



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular

Facultad de Farmacia

ESTUDIO DE LA OXIDACIÓN DE
PROTEÍNAS EN RATAS CON
ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA: UNA
APROXIMACIÓN PROTEÓMICA.

M^a del Pilar Carbonero Aguilar

Tesis Doctoral

Sevilla, Enero 2012



Trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, por la Lda. M^a del Pilar Carbonero Aguilar para optar al grado de Doctora con mención europea en Bioquímica

Fdo. M^a del Pilar Carbonero Aguilar

V^oB^o
El director de la Tesis

Dr. Juan D. Bautista Palomas
Catedrático de Bioquímica
Universidad de Sevilla



Trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, por la Lda. M^a del Pilar Carbonero Aguilar para optar al grado de Doctora con mención europea en Bioquímica

Fdo. M^a del Pilar Carbonero Aguilar

V^oB^o
El director de la Tesis

Dr. Manuel Romero Gómez
Profesor Titular de Medicina
Universidad de Sevilla



Dr. D. Juan D. Bautista Palomas, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla,

CERTIFICA

*Que la Tesis Doctoral que lleva por título “**ESTUDIO DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS EN RATAS CON ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA: UNA APROXIMACIÓN PROTEÓMICA**” presentada y realizada por la Lda. M^a del Pilar Carbonero Aguilar para optar al grado de Doctora con mención europea, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, dentro del Proyecto de Excelencia: Tratamiento nutricional de la Encefalopatía Hepática: una aproximación nutrigenómica (P06-CTS-01887). Revisado el texto, doy mi conformidad para ser presentada y juzgada.*

Y para que conste, firmo la presente en Sevilla, a 3 de Noviembre de 2011

(Fdo. Juan D. Bautista Palomas)



Dr. D. Manuel Romero Gómez, Profesor Titular de Medicina del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, y director de la Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Digestivas (Ciberehd) del Hospital Universitario de Valme, Sevilla

CERTIFICA

*Que la Tesis Doctoral que lleva por título **“ESTUDIO DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS EN RATAS CON ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA: UNA APROXIMACIÓN PROTEÓMICA”** presentada y realizada por la Lda. M^a del Pilar Carbonero Aguilar para optar al grado de Doctora con mención europea, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, dentro del Proyecto de Excelencia: Tratamiento nutricional de la Encefalopatía Hepática: una aproximación nutrigenómica (P06-CTS-01887). Revisado el texto, doy mi conformidad para ser presentada y juzgada.*

Y para que conste, firmo la presente en Sevilla, a 3 de Noviembre de 2011

(Fdo. Manuel Romero Gómez)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría comenzar dando las gracias a todas aquellas personas que han hecho posible la elaboración de este trabajo.

A mi director, Juan D. Bautista Palomas, que me dio la oportunidad de realizar este trabajo, apoyándome siempre, enseñándome que en la vida no sólo hay que intentar ser buen científico, sino que por encima de todo nunca hay que dejar de ser buena persona.

A mi director, Manuel Romero Gómez, por su apoyo e interés en este trabajo y por la predisposición que siempre ha mostrado hacia él, además de prestarme siempre toda la ayuda necesaria.

A mis compañeros de laboratorio, tanto los que continúan como los que un día formaron parte de él: a mi Isabelita, Beita y a Olga por su sincera amistad, por las fuerzas y los ánimos en tiempos difíciles y por aconsejarme tanto y tan bien, a M. Mar, Anita y María por los momentos pasados en Munich, por vuestro sentido del humor y por los grandes favores que siempre me hacéis, y a los *únicos chicos*, Bruno y Juanfra, gracias por facilitarme las cosas y ayudarme cuando lo necesitaba.

Al grupo de Juan Parrado por enseñarme tantas cosas a la hora de trabajar en el laboratorio. A Enrique Fontiveros por enseñarme los truquillos del laboratorio y de las ratas. A Mamen porque siempre saca un huequito para escucharte y prestarte su ayuda desinteresada. A Javier Escamilla y a Carmen Moñino porque siempre están dispuestos a echarte una mano en lo que sea. A Carmen de Secretaría, por la eficiencia que muestra día a día en su trabajo. A Lola, por lo bien que desempeña su trabajo.

