiento con AL redujo la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , CXCL-1) en el hipocampo de ratas lesionadas durante la fase aguda del daño. Pedroza-García *et al.* (2023) atribuyeron este efecto a la capacidad inmunomoduladora del AL, dado que diversas células del sistema inmunológico, incluidas la microglia, los monocitos/macrófagos y los linfocitos, expresan el receptor de GnRH (GnRH-R). Asimismo, Min *et al.* (2009) demostraron el efecto inmunomodulador de la GnRH en macrófagos peritoneales activados con lipopolisacárido/IFN- γ , observando una reducción en la producción de óxido nítrico mediante la inhibición de las enzimas óxido nítrico sintasa inducible y ciclooxigenasa 2. Además, evidenciaron un aumento en el calcio citosólico de los macrófagos, acompañado de una menor activación de la vía de NF- κ B.

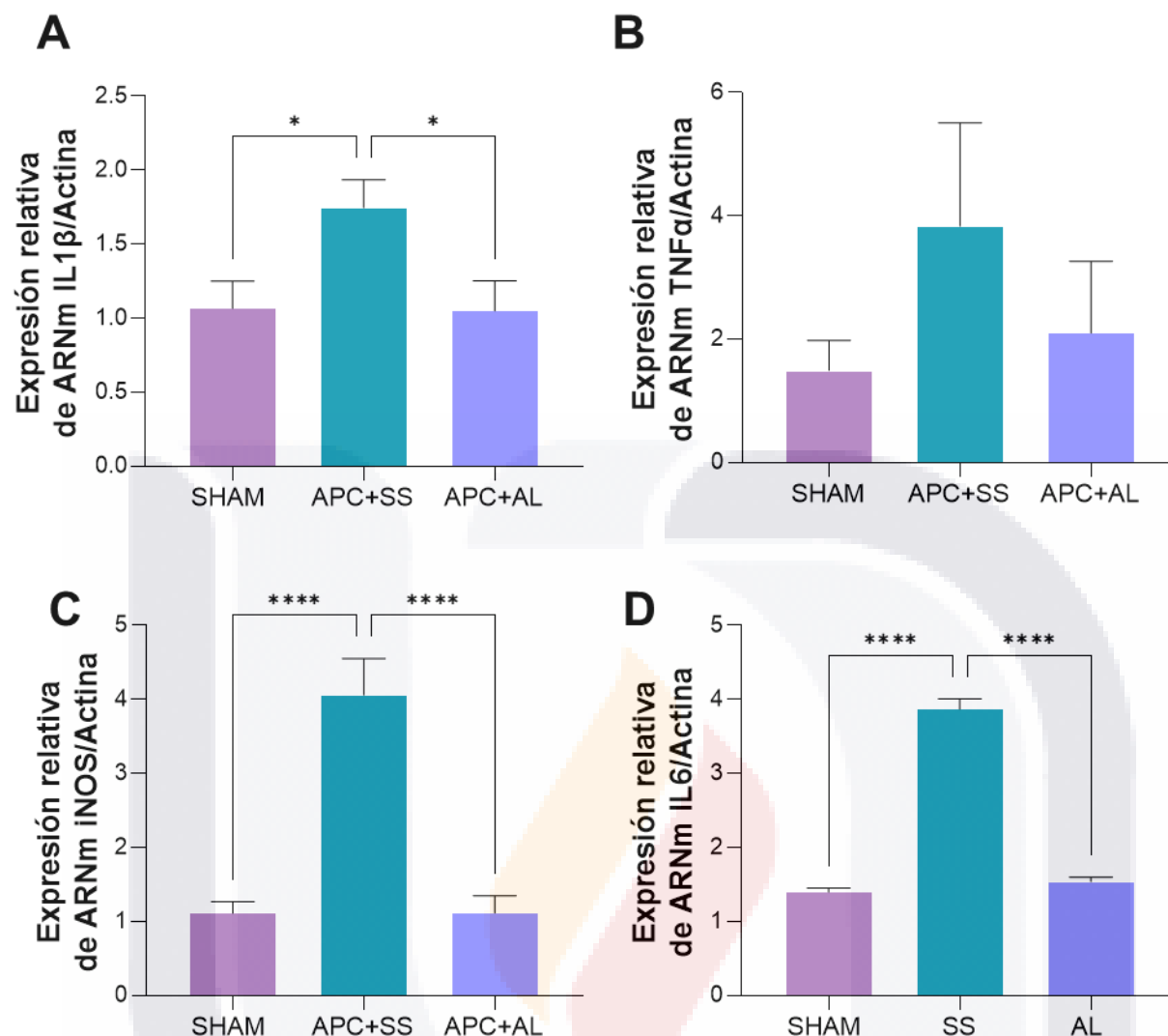


Figura 53. Expresión relativa de ARNm de TNF α , IL-6, IL-1 β e iNOS en ratas SHAM, SS y AL (n=3). Los resultados como expresión relativa con respecto a actina y SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, **** $p < 0,00001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

Adicionalmente al evaluar las citocinas involucradas con procesos antiinflamatorios en hipocampo se observó una disminución en el grupo APC+SS de IL4 e IL10 (1.26 ± 0.34 y 0.77 ± 0.18 , respectivamente) en comparación con el control (2.05 ± 0.48 y 1.03 ± 0.2 , sin embargo, no resulto significativamente diferente. Por lo contrario, al analizar APC+AL se encontró un aumento en ambas interleucinas comparación del grupo SS, siendo significativo para IL10 (1.80 ± 0.28 y 1.38 ± 0.19). Finalmente, no se encontraron diferencias en la expresión de ARNm de TGF β .

El aumento en la expresión de IL-4 e IL-10 en el grupo AL podría indicar una mejora en la respuesta inflamatoria. Estas interleucinas desempeñan un papel clave en la regulación de la inflamación en el hipocampo, una región esencial para funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje. Por un lado, la IL-4 interactúa con sus receptores en la microglia, promoviendo un fenotipo antiinflamatorio que reduce la producción de citocinas proinflamatorias y estimula la liberación de factores neurotróficos, favoreciendo la supervivencia y función neuronal. Este mecanismo contribuye a la protección neuronal y al mantenimiento de la homeostasis en el hipocampo.

Por otro lado, la IL-10 inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β , además de suprimir la actividad de la microglia y los macrófagos. Esto limita la liberación de mediadores inflamatorios que podrían dañar las neuronas, previniendo la neuroinflamación crónica y protegiendo las funciones cognitivas (Rufín-Gómez *et al.*, 2024). Este efecto antiinflamatorio coincide con la disminución de TNF- α e IL-1 β observada en el hipocampo, ya que la IL-10 mostró un aumento significativo en el grupo AL, incluso en comparación con el grupo SHAM. Esto sugiere que el AL podría estar induciendo un ambiente antiinflamatorio que favorece la mejora de las funciones cognitivas en ratas con EH.

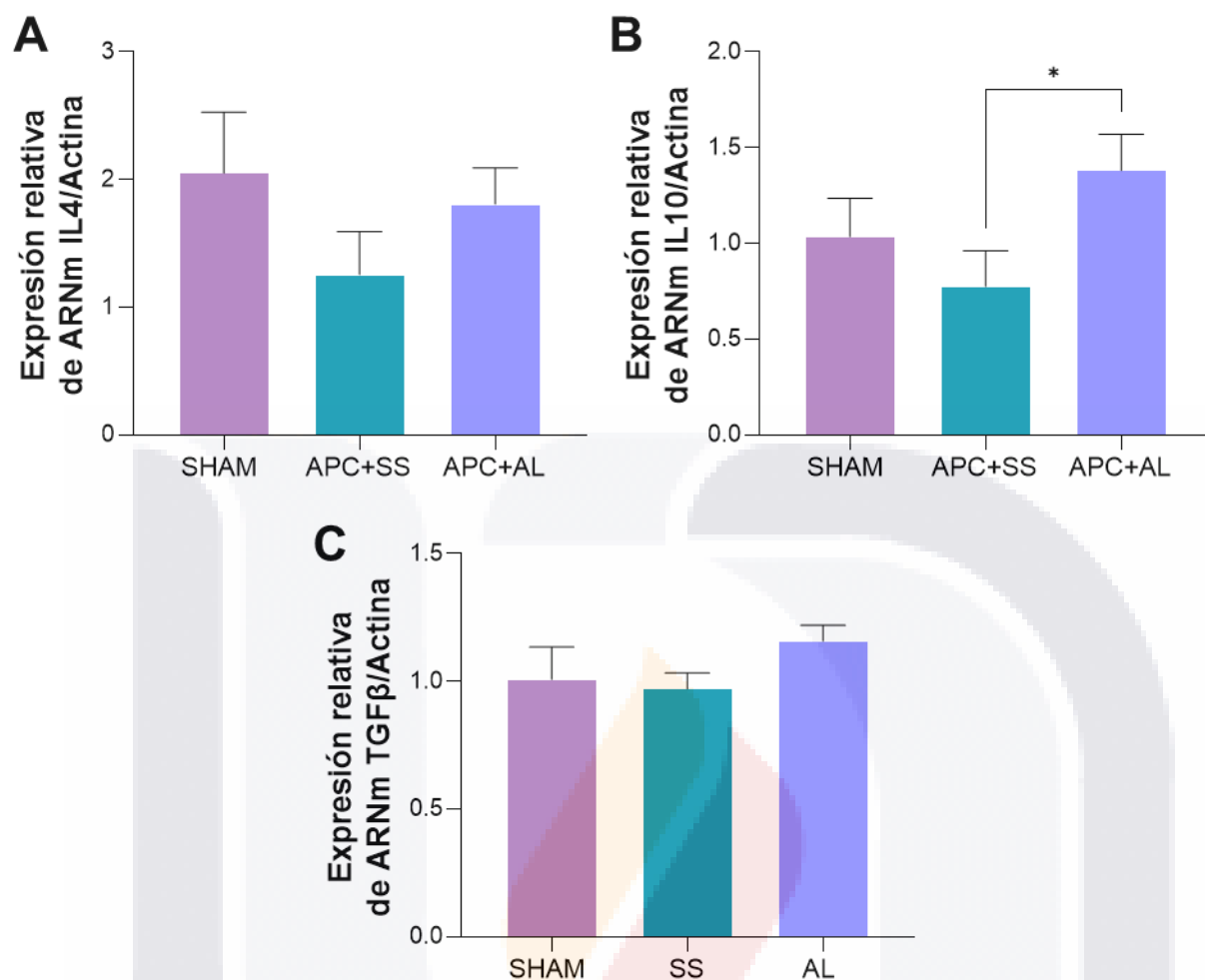


Figura 54. Expresión relativa de ARNm IL4, IL10 y TGFβ en ratas SHAM, SS y AL (n=3). Los resultados como expresión relativa con respecto a actina y SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, **** $p < 0,00001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

6.3.6 Evaluación de factores neurotróficos en hipocampo

Se evaluó la expresión de ARNm de los factores neurotróficos BDNF y NGF en el hipocampo, observándose una disminución de la expresión del primero en el grupo APC+SS (1.02 ± 0.03) en comparación con APC+AL (1.18 ± 0.04) y SHAM (1.25 ± 0.05). Este factor neurotrófico está estrechamente relacionado con el aprendizaje y la memoria, favoreciendo la consolidación de recuerdos a largo plazo. Además, influye en diversos procesos celulares en el hipocampo, incluyendo la

proliferación, supervivencia y diferenciación neuronal (Lee *et al.*, 2002). Se ha reportado una reducción en sus niveles en enfermedades neurodegenerativas como la esquizofrenia y el Alzheimer (Kim *et al.*, 2017). Por otra parte, su disminución en el hipocampo durante la hiperamonemia ha sido previamente documentada en modelos de encefalopatía hepática inducida con tioacetamida (França *et al.*, 2019). De manera similar, esta alteración en su secreción podría contribuir al deterioro de la memoria observado en pacientes con esta patología. En contraste, el aumento registrado en el grupo tratado con AL podría estar directamente relacionado con la mejora cognitiva observada en estas ratas, así como con el incremento en el número de neuronas en el giro dentado.

Por otro lado, al evaluar la expresión de ARNm de NGF, observamos que, al igual que en el cerebelo, la expresión de esta neurotrofina aumentó en el grupo APC+SS (1.83 ± 0.08) en comparación con SHAM (0.99 ± 0.09) y APC+AL (1.38 ± 0.19). Este hallazgo es particularmente interesante, ya que se ha reportado una disminución en la expresión de NGF en el hipocampo de ratones con encefalopatía hepática inducida por TAA (Oliveira *et al.*, 2022). Por lo tanto, su sobreexpresión podría estar relacionada con un mecanismo compensatorio.

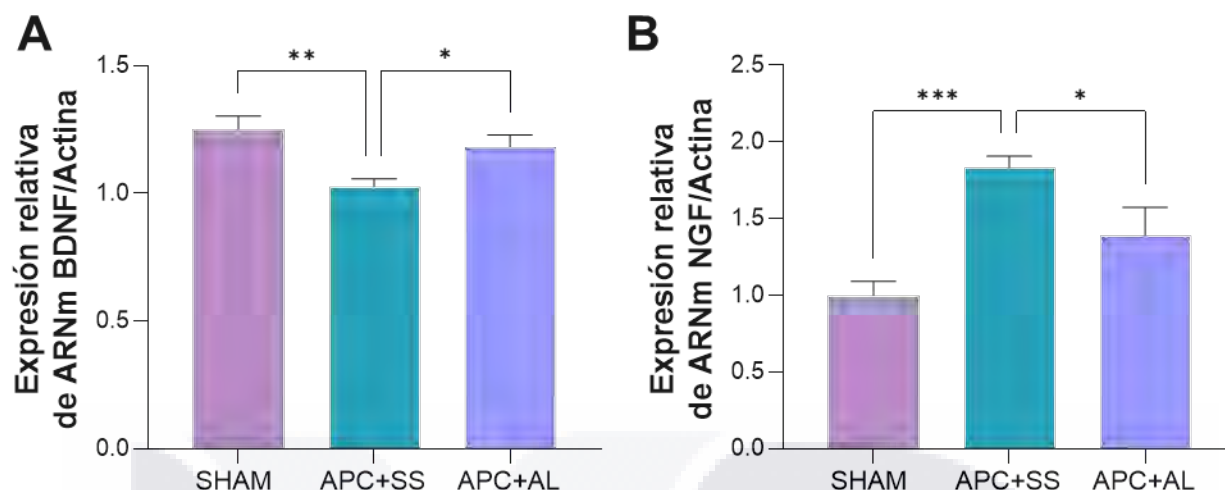


Figura 55. Expresión relativa de ARNm de BDNF y NGF en ratas SHAM, SS y AL ($n=3$). Los resultados como expresión relativa con respecto a actina y SEM. $*p<0,05$, $**p<0,001$, $***p<0,00001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc

6.3.7 Evaluación de marcadores involucrados en proceso de neurotransmisión en hipocampo

La evaluación de sinaptofisina en el hipocampo mostró una disminución significativa en su inmunodetección en el grupo APC+SS (36696 ± 1491) en comparación con APC+AL (40535 ± 607) y SHAM (49104 ± 667). La sinaptofisina, una glucoproteína de las vesículas sinápticas involucrada en la liberación de neurotransmisores es un marcador clave de la integridad sináptica. Su reducción indica una pérdida de sinapsis y se ha asociado con disfunción de la memoria en la enfermedad de Alzheimer, así como con el deterioro cognitivo relacionado con la edad (Zhang *et al.*, 2014). En modelos previos de EH inducida por TAA, se ha reportado una disminución en la expresión de proteínas presinápticas en el hipocampo, lo que sugiere alteraciones en la neurotransmisión que podrían contribuir a las anomalías neuroconductuales observadas (França *et al.*, 2019; El-Mansoury *et al.*, 2023). En este estudio, la recuperación en la expresión de

sinaptofisina en el grupo tratado con AL se correlacionó con la mejora en el desempeño cognitivo en las pruebas de laberinto en T elevado y laberinto en Y, lo que refuerza el papel neurotrófico de AL en la preservación de la plasticidad sináptica.

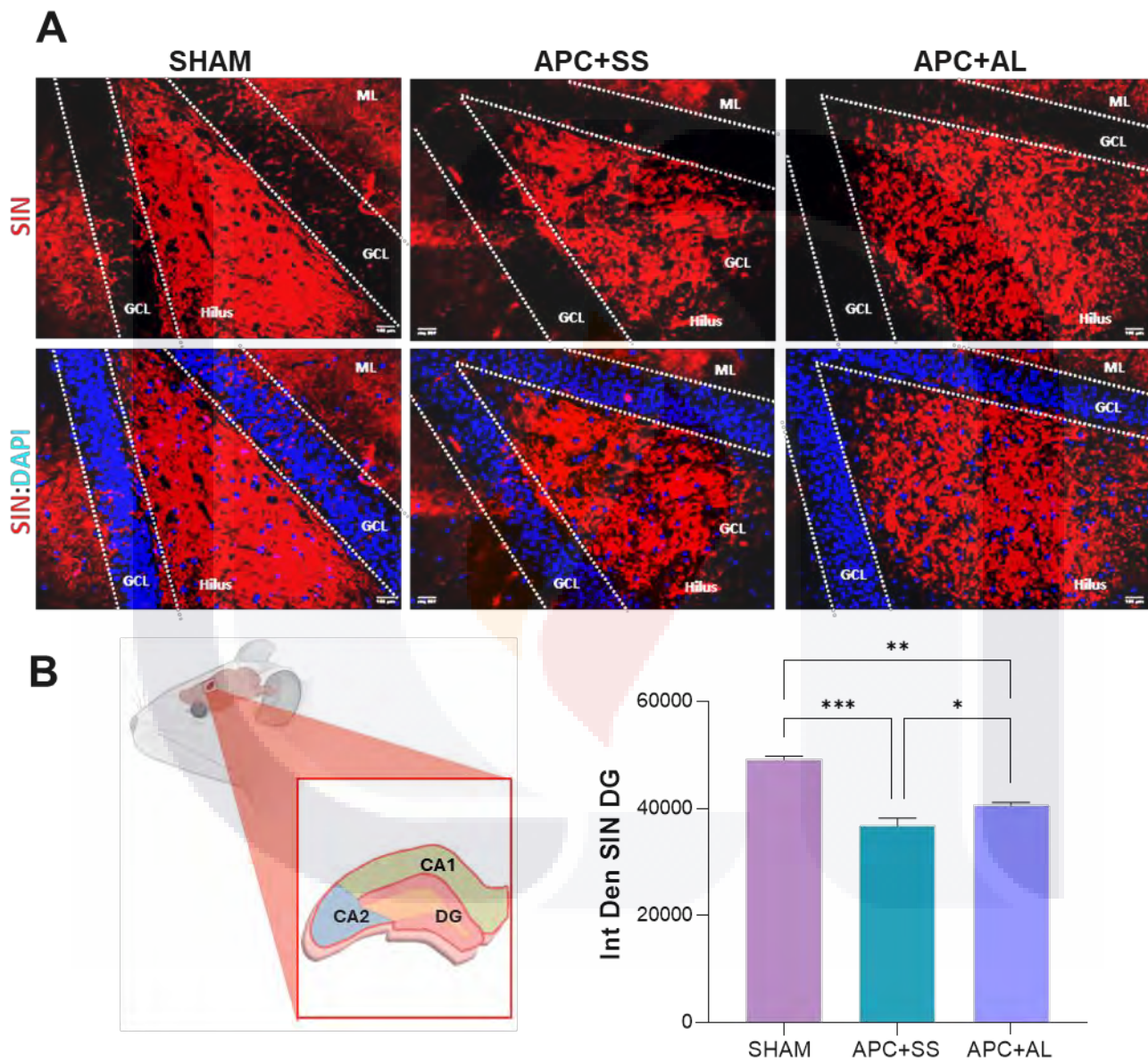
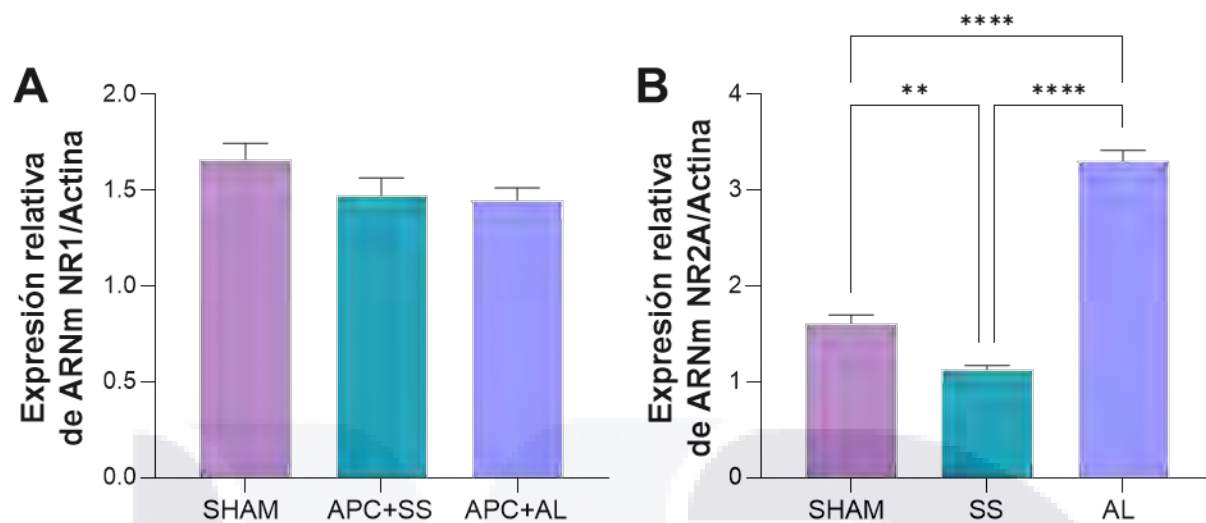