Al grupo de Javier Vitorica por los litros y litros de agua milli-q que tanto echamos de menos ahora... y por la disponibilidad y afabilidad que siempre han mostrado con mi trabajo.

Al grupo del Dr. Georg Arnold en el *Genzentrüm*, en Munich, Alemania por enseñarme una filosofía de trabajo distinta y por sus consejos durante los meses que formé parte de su laboratorio. A María Lucas por su sincera amistad en “tierras germanas”.

Al grupo del Dr. Vicente Felipe del Centro de Investigación Príncipe Felipe en Valencia, por su predisposición a enseñarme, sobre todo, el manejo de los cultivos celulares.

Al grupo del Dr. Jordi Muntané Relát en el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba por toda su generosidad para poner a nuestra disposición en cualquier momento sus instalaciones y sus equipos.

A Ana Mari, Paula y Andrés por vuestro cariño, interés y comprensión.

A mis suegros y a mis cuñados por su cariño y apoyo durante estos años.

A mis padres porque me han enseñado a valorar las pequeñas cosas, a esforzarme, a ver que existen diferentes prismas para afrontar la vida y a no rendirme nunca. Gracias por ser siempre mi gran apoyo, por vuestro cariño y por ser como sois.

De una manera especial, a mi marido, Luís, por su cariño, comprensión, por acompañarme en los madrugones, por hacerme sonreír, por ayudarme en todo lo que estaba en su mano y por servirme de apoyo cada día. Gracias por estar siempre conmigo.

A mis padres y a Luís,
gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN (ABSTRACT)	01
INTRODUCCIÓN	11
I. Notas preliminares	11
II. Encefalopatía Hepática	13
II.1.-Papel del amonio en la Encefalopatía Hepática.....	16
II.2.- Metabolismo cerebral del amonio.....	17
II.3.- Teoría de la hiperamonemia como una de las principales causas de la Encefalopatía Hepática.....	20
II.3.1.- Influencia del amonio en el metabolismo energético cerebral.....	20
II.3.2.- Influencia del amonio en la anatomía de los astrocitos.....	21
II.3.3.- Influencia del amonio en el desarrollo del edema de bajo grado (hinchazón ó <i>swelling</i>).....	22
II.3.4.- Influencia del amonio en moléculas relacionadas con la neurotransmisión.....	25
II.3.5.- Influencia del amonio en la homeostasis del óxido nítrico y del GMPc.....	28
II.3.6.- Influencia del amonio en el estrés oxidativo.....	30
III. Metodología aplicada en el análisis diferencial de proteínas	33
III.1.- <i>Differential In Gel Electrophoresis</i> (DIGE).....	34
IV. Una visión bioquímica global	39
IV.1.- Oxidación y rotura de la cadena polipeptídica.....	41
IV.2.- Carbonilación de proteínas.....	44
IV.3.- Tiol y tioésteres en las proteínas.....	45
IV.4.- Nitración de tirosinas (Nitrotirosinas).....	47
IV.5.- Entrecruzamiento de proteínas (<i>Protein crosslinking</i>).....	48
V. Metodología aplicada en Proteómica-redox	48
V.1.- Detección y cuantificación de los grupos carbonilo.....	49
I.2.- Enriquecimiento de proteínas carboniladas.....	51