Figura 56. Expresión de sinaptofisina en giro dentado de ratas SHAM, SS y AL (n=3). Los resultados se muestran como densidad integrada y SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.

La expresión del ARNm de la subunidad NR1 no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales (SHAM: 1.66 ± 0.21 , APC+SS: 1.47 ± 0.23 y APC+AL: 1.44 ± 0.15). Sin embargo, la expresión del ARNm de la subunidad NR2A presentó una disminución significativa en el grupo APC+SS (1.13 ± 0.05) en comparación con SHAM (1.60 ± 0.23) y APC+AL (3.3 ± 0.11). Un hallazgo relevante fue el aumento en la expresión de NR2A en el grupo tratado con AL, no solo en comparación con el grupo sin tratamiento, sino también en relación con el grupo SHAM. Se ha reportado que tanto el aumento como la disminución en la expresión hipocampal de las subunidades del receptor NMDA pueden inducir déficits en aprendizaje y memoria, resaltando la importancia del equilibrio entre NR2A y NR2B en la plasticidad sináptica. Estudios previos han demostrado que el daño hepático leve se asocia con una reducción en la expresión de NR1 y NR2A en la membrana del hipocampo (Leone *et al.*, 2022). Además, Louveau *et al.* (2013) reportaron que ratones sin la proteína CD3 ζ presentan una menor localización postsináptica de NR2A y déficits en memoria espacial en pruebas de Barnes y NOL, lo que respalda la contribución de NR2A en estas funciones. En este contexto, el aumento en la expresión de NR2A en el grupo tratado con AL podría estar directamente relacionado con una mayor plasticidad sináptica y, por tanto, con una mejora en las pruebas de aprendizaje y memoria espacial.



*Figura 57. Expresión relativa de ARNm de NR1 y NR2A en ratas SHAM, SS y AL (n=3). Los resultados como expresión relativa con respecto a actina y SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, **** $p < 0,00001$ determinado mediante ANOVA unidireccional con Fisher como prueba post-hoc.*

7. Conclusiones

7.1 Hallazgos en hígado

En la tríada portal del grupo AL, se observó una disminución del tejido fibrótico periportal y del tamaño de los vasos sanguíneos en comparación con el grupo SS, además de una mejor organización en la distribución de los cordones de hepatocitos, lo que sugiere una posible mejora en la arquitectura hepática.

Los grupos SS y AL presentaron un aumento del 130% y 90%, respectivamente, en la concentración de amonio en comparación con el grupo SHAM, lo que indica un estado de hiperamonemia en ambos casos. Sin embargo, en el grupo SS se observó un aumento significativo en los niveles de ALT y una disminución en los de urea, lo que confirma la presencia de daño hepático. No obstante, no se encontraron diferencias significativas en estos marcadores entre los grupos AL y SHAM, lo que sugiere un posible efecto protector del tratamiento con AL sobre la función hepática.

7.2 Hallazgos en el cerebelo

Los valores obtenidos para el grupo AL en la densidad de células de Purkinje, junto con los resultados de las pruebas de coordinación motora (rotarod y barra transversal), sugieren un efecto positivo del acetato de leuprolida en la progresión de la encefalopatía hepática a nivel cerebeloso. En contraste, el grupo SS mostró un peor desempeño en estas pruebas, posiblemente relacionado con la disminución en el número de células de Purkinje.

A nivel molecular, la expresión de espinofilina en el grupo SS fue menor en comparación con AL, lo que podría contribuir a los déficits motores observados. Además, la expresión de tubulina aumentó en el cerebelo del grupo AL en comparación con SS, indicando un posible efecto neurotrófico. En cuanto a los marcadores de

neuroinflamación, en el grupo AL se observó un incremento en la expresión de GFAP, lo que podría representar un mecanismo de defensa para minimizar el daño tisular. Sin embargo, en la capa molecular del cerebelo, la expresión de GFAP disminuyó en el grupo AL, sugiriendo una reducción en la astrogliosis reactiva.

Por otro lado, la sobreexpresión de sinaptofisina en el cerebelo del grupo SS podría representar un mecanismo compensatorio ante la neurodegeneración. Asimismo, se detectó una disminución en la expresión de BDNF en SS, con una restauración de sus niveles en el grupo AL.

A nivel inflamatorio, el grupo SS presentó un aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL6, IL1 β e iNOS), mientras que el tratamiento con AL logró reducir estos niveles. No se observaron diferencias en la expresión de citocinas antiinflamatorias IL4 y TGF β entre los grupos, aunque en el grupo AL se evidenció un aumento en IL10, lo que sugiere un posible efecto antiinflamatorio del tratamiento.

El tratamiento con AL mostró un efecto regulador al restablecer los niveles de las subunidades NR1 y NR2A, lo que podría estar asociado con mecanismos de compensación neuronal y adaptación sináptica.

7.3 Hallazgos en el hipocampo

Los resultados obtenidos en las pruebas de laberinto en T elevado y en Y indicaron que los sujetos del grupo AL mostraron una mejor memoria espacial y capacidad de aprendizaje en comparación con los del grupo SS.

A nivel molecular, la expresión de espinofilina en el hipocampo del grupo SS fue menor en comparación con AL, lo que podría estar relacionado con el deterioro de las funciones cognitivas. Asimismo, la expresión de NF200 en el hipocampo del grupo SS fue menor que en los grupos control y AL, lo que sugiere la presencia de un proceso neurodegenerativo.

En relación con la neuroinflamación, la sobreexpresión de GFAP e Iba1 en el hipocampo del grupo SS podría estar asociada a un proceso inflamatorio crónico. Además, en el giro dentado del hipocampo se observó una reducción en la expresión de GFAP en el grupo AL, lo que podría estar vinculado con una disminución en la astrogliosis reactiva.

Por último, al igual que en el cerebelo, en el grupo SS se observó un aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias ($\text{TNF}\alpha$, IL6, IL1 β e iNOS), mientras que el tratamiento con AL logró reducir estos niveles. No se encontraron diferencias en la expresión de citocinas antiinflamatorias IL4 y TGF β entre los grupos, pero en el grupo AL se evidenció un incremento en la expresión de IL10, lo que sugiere un efecto antiinflamatorio del tratamiento.

Finalmente, el tratamiento con AL favoreció un aumento significativo en la expresión sinaptofisina y de la subunidad NR2A del receptor NMDA en el hipocampo, lo que sugiere una mejora en la plasticidad sináptica. Dado que la reducción de sinaptofisina y NR2A se ha asociado con déficits en memoria y aprendizaje, estos resultados respaldan el papel del AL en la recuperación cognitiva en el modelo de EH, evidenciando su potencial terapéutico para mitigar alteraciones en la neurotransmisión.

8. Perspectivas

Este estudio proporciona una base para futuras investigaciones sobre el papel de la GnRH en la regulación de la homeostasis cerebral. Explorar los mecanismos mediante los cuales ejerce su efecto en la progresión de enfermedades neurológicas podría abrir nuevas oportunidades terapéuticas más allá de la EH, incluyendo patologías como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis múltiple.

Por otro lado, para complementar este estudio se podrían realizar otras investigaciones como evaluar si el efecto del AL difiere entre machos y hembras, dado su papel en la regulación hormonal, lo que podría influir en su eficacia terapéutica.

Además, se podrían realizar estudios *in vitro* utilizando cultivos de células cerebrales (neuronas, astrocitos y microglía) expuestas a amonio para comprender cómo el AL modula directamente la neuroinflamación y la plasticidad sináptica.

Finalmente, otro estudio complementario podría ser el uso de otros modelos de EH para evaluar si los efectos neurotróficos del AL son consistentes. Y de ser así, continuar con estudios piloto en pacientes con EH.

9. Referencias bibliográficas

1. Agarwal, A. N., & Mais, D. D. (2019). Sensitivity and specificity of Alzheimer type II astrocytes in hepatic encephalopathy. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 143(10), 1256–1258. <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0455-OA>
2. Agusti, A., Hernández-Rabaza, V., Balzano, T., Taoro-Gonzalez, L., Ibañez-Grau, A., Cabrera-Pastor, A., Fustero, S., Llansola, M., Montoliu, C., & Felipo, V. (2017). Sildenafil reduces neuroinflammation in cerebellum, restores GABAergic tone, and improves motor in-coordination in rats with hepatic encephalopathy. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 23(5), 386–394.
3. Aldridge, D. R., Tranah, E. J., & Shawcross, D. L. (2015). Pathogenesis of hepatic encephalopathy: Role of ammonia and systemic inflammation. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 5(Suppl 1), S7-S20.
4. Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (Eds.). (2007). *The hippocampus book*. Oxford University Press.
5. Asth, L., Lobão-Soares, B., André, E., de Paula Soares, V., & Gavioli, E. C. (2012). The elevated T-maze task as an animal model to simultaneously investigate the effects of drugs on long-term memory and anxiety in mice. *Brain Research Bulletin*, 87(6), 526-533.
6. Baez, M. V., Cercato, M. C., & Jerusalinsky, D. A. (2018). NMDA receptor subunits change after synaptic plasticity induction and learning and memory acquisition. *Neural Plasticity*, 2018, 1-10.
7. Barboza, L. A. J. (2021). Optimización e implementación de la técnica de Western Blot cuantitativo utilizando extractos proteicos de maíz. *Pensamiento Actual*, 21(37), 1-15.
8. Bataller, R., & Brenner, D. A. (2005). Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(2), 209-218.

9. Bleibel, W., & Al-Osaimi, A. M. (2012). Hepatic encephalopathy. *Saudi Journal of Gastroenterology*, 18(5), 301.
10. Bosoi, C. R., & Rose, C. F. (2009). Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metabolic Brain Disease*, 24(1), 95-102.
11. Braeuning, A., Ittrich, C., Köhle, C., Hailfinger, S., Bonin, M., Buchmann, A., & Schwarz, M. (2006). Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *The FEBS Journal*, 273(22), 5051-5061.
12. Braissant, O., McLin, V. A., & Cudalbu, C. (2013). Ammonia toxicity to the brain. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36(4), 595-612.
13. Briend, F., Nelson, E. A., Maximo, O., Armstrong, W. P., Kraguljac, N. V., & Lahti, A. C. (2020). Hippocampal glutamate and hippocampus subfield volumes in antipsychotic-naïve first episode psychosis subjects and relationships to duration of untreated psychosis. *Translational Psychiatry*, 10(1), 137.
14. Butz, M., Timmermann, L., Braun, M., Groiss, S. J., Wojtecki, L., Ostrowski, S., ... & Schnitzler, A. (2010). Motor impairment in liver cirrhosis without and with minimal hepatic encephalopathy. *Acta Neurologica Scandinavica*, 122(1), 27-35.
15. Cabrera-Pastor, A., Llansola, M., Montoliu, C., Malaguarnera, M., Balzano, T., Taoro-Gonzalez, L., & Felipe, V. (2019). Peripheral inflammation induces neuroinflammation that alters neurotransmission and cognitive and motor function in hepatic encephalopathy: Underlying mechanisms and therapeutic implications. *Acta Physiologica*, 226(2), e13270.
16. Cai, Z., Zhu, X., Zhang, G., Wu, F., Lin, H., & Tan, M. (2019). Ammonia induces calpain-dependent cleavage of CRMP-2 during neurite degeneration in primary cultured neurons. *Aging*, 11(13), 4354.
17. Calderón-Vallejo, D., & Quintanar, J. L. (2012). Gonadotropin-releasing hormone treatment improves locomotor activity, urinary function and neurofilament

protein expression after spinal cord injury in ovariectomized rats. *Neuroscience Letters*, 515(2), 187-190.

18. Camuso, S., La Rosa, P., Fiorenza, M. T., & Canterini, S. (2022). Pleiotropic effects of BDNF on the cerebellum and hippocampus: Implications for neurodevelopmental disorders. *Neurobiology of Disease*, 163, 105606. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105606>

19. Carter, R. J., Morton, J., & Dunnett, S. B. (2001). Motor coordination and balance in rodents. *Current Protocols in Neuroscience*, 15(1), 8-12.

20. Cauli, O., Llansola, M., Agustí, A., Rodrigo, R., Hernández-Rabaza, V., Rodrigues, T. B., ... & Felipo, V. (2014). Cerebral oedema is not responsible for motor or cognitive deficits in rats with hepatic encephalopathy. *Liver International*, 34(3), 379-387.

21. Cauli, O., Rodrigo, R., Llansola, M., Montoliu, C., Monfort, P., Piedrafita, B., El Mili, N., Boix, J., Agustí, A., & Felipo, V. (2009). Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 24(1), 69–80.

22. Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Boix, J., & Felipo, V. (2007). Inflammation and hepatic encephalopathy: Ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology*, 46(2), 514–519.

23. Chen, J. R., Wang, B. N., Tseng, G. F., Wang, Y. J., Huang, Y. S., & Wang, T. J. (2014). Morphological changes of cortical pyramidal neurons in hepatic encephalopathy. *BMC Neuroscience*, 15(1), 1-12.

24. Chen, J. R., Wang, B. N., Tseng, G. F., Wang, Y. J., Huang, Y. S., & Wang, T. J. (2014). Morphological changes of cortical pyramidal neurons in hepatic encephalopathy. *BMC neuroscience*, 15(1), 1-12.

25. Cheng, C. K., & Leung, P. C. (2005). Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocrine Reviews*, 26(2), 283-306.
26. Chu, C., Gao, G., & Huang, W. (2008). A study on co-localization of FSH and its receptor in rat hippocampus. *Journal of Molecular Histology*, 39(1), 49–55. <https://doi.org/10.1007/s10735-007-9125-2>
27. Cousin, M. A. (2021). Synaptophysin-dependent synaptobrevin-2 trafficking at the presynapse-Mechanism and function. *Journal of neurochemistry*, 159(1), 78-89.
28. Cruz, N. F., & Duffy, T. E. (1983). Local cerebral glucose metabolism in rats with chronic portacaval shunts. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 3(3), 311–320. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1983.46>
29. Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernández-Rabaza, V., Gil-Perotín, S., Cubas-Núñez, L., García-Verdugo, J. M., & Agusti, A. (2016). Reducing peripheral inflammation with infliximab reduces neuroinflammation and improves cognition in rats with hepatic encephalopathy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9, 106.
30. DeMorrow, S., Cudalbu, C., Davies, N., Jayakumar, A. R., & Rose, C. F. (2021). 2021 ISHEN guidelines on animal models of hepatic encephalopathy. *Liver International*.
31. Dennis, C. V., Sheahan, P. J., Graeber, M. B., Sheedy, D. L., Kril, J. J., & Sutherland, G. T. (2014). Microglial proliferation in the brain of chronic alcoholics with hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 29(4), 1027-1039.
32. Dhanda, S., Gupta, S., Halder, A., Sunkaria, A., & Sandhir, R. (2018). Systemic inflammation without gliosis mediates cognitive deficits through impaired BDNF.
33. Díaz-Galindo, C., Gómez-González, B., Salinas, E., Calderón-Vallejo, D., Hernández-Jasso, I., Bautista, E., & Quintanar, J. L. (2015). Leuprolide acetate induces

structural and functional recovery of injured spinal cord in rats. *Neural Regeneration Research*, 10(11), 1819.

34. El-Mansoury, B., Smimih, K., Aimrane, A., Draoui, A., Ferssiwi, A., Bitar, A., ... & El Hiba, O. (2023). P8 cognitive impairment associated with cortical and hippocampal microglia activation and altered synaptic function in a rat model of chronic hepatic encephalopathy. *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG*, 118(9S), S7.

35. El-Marasy, S. A; El Awdan, S. A; Abd-Elsalam, R. M. (2019). Protective role of chrysin on thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in rats. *Chemico-biological interactions*, 299, 111-119.

36. Erceg, S; Monfort, P; Hernández-Viadel, M; Rodrigo, R; Montoliu, C; Felipo, V. (2005). Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology*, 41(2), 299-306.

37. Feng, J., Yan, Z., Ferreira, A., Tomizawa, K., Liauw, J. A., Zhuo, M., ... & Greengard, P. (2000). Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 9287-9292.

38. Ferris, J. K., Tse, M. T., Hamson, D. K., Taves, M. D., Ma, C., McGuire, N., Arckens, L., Bentley, G. E., Galea, L. A. M., Floresco, S. B., & Soma, K. K. (2015). Neuronal Gonadotrophin-Releasing Hormone (GnRH) and Astrocytic Gonadotrophin Inhibitory Hormone (GnIH) Immunoreactivity in the Adult Rat Hippocampus. *Journal of Neuroendocrinology*, 27(10), 772–786.

39. Fiati Kenston, S. S; Song, X; Li, Z; Zhao, J. (2019). Mechanistic insight, diagnosis, and treatment of ammonia-induced hepatic encephalopathy. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 34(1), 31-39.

40. Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E., & Beas-Zarate, C. (2012). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología*, 27(5), 301-310.