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS	57
I. Procedencia de reactivos químicos, bioquímicos y aparatos	57
II. Material biológico: Operación de animales y extracción de tejido	57
II.1.- Animales experimentales.....	57
II.2.- Modelo experimental de anastomosis o derivación porto-cava	59
II.3.- Test de comportamiento: laberinto	60
II.4.- Aislamiento y recogida de muestras del tejido cerebral.....	61
II.5.- Preparación de las muestras para procedimientos analíticos.....	62
II.6.- Preparación de las muestras para procedimientos electroforéticos.	
Obtención del homogenado cerebral.....	64
III. Determinación de los parámetros bioquímicos	64
III.1.- Determinación de los niveles de amonio plasmático.....	64
III.2.- Determinación de la concentración de proteínas: Método de Bradford.....	65
III.3.- Determinación del estado oxidativo de las muestras: oxidantes activos.....	67
III.4.- Determinación de óxido nítrico	68
III.5.- Determinación de los niveles de TBARS.....	69
III.6.- Determinación de los niveles MDA	69
III.7.- Determinación de los niveles de HNE	70
III.8.- Determinación de los grupos carbonilo.....	71
IV. Técnicas analíticas	72
IV.1.- PAGE-SDS.....	72
IV.2.- Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida	73
IV.3.- Inmunoprecipitación de proteínas carboniladas con Dynabeads.....	75
IV.4.- Establecimiento de la cinética de marcaje con DNPH: Dot-Blot.....	77
IV.5.- Derivatización de las proteínas oxidadas.....	79
IV.6.- <i>Inmunoblotting</i>	80
IV.7.- Electroforesis bi-dimensional convencional y <i>Oxy-blot</i>	82
IV.8.- <i>Differential In Gel Electrophoresis</i> (DIGE).....	84
IV.9.- Análisis cuantitativo de las proteínas carboniladas.....	88
IV.10.- Identificación de <i>spots</i> de interés (oxidados) por	

espectrometría de masas.....	89
V. Análisis estadístico.....	92
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	93
I. Niveles de amonio en plasma y en el tejido cerebral.....	94
II. Hiperamonemia y estrés oxidativo.....	97
II.1.- Medida de “oxidantes activos” en el cerebro de ratas- <i>sham</i> y ratas- <i>dpc</i>	98
II.2.- Medida de los niveles de NO en el cerebro de ratas- <i>sham</i> y ratas- <i>dpc</i>	100
II.3.- Biomarcadores del daño celular.....	102
II.3.1.- Peroxidación lipídica.....	102
II.3.2.- Oxidación de proteínas.....	107
III. Estudio de la expresión diferencial de proteínas en el cerebro de ratas-<i>sham</i> y ratas-<i>dpc</i> mediante DIGE.....	111
IV. Modificaciones post-traduccionales en el cerebro de ratas-<i>sham</i> y ratas-<i>dpc</i>.....	125
IV.1.- Cinética de marcaje con dinitrofenil-hidracina (DNPH).....	125
IV.2.- Estudio previo de proteínas oxidadas: Aproximación 1D (PAGE-SDS)..	128
IV.3.- Abordaje oxi-proteómico de la modificación post-traduccional oxidativa (carbonilación) en cerebro de ratas- <i>sham</i> y ratas- <i>dpc</i>	132
IV.4.- Estudio de las alteraciones o modificaciones post-traduccionales.....	134
IV.4.1.- Estudio 2D-Oxy-blot e identificación de proteínas oxidadas en corteza cerebral de ratas- <i>sham</i> y ratas- <i>dpc</i>	134
IV.4.2.- Estudio 2D-Oxy-blot e identificación de proteínas oxidadas en cerebelo cerebral de ratas- <i>sham</i> y ratas- <i>dpc</i>	158
IV.5.- Resumen general de las funciones de las proteínas identificadas tanto en corteza como en cerebelo.....	174
CONCLUSIONES (CONCLUSIONS).....	185
PUBLICACIONES.....	189
BIBLIOGRAFÍA.....	193