41. França, M. E. R; Ramos, R. K. L. G; Oliveira, W. H; Duarte-Silva, E; Araújo, S. M. R; Los, D. B; Peixoto, C. A. (2019). Tadalafil restores long-term memory and synaptic plasticity in mice with hepatic encephalopathy. *Toxicology and applied pharmacology*, 379, 114673.
42. Gamal, M; Abdel Wahab, Z; Eshra, M; Rashed, L; Sharawy, N. (2014). Comparative neuroprotective effects of dexamethasone and minocycline during hepatic encephalopathy. *Neurology research international*, 2014.
43. García-García, R., Cruz-Gómez, Á. J., Urios, A., Mangas-Losada, A., Forn, C., Escudero-García, D., Kosenko, E., Torregrosa, I., Tosca, J., Giner-Durán, R., Serra, M. A., Avila, C., Belloch, V., Felipe, V., & Montoliu, C. (2018). Learning and Memory Impairments in Patients with Minimal Hepatic Encephalopathy are Associated with Structural and Functional Connectivity Alterations in Hippocampus. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13.
44. García-Lezana, T; Oria, M; Romero-Giménez, J., Bove, J., Vila, M., Genescà, J; Cordoba, J. (2017). Cerebellar neurodegeneration in a new rat model of episodic hepatic encephalopathy. *Journal of Cerebral Blood Flow Y Metabolism*, 37(3), 927-937.
45. Gebhardt, R., & Matz-Soja, M. (2014). Liver zonation: Novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(26), 8491.
46. Gelfo, F., Cutuli, D., Foti, F., Laricchiuta, D., De Bartolo, P., Caltagirone, C., ... & Angelucci, F. (2011). Enriched environment improves motor function and increases neurotrophins in hemicerebellar lesioned rats. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 25(3), 243-252.
47. Gogishvili, D., Honey, M. I., Verberk, I. M., Vermunt, L., Hol, E. M., Teunissen, C. E., & Abeln, S. (2025). The GFAP proteoform puzzle: How to advance GFAP as a fluid biomarker in neurological diseases. *Journal of Neurochemistry*, 169(1), e16226.

48. González-Regueiro, J. A; Higuera-de la Tijera, M. F; Moreno-Alcántar, R; Torre, A. (2019). Fisiopatología y opciones de tratamiento a futuro en la encefalopatía hepática. *Revista de Gastroenterología de México*, 84(2), 195-203.
49. González-Torres, M. L., Calderón-Vallejo, D., & Quintanar, J. L. (2019). Chronic administration of gonadotropin releasing-hormone improves learning in old gonadectomized rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 157, 35-40.
50. Gonzalez-Usano, A., Cauli, O., Agusti, A., & Felipo, V. (2014). Pregnenolone sulfate restores the glutamate-nitric-oxide-cGMP pathway and extracellular GABA in cerebellum and learning and motor coordination in hyperammonemic rats. *ACS chemical neuroscience*, 5(2), 100-105.
51. Grossman, S. D., Futter, M., Snyder, G. L., Allen, P. B., Nairn, A. C., Greengard, P., & Hsieh-Wilson, L. C. (2004). Spinophilin is phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II resulting in regulation of its binding to F-actin. *Journal of Neurochemistry*, 90(2), 317–324.
52. Guzmán-Soto, I; Salinas, E; Quintanar, J. L. (2016). Leuprolide acetate inhibits spinal cord inflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing NF-κB activation. *Neuroimmunomodulation*, 23(1), 33-40.
53. Hadjihambi, A; Arias, N; Sheikh, M; y Jalan, R. (2018). Hepatic encephalopathy: a critical current review. *Hepatology international*, 12(1), 135-147.
54. Hainmueller, T., & Bartos, M. (2020). Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(3), 153–168.
55. He, Y. Y., Zhang, X. Y., Yung, W. H., Zhu, J. N., & Wang, J. J. (2013). Role of BDNF in central motor structures and motor diseases. *Molecular Neurobiology*, 48(3), 783–793.

56. Herman, J. P., & Watson, S. J. (1987). The rat brain in stereotaxic coordinates (2nd edn). In *Trends in Neurosciences* (Vol. 10, Issue 10).
57. Hernández-Jasso, I., Domínguez-del-Toro, E., Delgado-García, J. M., Y Quintanar, J. L. (2020). Recovery of sciatic nerve with complete transection in rats treated with leuprolide acetate: A gonadotropin-releasing hormone agonist. *Neuroscience Letters*, 739, 135439.
58. Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-González, L., Malaguarnera, M., Agustí, A., Llansola, M., Y Felipo, V. (2016). Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by sulforaphane. *Journal of neuroinflammation*, 13(1), 1-11.
59. Ishibashi, H., Nakamura, M., Komori, A., Migita, K., & Shimoda, S. (2009, September). Liver architecture, cell function, and disease. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 31, pp. 399-409). Springer-Verlag.
60. Jaeger, V; DeMorrow, S; McMillin, M. (2019). The direct contribution of astrocytes and microglia to the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Journal of clinical and translational hepatology*, 7(4), 352.
61. Jamshidzadeh, A; Abdoli, N; Niknahad, H; Azarpira, N; Mardani, E; Mousavi, S; Heidari, R. (2017). Taurine alleviates brain tissue markers of oxidative stress in a rat model of hepatic encephalopathy. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 181-192.
62. Jaramillo, F. Calderón, D. (2021). Fundamentos de Neuroanatomía. 1er ed. *Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 306p.
63. Jennes, L., Dalati, B., & Michael Conn, P. (1988). Distribution of gonadotropin releasing hormone agonist binding sites in the rat central nervous system. *Brain Research*, 452(1-2), 156-164. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90020-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90020-0)

64. Jeong, J. H; Kim, D. K; Lee, N. S; Jeong, Y. G; Kim, H. W; Kim, J. S; Han, S. Y. (2018). Neuroprotective effect of nortriptyline in overt hepatic encephalopathy through attenuation of mitochondrial dysfunction. *ASN neuro*, 10.
65. Jover, R., Rodrigo, R., Felipo, V., Insausti, R., Sáez-Valero, J., García-Ayllón, M. S., ... Y Pérez-Mateo, M. (2006). Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: a model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology*, 43(6), 1257-1266.
66. Jurga, A. M., Paleczna, M., Kadluczka, J., & Kuter, K. Z. (2021). Beyond the GFAP-astrocyte protein markers in the brain. *Biomolecules*, 11(9).
67. Kaku, Y., Yonekawa, Y., Tsukahara, T., Ogata, N., Kimura, T., & Taniguchi, T. (1993). Alterations of a 200 kDa neurofilament in the rat hippocampus after forebrain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 13(3), 402-408.
68. Kim, D., Chung, S., Lee, S.-H., Choi, S.-Y., Kim, S.-M., Koo, J., Lee, J.-H., Jahng, J.W., 2017. Decreased hippocampal brain-derived neurotrophic factor and impaired cognitive function by hypoglossal nerve transection in rats. *J. Cell. Mol. Med.* 21, 3752–3760.
69. Kornerup, L. S; Gluud, L. L; Vilstrup, H; Dam, G. (2018). Update on the therapeutic management of hepatic encephalopathy. *Current gastroenterology reports*, 20(5), 1-6.
70. Kraeuter, A. K., Guest, P. C., Y Sarnyai, Z. (2019). The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. *In Pre-clinical models* (pp. 105-111). Humana Press, New York, NY.
71. Kril JJ, Butterworth RF (1997) Diencephalic and cerebellar pathology in alcoholic and nonalcoholic patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 26:837–841.
72. Kukiela, D., Esperón, F., Higes, M., Y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2008). A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and

black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *Journal of virological methods*, 147(2), 275-281.

73. Lalonde, R., Hernandez, M., & Strazielle, C. (2023). BDNF and Cerebellar Ataxia. *Current Drug Research Reviews*, 16(3), 300–307.

74. Lee, J., Duan, W., Mattson, M.P., 2002. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neuro- genesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J. Neurochem.* 82, 1367–1375.

75. Lee, S. H., Y Fisher, B. (1961). Portacaval shunt in the rat. *Surgery*, 50(4), 668-672.

76. Leone, P., Mincheva, G., Balzano, T., Malaguarnera, M., Felipo, V., & Llansola, M. (2022). Rifaximin improves spatial learning and memory impairment in rats with liver damage-associated neuroinflammation. *Biomedicines*, 10(6), 1263.

77. Lin, W., Chen, X., Gao, Y. Q., Yang, Z. T., Yang, W., & Chen, H. J. (2019). Hippocampal atrophy and functional connectivity disruption in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, 34(6), 1519–1529. <https://doi.org/10.1007/s11011-019-00457-6>

78. Llansola, M., Montoliu, C., Cauli, O., Hernández-Rabaza, V., Agustí, A., Cabrera-Pastor, A., Giménez-Garzó, C., González-Usano, A., & Felipo, V. (2013). Chronic hyperammonemia, glutamatergic neurotransmission and neurological alterations. *Metabolic Brain Disease*, 28(2), 151–154. <https://doi.org/10.1007/s11011-012-9337-3>

79. Llansola, M., Rodrigo, R., Monfort, P., Montoliu, C., Kosenko, E., Cauli, O., Piedrafita, B., El Mili, N., & Felipo, V. (2007). NMDA receptors in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*.