ABREVIATURAS

Abreviatura (ordenado alfabéticamente)	
AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN _t	ARN transferente
BVA	<i>Biological Variation Analysis</i>
BZ sitio	Receptor con sitio de unión para benzodiazepinas
Cdc42	<i>Cell división control proteína 42 homolog</i>
Cdk5	Kinasa dependiente de ciclina 5
CHCA	Cyano-4-hydroxycinamico
2D	Electroforesis bidimensional (segunda dimensión)
DAB	Diamonibencidina
DCF	Diclorofluoresceína oxidada
DCFH	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	Diclorofluoresceína-diacetato
DE	Desviación estándar
DIA	<i>Differential In Gel Analysis</i>
DIGE	<i>Differential In Gel Electrophoresis</i>
DLAT	Dihidrolipoil acetiltransferasa
DLD	Dihidrolipoil deshidrogenasa
DMF	Dimetilformamida
DNP	Dinitrofenil
DNPH	2,4-Dinitrofenil hidracina (2,4-dinitrophenylhydrazine)
DTT	Ditiotreitól
E1	Enzima activadora de la ubiquitina
E2	Enzima conjugadora de la ubiquitina
E3	Ligasa de ubiquitina
EAAT(1,2)	Receptor de glutamato
EH	Encefalopatía Hepática
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FADH ₂	Flavin adenin dinucleótido
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
f _{ox}	Coefficiente de oxidación
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GABA _A	Receptor para GABA
GAD	Glutamato descarboxilasa
GAP	Glutaminasa mitocondrial activada por fosfatos
GDP	Guanosina di-fosfato
GFAP	Proteína ácido fibrilar
GH o STH	Hormona del crecimiento (somatotropina)
GLDH	Glutamato deshidrogenasa
GLUT1	Receptor de glucosa

GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
G _o	Subunidad α de la proteína G
GS (Glul)	Glutamina sintetasa o glutamato-amonio ligasa
GSs	Guanilato ciclasa soluble
GTP	Guanosina tri-fosfato
HNE	4-hidoxi-2-nonenal (<i>4-hydroxy-2-nonenal</i>)
HO-1	Hemo-oxigenasa
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
hsp	<i>Heat shock protein</i>
5-HT	Serotonina (5-hydroxytryptamina)
IDH3	Isocitrato deshidrogenasa 3
IEF	Primera dimensión o Isoelectroenfoque
IL-1β	Interleuquina 1 beta
IL-6	Interleuquina 6
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
JNK	C-Junk-n-terminal kinasa
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography mass/mass</i>
MALDI-TOF	Ionización desorción asistida por láser con una matriz (<i>Matrix-assisted-laser-desorption-ionization</i>)
MAO	Monoamina oxidasa
MAPs kinasas	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MDA	Malondialdehído (<i>malondialdehyde</i>)
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
MS (SM)	Espectrometría de masas (<i>spectrometry of mass</i>)
MSO	Metionina sulfoximina
NADH/NAD ⁺	Nicotina adenina dinucleótido
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDA _R	Receptor de glutamato
NOS	Óxido nítrico sintetasa
NOSI	Óxido nítrico sintetasa neuronal
NOSII ó iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
NS sitio	Receptor con sitio de unión para neuroesteroides
NSF	<i>N-ethylmaleimide sensitive fusión protein</i>
O-ECAT	<i>Oxidation dependent element coded affinity tags</i>
P _A	Proteína A
PAGE-SDS	Geles de poliacrilamida en presencia de sodium dodecil sulfato
P _D	Proteína D
pI	Punto isoeléctrico
PMF	Huella peptídica (<i>Peptide mass fingerprinting</i>)
POI	Puntos de interés
PSA	Aminopeptidasa sensible a purinomicina
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
Ratas- <i>dpc</i>	Ratas con derivación porto-cava

Ratas- <i>sham</i>	Ratas controles
RPB	Receptor periférico de benzodiazepinas
RP-HPLC	<i>Reverse phase-high performance liquid chromatography</i>
SDS	Sodium dodecil sulfato
SEPT2	Septina 2
SEPT3	Septina 3
SEPT5	Septina 5
SEPT6	Septina 6
SEPT7	Septina 7
SEPT8	Septina 8
SNAP2	<i>Alpha-soluble NSF-attachment protein 2</i>
SNAP-25	<i>Synaptosomal-associated protein 25</i>
SNARE	Sintaxina, SNAP-25 y sinaptobrevina
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
STY	Serinas/treoninas/tirosinas
TBARS	Susustancias ácido tiobarbitúricas reactivas (<i>thiobarbituric acid</i>)
TCA	Tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRH	Hormona liberadora de tiotropina
TSH	Hormona estimulante del tiroides
α -SNAP	<i>NSF-attachment protein</i>

FIGURAS

Figura-I1	Estado de equilibrio oxidación-antioxidantes	Página 11
Figura-I2	Clasificación de la Encefalopatía Hepática	Página 14
Figura-I3	Representación esquemática de la circulación del amonio entre los diferentes tejidos implicados en su metabolismo	Página 17
Figura-I4	Comunicación entre las neuronas, los astrocitos y el endotelio vascular	Página 19
Figura-I5	Reacciones enzimáticas desarrolladas por la glutamina sintetasa y la glutaminasa	Página 19
Figura-I6	Modulación del receptor de GABA _A mediante el neuroesteroide pregnenolona	Página 23
Figura-I7	Modulación tanto de la ruta excitatoria (glutamatérgica) como inhibitoria (GABAérgica) en la comunicación neurona-astrocito como astrocito-neurona	Página 26
Figura-I8	Representación esquemática de la ruta de señalización del glutamato entre neurona-astrocito y entre astrocito-astrocito mediada por receptores NMDA tanto en la neurona post-sináptica como en los astrocitos	Página 29
Figura-I9	Liberación del glutamato por el terminal presináptico para estimular el receptor de glutamato NMDA post-sináptico	Página 31
Figura I10	Ventajas e inconvenientes de ambas técnicas	Página 33
Figura-I11	Reacción del fluoróforo con un resto de lisina (<i>minimal labeling</i>)	Página 35
Figura-I12	Espectro de excitación y emisión (coloreado) para CyDye DIGE Fluor Cy2, Cy3, Cy5	Página 36
Figura-I13	Estructura de los fluoróforos derivados de cianinas (<i>cyanine dyes</i>)	Página 37
Figura-I14	Esquema general del método <i>Differential In Gel Electrophoresis</i> (DIGE).	Página 38
Figura-I15	Especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN)	Página 40
Figura-I16	Relación entre la continuidad de las modificaciones redox, los niveles de ERO/ERN y sus consecuencias	Página 41
Figura-I17	Esquemas de las vías de la diamida y de la α -amidación	Página 42
Figura-I18	Rotura de la cadena polipeptídica por oxidación de restos aminoacídicos de glutámico y prolina	Página 43
Figura-I19	Esquema de la β -escisión	Página 43
Figura-I20	Carbonilación de la cadena lateral de restos aminoacídicos	Página 44
Figura-I21	Introducción de grupos carbonilos entre las proteínas por la adición de 4-hidroxi-2-nonenal sobre restos de cisteína, histidina o lisina a través	Página 45

	de una adición tipo Michel	
Figura-I22	Principales productos de oxidación de los restos de cisteína	Página 46
Figura-I23	Productos de oxidación a que puede dar lugar la metionina	Página 47
Figura-I24	Formación de la 3-nitrotirosina	Página 47
Figura-I25	Esquema de la estructura de la 2,4-dinitrofenil-hidracina (DNPH)	Página 49
Figura-I26	Esquema de la estructura del reactivo Biotin hydrazide utilizado para el marcaje específico de las proteínas carboniladas separadas mediante 2D	Página 50
Figura-I27	Aislamiento de la proteína diana utilizando el anticuerpo específico y Dynabeads	Página 53
Figura-I28	Esquema de la estructura del reactivo de Girad-P desarrollado por el equipo de Reginier	Página 53
Figura-I29	Esquema de la estructura común de los denominados O-ECAT	Página 53

Figura-M&M1	Esquema del planteamiento experimental en el modelo de EH con derivación porto-cava	Página 58
Figura-M&M2	Operación de anastomosis	Página 60
Figura-M&M3	Esquema de las diferentes áreas cerebrales, de rata, utilizadas en el estudio	Página 62
Figura-M&M4	Esquema del método de obtención del homogenado cerebral	Página 63
Figura-M&M5	Curva patrón del método de Bradford	Página 67
Figura-M&M6	Esquema del fundamento teórico del método de la DCFH-DA	Página 68
Figura-M&M7	Esquema de la reacción de Griess	Página 69
Figura-M&M8	Esquema de la inmunoprecipitación usando Dynabeads	Página 76
Figura-M&M9	Representación esquemática de la técnica de <i>Inmunoblotting</i>	Página 81
Figura-M&M10	Esquema del sistema de transferencia o sandwich	Página 82
Figura-M&M11	Esquema del análisis en DeCyder	Página 89
Figura-M&M12	Esquema general seguido para la identificación de las proteínas en los spots de interés	Página 90
Figura-M&M13	Resumen ilustrativo desde la preparación de la matriz hasta la coloración de la placa en el MALDI-TOF	Página 92