80. Llansola, M., Sanchez-Perez, A., Cauli, O., & Felipe, V. (2005). Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. 1. Properties of the NMDA receptor that modulate its function. *The Cerebellum*, 4, 154-161.
81. López-Cervantes, M., Quintanar-Stephano, A., Alcauter-Solórzano, S., Hernández-Pando, R., Aguilar-Roblero, R., Gasca-Martínez, D., ... Y Díaz-Muñoz, M. (2021). Cerebellar spongiform degeneration is accompanied by metabolic, cellular, and motor disruption in male rats with portacaval anastomosis. *Journal of Neuroscience Research*, 99(9), 2287-2304.
82. Louis, E. D., Babij, R., Lee, M., Cortés, E., & Vonsattel, J. P. G. (2013). Quantification of cerebellar hemispheric purkinje cell linear density: 32 ET cases versus 16 controls. *Movement Disorders*, 28(13), 1854-1859.
83. Louveau, A.; Angibaud, J.; Haspot, F.; Opazo, M.C.; Thinard, R.; Thepenier, V.; Baudouin, S.J.; Lescaudron, L.; Hulin, P.; Riedel, C.A.; *et al.* Impaired spatial memory in mice lacking CD3 ζ is associated with altered NMDA and AMPA receptors signaling independent of T-Cell deficiency. *J. Neurosci.* 2013, 33, 18672–18685.
84. Lu, J., Li, Y., Zhang, C., Yang, X., Y Qiang, J. W. (2020). Interaction of Manganese and Ammonia in the Brain of Hepatic Encephalopathy Rats. *Hepatitis Monthly*, 20(8).
85. Maeng, L. Y; Taha, M. B; Cover, K. K; Glynn, S. S; Murillo, M; Lebron-Milad, K; Milad, M. R. (2017). Acute gonadotropin-releasing hormone agonist treatment enhances extinction memory in male rats. *Psychoneuroendocrinology*, 82, 164-172.
86. Magallán, A. R; Romero, H. S. V; Altamirano, J. T. (2008). Etiología y complicaciones de la cirrosis hepática en el Hospital Juárez de México. *Revista del Hospital Juárez de México*, 75(4), 257-263.
87. Mak, K. M., & Png, C. M. (2020). The hepatic central vein: structure, fibrosis, and role in liver biology. *The Anatomical Record*, 303(7), 1747-1767.

88. Martínez-Moreno, C. G., Calderón-Vallejo, D., Díaz-Galindo, C., Hernández-Jasso, I., Olivares-Hernández, J. D., Ávila-Mendoza, J., Epardo, D., Balderas-Márquez, J. E., Urban-Sosa, V. A., Baltazar-Lara, R., Carranza, M., Luna, M., Arámburo, C., & Quintanar, J. L. (2023). Gonadotropin-releasing hormone and growth hormone act as anti-inflammatory factors improving sensory recovery in female rats with thoracic spinal cord injury. *Frontiers in Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1164044>
89. Méndez, M., Méndez-López, M., López, L., Begega, A., Ángeles Aller, M., Arias, J., & Arias, J. L. (2010). Reversal learning impairment and alterations in the prefrontal cortex and the hippocampus in a model of portosystemic hepatic encephalopathy. *Acta Neurologica Belgica*, 110(3), 246–254.
90. Millar, R. P. (2005). GnRHs and GnRH receptors. *Animal reproduction science*, 88(1-2), 5-28.
91. Mohammadian, F., Firouzjaei, M. A., Haghani, M., Shabani, M., Moosavi, S. M. S., Y Mohammadi, F. (2019). Inhibition of inflammation is not enough for recovery of cognitive impairment in hepatic encephalopathy: Effects of minocycline and ibuprofen. *Brain research bulletin*, 149, 96-105.
92. Monfort, P., Cauli, O., Montoliu, C., Rodrigo, R., Llansola, M., Piedrafita, B., el Mlili, N., Boix, J., Agustí, A., & Felipe, V. (2009). Mechanisms of cognitive alterations in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: Therapeutical implications. *Neurochemistry International*, 55(1–3), 106–112.
93. Monfort, P., Erceg, S., Piedrafita, B., Llansola, M., & Felipe, V. (2007). Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability. *European Journal of Neuroscience*, 25(7), 2103–2111. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05444.x>

94. Montoliu, C., Gonzalez-Escamilla, G., Atienza, M., Urios, A., Gonzalez, O., Wassel, A., ... Y Cantero, J. L. (2012). Focal cortical damage parallels cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Neuroimage*, 61(4), 1165-1175.
95. Montoya-García, R., Fernández-Vargas, V., Albor-Martínez, K. N., Martínez-Martínez, A., Hernández-Jasso, I., Quintanar-Stephano, A., Calderón-Vallejo, D., & Quintanar, J. L. (2023). Analysis of hippocampus in rats with acute brain ischemia-reperfusion injury treated with leuprolide acetate, an agonist of GnRH. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 2022, 1–7.
96. Morcillo-Muñoz, A. F; Morcillo-Muñoz, J. A; Rodríguez-Pantoja, D. A; Otero-Regino, W. (2020). Encefalopatía Hepática: Diagnóstico Y Tratamiento En 2019. *Revista Ecuatoriana de Neurología*, 29(1), 104-114.
97. Mosso, J., Valette, J., Katarzyna, P., Simicic, D., Jelescu, I., & Cudalbu, C. (2021). Diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy in the cerebellum of a rat model of hepatic encephalopathy at 14.1 T. In *Proc Intl Soc Magn Reson Med* (Vol. 29).
98. Muñoz, M. D., Monfort, P., Gaztelu, J. M., & Felipo, V. (2000). Hyperammonemia impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the CA1 of rat hippocampus in vitro. *Neurochemical Research*, 25(4), 437–441.
99. Muñoz-Ortega, M., Macías-Segura, N., Ventura-Juárez, J., Ávila-Blanco, M. E., Ponce-Damian, L. D., González-Blas, D. y Quintanar-Stephano, A. (2021). Recovery from Liver Failure and Fibrosis in a Rat Portacaval Anastomosis Model after Neurointermediate Pituitary Lobectomy. *Journal of Immunology Research*, 2021.
100. Nakanishi, H., Obaishi, H., Satoh, A., Wada, M., Mandai, K., Satoh, K., ... & Takai, Y. (1997). Neurabin: a novel neural tissue-specific actin filament-binding protein involved in neurite formation. *The Journal of cell biology*, 139(4), 951-961.

101. Navarro-Gonzalez, Y. D., Ventura-Juarez, J., Muñoz-Ortega, M. H., González-Blas, D., Calvillo-Robedo, A., Avila-Blanco, M. E., Valdez-Urias, F., & Quintanar-Stephano, A. (2023). Arginine vasopressin deficiency and conivaptan (a V1a–V2 receptor antagonist) treatment reverses liver damage and fibrosis in rats with chronic portocaval anastomosis. *International Journal of Experimental Pathology*, February, 1–14.
102. Ochoa-Sanchez, R., Tamnanloo, F., Y Rose, C. F. (2021). Hepatic encephalopathy: from metabolic to neurodegenerative. *Neurochemical research*, 46(10), 2612-2625.
103. Odeh, M., Sabo, E., Srugo, I., and Oliven, A. (2004). Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver Int.* 24, 110–116.
104. Oliveira, N. K., de Brito Toscano, E. C., Silva Oliveira, B. D., Dias Lima, L. C., Simões e Silva, A. C., de Miranda, A. S., ... & Rachid, M. A. (2022). Modified levels of renin angiotensin related components in the frontal cortex and hippocampus were associated with neuroinflammation and lower neuroprotective effects of NGF during acute hepatic encephalopathy in mice. *Protein and Peptide Letters*, 29(12), 1042-1050.
105. Palmada, M; Centelles, J.J. (1998). Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage, and reuptake of glutamate in brain. *Front Biosci.* 3, d701-d718.
106. Panday, R., Monckton, C. P., & Khetani, S. R. (2022, February). The role of liver zonation in physiology, regeneration, and disease. In *Seminars in liver disease* (Vol. 42, No. 01, pp. 001-016). *Thieme Medical Publishers, Inc.*
107. Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity, and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 383-400.

108. Pasha, K. V., & Vijayan, E. (1992). Acute and short-term effects of intraventricular injection of somatostatin and LHRH on glutamate and GABA levels in rat brain. *Biochemistry international*, 26(1), 7-15.
109. Pedroza-García, K. A., Calderón-Vallejo, D., Cervantes-García, D., Quintanar-Stephano, A., Salinas, E., & Quintanar, J. L. (2023). Effect of leuprolide acetate, a GnRH agonist, on neuroinflammation and anxiety-like behavior after mild hypoxic-ischemic encephalopathy in rat model. *Neuroimmunomodulation*, 30(1), 206-212.
110. Pekny, M., Pekna, M., Messing, A., Steinhäuser, C., Lee, J. M., Parpura, V., Hol, E. M., Sofroniew, M. V., & Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathologica*, 131(3), 323–345. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1513-1>
111. Piatti, V. D. C. (2009). Maduración neuronal en el giro dentado del hipocampo adulto (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
112. Piochon, C., Levenes, C., Ohtsuki, G., & Hansel, C. (2010). Purkinje cell NMDA receptors assume a key role in synaptic gain control in the mature cerebellum. *Journal of Neuroscience*, 30(45), 15330-15335.
113. Popek, M., Bobula, B., Orzeł-Gajowik, K., & Zielińska, M. (2022). The effect of TGF-β1 reduced functionality on the expression of selected synaptic proteins and electrophysiological parameters: Implications of changes observed in acute hepatic encephalopathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1081.
114. Porseva, V. V., Smirnova, V. P., Korzina, M. B., Emanuilov, A. I., & Masliukov, P. M. (2013). Age-associated changes in sympathetic neurons containing neurofilament 200 kDa during chemical deafferentation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 155(2), 268–271. <https://doi.org/10.1007/s10517-013-2129-x>

115. Quintanar JL, Salinas E. (2008). Neurotrophic Effects of GnRH on neurite Outgrowth and Neurofilament Protein Expression in Cultured Cerebral Cortical Neurons of Rat Embryos. *Neurochemical Research*; 33,6:1051-56.
116. Quintanar, J. L., & Salinas, E. (2008). Neurotrophic effects of GnRH on neurite outgrowth and neurofilament protein expression in cultured cerebral cortical neurons of rat embryos. *Neurochemical Research*, 33(6), 1051–1056.
117. Quintanar, J. L., Calderón-Vallejo, D., & Hernández-Jasso, I. (2016). Effects of GnRH on Neurite Outgrowth, Neurofilament and Spinophilin Proteins Expression in Cultured Spinal Cord Neurons of Rat Embryos. *Neurochemical Research*, 41(10), 2693–2698.
118. Quintanar, J. L; Diaz-Galindo, C; Calderon-Vallejo, D; Hernandez-Jasso, I; Rojas, F; Medina-Aguinaga, D; Olvera-Sandoval, C. (2018). Neurological improvement in patients with chronic spinal cord injury treated with leuprolide acetate, an agonist of GnRH. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 78(4), 352-357.
119. Quintanar, J. L; Salinas, E; Quintanar-Stephano, A. (2011). Gonadotropin-releasing hormone reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Neuropeptides*, 45(1), 43-48.
120. Ramírez-Palma, A; Muñoz-Hernández, E; Melchor-López, A. (2016). Comparación de la administración de lactulosa y metronidazol vs lactulosa o metronidazol en el tratamiento de la encefalopatía hepática aguda. *Medicina Interna de México*, 32(4), 420-425.
121. Reina, J. A. (2012). Encefalopatía hepática. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(11), 652-659.
122. Réus, G. Z; Fries, G. R; Stertz, L; Badawy, M; Passos, I. C; Barichello, T; Quevedo, J. (2015). The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience*, 300, 141-154.

123. Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez-Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Garcia-Verdugo, J.-M., and Felipe, V. (2010). Hyperammonemia Induces Neuroinflammation That Contributes to Cognitive Impairment in Rats With Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology* 139, 675–684.
124. Rodriguez, A. R. Á., Gaviria, E. F. B., Y Bonilla, D. F. E. (2016). Evaluación del efecto analgésico de la lidocaína vía intratesticular o intrafunicular en perros sometidos a orquiectomía electiva bajo un protocolo de anestesia disociativa. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 17(9), 1-16.
125. Rojo, A. D; Trujillo, J. E; Torre, A; Uribe, M. (2007). Avances en la fisiopatología de la encefalopatía hepática. *médicas uis*, 20(3).
126. Romero-Gómez, M., Córdoba, J., Jover, R., del Olmo, J.A., Ramírez, M., Rey, R., de Madaria, E., Montoliu, C., Nuñez, D., Flavia, M., *et al.* (2007). Value of the critical flicker frequency in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 45, 879–885.
127. Rufin-Gómez, L. Á., Vega-Socorro, M. N., & García-García, D. R. (2024). Factores de riesgo que contribuyen a la neuroinflamación crónica y disfunción cerebral. *Revista Médica Electrónica*, 46.
128. Sakamoto, Y; Harada, T; Horie, S; Iba, Y; Taniguchi, F; Yoshida, S; Terakawa, N. (2003). Tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 (IL-8) expression in endometriotic stromal cells, probably through nuclear factor- κ B activation: gonadotropin-releasing hormone agonist treatment reduced IL-8 expression. *The Journal of Clinical Endocrinology y Metabolism*, 88(2), 730-735.
129. Schang, A. L., Ngô-Muller, V., Bleux, C., Granger, A., Chenut, M. C., Loudes, C., Magre, S., Counis, R., Cohen-Tannoudji, J., & Laverrière, J. N. (2011). GnRH receptor gene expression in the developing rat hippocampus: Transcriptional regulation and potential roles in neuronal plasticity. *Endocrinology*, 152(2), 568–580. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0840>

130. Sedik, A. A., Hassan, A., & Saleh, D. O. (2023). Neuromodulatory role of L-arginine: nitric oxide precursor against thioacetamide-induced-hepatic encephalopathy in rats via downregulation of NF- κ B-mediated apoptosis. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(35), 84791-84804.
131. Sepehrinezhad, A; Zarifkar, A; Namvar, G; Shahbazi, A; Williams, R. (2020). Astrocyte swelling in hepatic encephalopathy: molecular perspective of cytotoxic edema. *Metabolic brain disease*, 35(4), 559-578.
132. Shao, T., Yu, Q., & Liang, S. (2020). Molecular imaging of murine hepatic encephalopathy with cannabinoid receptor type I targeted [18F] MK-9470 by positron emission tomography.
133. Shawcross, D. L. (2018). Diagnosis and management of hepatic encephalopathy. *British Journal of Nursing*, 27(Sup3), S7-S13.
134. Slaoui, M., Y Fiette, L. (2011). Histopathology procedures: from tissue sampling to histopathological evaluation. In Drug safety evaluation (pp. 69-82). *Humana Press*.
135. Soto-Gutierrez, A., Gough, A., Verneti, L. A., Taylor, D. L., & Monga, S. P. (2017). Pre-clinical and clinical investigations of metabolic zonation in liver diseases: The potential of microphysiology systems. *Experimental Biology and Medicine*, 242(16), 1605-1616.
136. Stokum, J. A., Kurland, D. B., Gerzanich, V., Y Simard, J. M. (2015). Mechanisms of astrocyte-mediated cerebral edema. *Neurochemical Research*, 40(2), 317–328. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1374-3>
137. Strebel, H; Haller, B; Sohn, M; Schepp, W; Gundling, F. (2020). Role of brain biomarkers S-100-beta and neuron-specific enolase for detection and follow-up of hepatic encephalopathy in cirrhosis before, during and after treatment with L-ornithine-L-aspartate. *GE-Portuguese Journal of Gastroenterology*, 27(6), 1-13.

138. Tahamtan, M., Aghaei, I., Pooladvand, V., Sheibani, V., Khaksari, M., & Shabani, M. (2017). Characterization of the CA1 pyramidal neurons in rat model of hepatic cirrhosis: insights into their electrophysiological properties. *Metabolic Brain Disease*, 32(3), 881–889. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-9966-7>
139. Tallis, S., Caltana, L. R., Souto, P. A., Delfante, A. E., Lago, N. R., Brusco, A., & Perazzo, J. C. (2014). Changes in CNS cells in hyperammonemic portal hypertensive rats. *Journal of Neurochemistry*, 128(3), 431–444.
140. Tallis, S., Caltana, L. R., Souto, P. A., Delfante, A. E., Lago, N. R., Brusco, A., & Perazzo, J. C. (2014). Changes in CNS cells in hyperammonemic portal hypertensive rats. *Journal of Neurochemistry*, 128(3), 431–444.
141. Taoro-Gonzalez, L., Arenas, Y. M., Cabrera-Pastor, A., Y Felipo, V. (2018). Hyperammonemia alters membrane expression of GluA1 and GluA2 subunits of AMPA receptors in hippocampus by enhancing activation of the IL-1 receptor: underlying mechanisms. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 36.
142. Timmann, D., Drepper, J., Frings, M., Maschke, M., Richter, S., Gerwig, M., & Kolb, F. P. (2010). The human cerebellum contributes to motor, emotional and cognitive associative learning. A review. *Cortex: a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*, 46(7), 845–857.
143. Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2013). Principios de Anatomía y Fisiología (13^a edición ed.).
144. Tronel, S., Fabre, A., Charrier, V., Olier, S. H. R., Gage, F. H., & Abrous, D. N. (2010). Spatial learning sculpts the dendritic arbor of adult-born hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(17), 7963–7968. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914613107>
145. Tupper, D. E., & Wallace, R. B. (1980). Utility of the neurological examination in rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 40(6), 999–1003.

146. Vázquez-Martínez, O., Valente-Godínez, H., Quintanar-Stephano, A., Gasca-Martínez, D., López-Cervantes, M. L., Palma-Tirado, L., ... Y Díaz-Muñoz, M. (2019). Reduced liver lipid peroxidation in subcellular fractions is associated with a hypometabolic state in rats with portacaval anastomosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
147. Voogd J y Glickstein M (1998) The anatomy of the cerebellum. *Trends Neuroscience* 21: 370-375.
148. Wickramasuriya, N., Hawkins, R., Atwood, C., & Butler, T. (2022). The roles of GnRH in the human central nervous system. *Hormones and Behavior*, 145.
149. Wilhelmsson, U., Faiz, M., De Pablo, Y., Sjöqvist, M., Andersson, D., Widestrand, Å., Potokar, M., Stenovec, M., Smith, P. L. P., Shinjyo, N., Pekny, T., Zorec, R., Ståhlberg, A., Pekna, M., Sahlgren, C., & Pekny, M. (2012). Astrocytes negatively regulate neurogenesis through the Jagged1-mediated notch pathway. *Stem Cells*, 30(10), 2320–2329. <https://doi.org/10.1002/stem.1196>
150. Wilson, A. C; Vadakkadath Meethal, S; Bowen, R. L; Atwood, C. S. (2007). Leuprolide acetate: a drug of diverse clinical applications. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 16(11), 1851-1863.
151. Yadav, R., Dravid, S. M., Yuan, H., Y Traynelis, S. F. (2016). AMPA receptors: Molecular biology and pharmacology. In The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology (pp. 311-318). *Elsevier Science Ltd*.
152. Yang, Z., Liu, S., Wei, F., & Hu, J. (2024). The effects of Qingchang Ligan formula on hepatic encephalopathy in mouse model: results from gut microbiome-metabolomics analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1381209.
153. Yuan T-F, Li W-G, Zhang C *et al* (2020) Targeting neuroplasticity in patients with neurodegenerative diseases using brain stimulation techniques. *Transl Neurodegeneration* 9:44.

154. Yuan, A., Rao, M. V., Veeranna, & Nixon, R. A. (2017). Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018309>
155. Zhang, F. X., Sun, Q. J., Zheng, X. Y., Lin, Y. T., Shang, W., Wang, A. H., ... & Chi, Z. F. (2014). Abnormal expression of synaptophysin, SNAP-25, and synaptotagmin 1 in the hippocampus of kainic acid-exposed rats with behavioral deficits. *Cellular and molecular neurobiology*, 34, 813-824.