Figura-R&D1	Grupos de animales utilizados en el presente estudio	Página 93
Figura-R&D2	Niveles de amonio plasmático en ratas- <i>sham</i> y ratas- <i>dpc</i>	Página 95

Figura-R&D3	Niveles de amonio en el tejido cerebral en ratas- <i>sham</i> y ratas- <i>dpc</i>	Página 96
Figura-R&D4	Concentración de amonio en corteza cerebral, cerebelo e hipocampo de ratas- <i>sham</i> y - <i>dpc</i>	Página 97
Figura-R&D5	Producción de “oxidantes activos” en el cerebro de ratas- <i>sham</i> y ratas con derivación porto-cava (<i>dpc</i>)	Página 99
Figura-R&D6	Producción de NO en el cerebro de ratas- <i>sham</i> y ratas con derivación porto-cava (<i>dpc</i>)	Página 101
Figura-R&D7	Niveles de TBARS en el cerebro de ratas- <i>sham</i> y ratas- <i>dpc</i>	Página 103
Figura-R&D8	Niveles de MDA en el cerebro de ratas- <i>sham</i> y ratas- <i>dpc</i>	Página 105
Figura-R&D9	Niveles de HNE en el cerebro de ratas- <i>sham</i> y ratas- <i>dpc</i>	Página 107
Figura-R&D10	Concentración de grupos carbonilos en las proteínas de cerebro de ratas- <i>sham</i> y ratas- <i>dpc</i>	Página 108
Figura-R&D11	Imágenes DIGE de la corteza cerebral de rata marcado con fluoróforos (marcaje mínimo)	Página 118
Figura-R&D12	Imágenes DIGE del cerebelo de rata marcado con fluoróforos (marcaje mínimo)	Página 119
Figura-R&D13	Resultados DeCyder BVA muestran ciertas diferencias en determinados <i>spots</i>	Página 120
Figura-R&D14	Estudio de los <i>spots</i> con diferencias individuales	Página 121
Figura-R&D15	Valores de los parámetros del <i>spot</i> A en DIA	Página 122
Figura-R&D16	<i>Immunoblotting</i> con proteínas citoplasmáticas (S2) de la corteza cerebral (3µg/muestra)	Página 126
Figura-R&D17	Niveles de los grupos carbonilo tanto en ratas- <i>sham</i> como en ratas- <i>dpc</i> marcados a distintos tiempos de incubación con DNPH	Página 127
Figura-R&D18	Proteínas de cerebro de homogenado total (SDS-PAGE T12%, C3,5%) y proteínas oxidadas (5 min de marcaje con DNPH) de ratas- <i>dpc</i> y ratas- <i>sham</i>	Página 130
Figura-R&D19	Derivatización de una proteína con un grupo carbonilo por la 2,4-dinitrofenilhidrazina para formar una base de Schiff, la 2,4-dinitrofenilhidrazona	Página 133
Figura-R&D20	Análisis representativo de 2D- <i>Oxyblot</i> de proteínas de corteza cerebral de ratas- <i>dpc</i> de 6 semanas	Página 136
Figura-R&D21	Clasificación de las proteínas identificadas en corteza cerebral de ratas- <i>dpc</i> según su relación con diferentes funciones celulares	Página 137
Figura-R&D22	Secuencia peptídica de la subunidad G ₀ de la proteína G	Página 138
Figura-R&D23	Esquema de los receptores metabotrópicos e inotrópicos de GABA	Página 139
Figura-R&D24	Secuencia peptídica de la enzima activadora de la ubiquitina(E1)	Página 142