10. Anexos

Anexo 1. Extracción de proteínas para Western Blot

1. Colocar 200 μ L de Buffer de Homogeneización+TX-100 al 1% en cada una de las muestras para homogeneizar.
2. Homogeneizar con un aparato eléctrico dejando las muestras sobre hielo.
3. Una vez homogenizadas, se colocan en agitación continua durante 20 min.
4. Centrifugar a 14,000 rpm durante 30 min a 4°C.
5. Realizar la cuantificación y si es necesario diluir en TX-100

a. Buffer de Homogeneización

Para preparar 20 ml:

REACTIVO	CANTIDAD
Tris/HCl 20 mM	0.06 g
EGTA 1 mM	0.008 g
Cl ₂ Mg 10 mM	0.04 g
PMSF 1 mM	200 μ L del 100 mM
Aprotinina 0.6 mM	80 μ L del 1:10
Leupeptina 2 μ M	40 μ L del 1 mM

Se preparan 20 ml y se almacenan a 4°C en alícuotas de 1 ml sin colocar inhibidores hasta el momento de homogenizar la muestra.

El Cl₂Mg se debe de pesar rápidamente porque se hidrata.

Anexo 2. Cuantificación de proteína por medio de la técnica del ácido bicinconínico (BCA)

La proteína total fue determinada mediante la técnica del ácido bicinconínico (BCA, PIERCE® Protein Assay Reagent). El principio de esta técnica se basa en que el enlace peptídico de las proteínas reduce los iones Cu^{+2} del sulfato de cobre (II) a iones Cu^{+1} que posteriormente interaccionan con dos moléculas de ácido bicinconínico formando complejos de color púrpura que pueden ser leídos a una longitud de onda de 562 nm (Smith *et al.*, 1985). El ensayo se realizó utilizando 3 μL de la muestra problema y 200 μL de la mezcla de los reactivos A (tartrato de sodio, amortiguador de carbonatos con BCA en NaOH 0.1 M) y B (solución de sulfato de cobre) en relación 1:50. La reacción se incubó a 37°C por 60 min, y se dejó enfriar por 5 min a temperatura ambiente, para medir su absorbancia a 562 nm. El cálculo de las concentraciones se efectuó utilizando una curva patrón realizada con albumina de suero bovino como estándar en un intervalo de concentraciones de 0 a 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

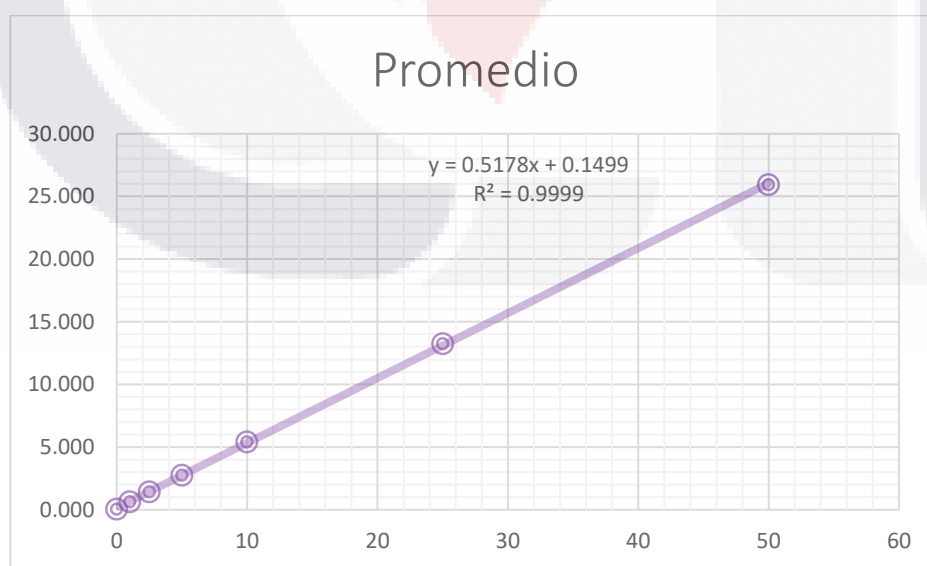


Figura 3. Curva patrón utilizada para la cuantificación de proteína. La curva se obtuvo con el método del BCA y utilizando albúmina de suero de bovino

Anexo 3. Electroforesis SDS PAGE

La electroforesis es una técnica que permite la separación de moléculas biológicas, con base en su masa y carga, bajo la influencia de un campo eléctrico. En este sistema las proteínas son desnaturalizadas por calentamiento en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) y reducidas con (DTT) o β -mercaptoetanol. Para este ensayo se utilizaron geles de poliacrilamida de carga y separación al 4% y 10%, respectivamente; fueron montados en una cámara BioRad® Mini-PROTEAN® y se corrieron a un voltaje constante de 120 V. En todos los casos se incluyó un marcador de intervalo de peso molecular de 200 a 6.5 kDa (SDS PAGE molecular weight standards, Biorad broad rang, No. 161-0317).

GEL SEPARADOR (Porcentajes de Acrilamida)

	5%	7.5%	10%	13.5%	16%
Agua destilada	8.52 mL	4.5 mL	4.02 mL	2.85 mL	2.05 mL
Lower Buffer	3.75 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
Acrilamida	2.5mL	2.5 mL	3.33 mL	4.5 mL	5.3 mL
APS 10%	75 μ l	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L
TEMED	10 μ l	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L
TOTAL	15 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL

GEL CONCENTRADOR

Agua Destilada	3.5 mL
Upper Buffer	5.0 mL
Acrilamida	1.3 mL

APS	50 μ L
TEMED	10 μ L
TOTAL	10 mL

Anexo 4. Western Blot

1. Para la transferencia del gel de poliacrilamida a la membrana es necesario activarla, para ello se sumerge en metanol aproximadamente por 5 minutos en caso de que sea de PVDF, si es de nitrocelulosa, esta solo se sumerge en buffer de transferencia 1X
2. Una vez concluida la electroforesis, se saca el gel, se retira el gel concentrador y se comienza con el montaje del sándwich.
3. Sobre la parte negra del estuche de transferencia se coloca los siguientes aditamentos en el orden correspondiente:

1. Esponja
2. Filtro
3. Gel
4. Membrana
5. Filtro
6. Esponja

Nota: durante este proceso se pueden producir burbujas entre cada uno de los aditamentos es necesario quitarlas con mucho cuidado haciendo presión.

4. Una vez que se tiene el sándwich este se monta sobre la cámara y se inicia la transferencia con el buffer de transferencia 1X a 12 mA durante toda la noche o 100 mA durante 120 minutos.
5. Inmediatamente después de parar la transferencia del gel a la membrana de PVDF hacer un lavado rápido con TBS 1X-Tween 0.05% (2 veces por 10 minutos).

6. La membrana será bloqueada con leche al 5% libre de grasa (Sveltys) en TBS 1X-Tween con agitación constante a temperatura ambiente.
7. La membrana se lava con TBS 1X-Tween 0.05% (3 veces por 10 minutos).
8. Incubar la membrana con el anticuerpo primario correspondiente a cada proteína de interés.
9. Una vez terminada la incubación se retiran los anticuerpos y se hacen lavados con TBS 1X-Tween (3 veces durante 10 minutos)
10. Posteriormente las membranas se incuban con el anticuerpo secundario diluido en TBS 1X-Tween 5% de leche durante 2 horas.
11. Después de la incubación se hacen lavados con TBS 1X-Tween (3 veces durante 10 minutos)
12. Finalmente se revelar la membrana.
13. Las membranas se revelan usando el sistema Clarity Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad) y se leen usando el equipo C-DiGit Blot Scanner.
14. Las bandas obtenidas se analizan por densitometría utilizando el analizador de imagen Fiji.

Anexo 5. Inmunofluorescencia

1. Desparafinación del tejido

Las laminillas preparadas con el tejido fueron sumergidas en xileno por tres veces durante cinco minutos y en crisol dos veces por cinco minutos. Posteriormente fueron sumergidos en Etanol para realizar una rehidratación a una concentración de 100% dos veces por cinco minutos y 96 % dos veces por cinco minutos; también fueron sumergidos en Etanol al 70% una vez por cinco minutos y Etanol al 50% una vez durante cinco minutos, para finalmente sumergirlos en agua desionizada dos veces durante cinco minutos.

2. Exposición de epítomos

Se colocó dentro de un recipiente el buffer de citrato de sodio, posteriormente se sumergieron las laminillas en el buffer y se puso a baño maría a 60°C.

3. Lavados con PBS

Se realizaron 3 lavados con PBS- Tritón X-100 (50% Tween/ 50% Tritón) a una concentración de 0.2% 3 veces durante diez minutos. Se incubaron las laminillas 1 hora a temperatura ambiente con leche 5% en PBS. Se realizó un último lavado con PBS durante 5 minutos.

4. Primer anticuerpo

Se incubó el primer anticuerpo durante toda la noche en cámara de humedad a temperatura ambiente. El anticuerpo se diluyó en PBS 1X- Tritón X-100 al 0.2% y leche al 1.0%.

5. Lavado con PBS

Se realizo nuevamente tres lavados con PBS- Tritón X-100 al 0.2%

6. Segundo anticuerpo

Se incubo el anticuerpo secundario unido al cromógeno diluido en PBS Tritón X-100 con leche al 0.5%, durante 2 horas a 4 °C en cámara húmeda. Se incubo junto con el colorante DAPI (100 ml de DAPI por cada ml de anticuerpo).

7. Lavado con PBS (3 veces)

8. Montaje de la laminilla

Se cubrió todo el tejido con medio de montaje a base de agua, sea Glicergel, Moviol, etc. Procurando no dejar burbujas.