Figura-R&D25	Secuencia peptídica de la proteína Grp 75	Página 143
Figura-R&D26	Secuencia peptídica de la aminopeptidasa sensible a purinomicina	Página 144
Figura-R&D27	Secuencia peptídica de la dihidrolipoilil acetiltransferasa	Página 146
Figura-R&D28	Secuencia peptídica del precursor de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial	Página 147
Figura-R&D29	Secuencia peptídica del precursor de la ARNt-alanina sintetasa	Página 148
Figura-R&D30	Secuencia peptídica del precursor mitocondrial del factor de elongación Tu	Página 149
Figura-R&D31	Secuencia peptídica de la glutamina sintetasa	Página 150
Figura-R&D32	Secuencia peptídica de la ATPasa de vesícula de fusión	Página 153
Figura-R&D33	Secuencia peptídica de la α -internexina	Página 155
Figura-R&D34	Secuencia peptídica de la rCG49429	Página 155
Figura-R&D35	Secuencia peptídica de la septina 3	Página 156
Figura-R&D36	Secuencia peptídica de la septina 5	Página 157
Figura-R&D37	Secuencia peptídica de la septina 6	Página 158
Figura-R&D38	Análisis representativo de 2D-Oxyblot de proteínas del cerebelo de ratas- <i>dpc</i> de 6 semanas	Página 161
Figura-R&D39	Clasificación de las proteínas identificadas en cerebelo de ratas- <i>dpc</i> según su relación con diferentes funciones celulares	Página 162
Figura-R&D40	Secuencia peptídica de la proteína Snap2	Página 163
Figura-R&D41	Secuencia peptídica de la aminopeptidasa B	Página 165
Figura-R&D42	Secuencia peptídica de la albúmina sérica	Página 166
Figura-R&D43	Secuencia peptídica de la tubulina	Página 167
Figura-R&D44	Secuencia peptídica de la espectrina	Página 169
Figura-R&D45	Secuencia peptídica de la proteína rCG46767	Página 170
Figura-R&D46	Secuencia peptídica de la lactato deshidrogenasa	Página 171
Figura-R&D47	Secuencia peptídica de la isocitrato deshidrogenasa 3	Página 173
Figura-R&D48	Secuencia peptídica de la creatina kinasa	Página 174
Figura-R&D49	Distribución porcentual según su función de las proteínas oxidadas en la corteza cerebral y cerebelo de ratas- <i>dpc</i>	Página 178
Figura-R&D50	Representación esquemática de posibles mecanismos del transporte axónico	Página 183

TABLAS

Tabla-M&M1	Soluciones del método de Bradford	Página 66
Tabla-M&M2	Esquema del protocolo para el método de Bradford	Página 66
Tabla-M&M3	Composición de los geles discontinuos de poliacrilamida.	Página 72
Tabla-M&M4	Diseño experimental de las muestras de corteza cerebral o de cerebelo de ratas- <i>dpc</i> y de ratas- <i>sham</i>	Página 86
Tabla-R&D1	Niveles plasmáticos de amonio en ratas controles (ratas- <i>sham</i>) y con derivación porto-cava (ratas- <i>dpc</i>)	Página 94
Tabla-R&D2	Niveles de amonio en el homogenado de cerebro de ratas controles (ratas- <i>sham</i>) y con derivación porto-cava (ratas- <i>dpc</i>)	Página 94
Tabla-R&D3	Niveles de amonio en el tejido cerebral y plasmático en ratas controles (ratas- <i>sham</i>) y ratas hiperamonémicas (ratas- <i>dpc</i>)	Página 95
Tabla-R&D4	Producción de NO en el cerebro de ratas- <i>sham</i> y ratas- <i>dpc</i>	Página 100
Tabla-R&D5	Niveles de TBARS en el cerebro de ratas- <i>sham</i> y ratas- <i>dpc</i>	Página 103
Tabla-R&D6	Niveles de MDA en el cerebro de ratas- <i>sham</i> y ratas- <i>dpc</i>	Página 104
Tabla-R&D7	Niveles de HNE en el cerebro de ratas- <i>sham</i> y ratas- <i>dpc</i>	Página 105
Tabla-R&D8	Medida de peroxidación lipídica mediante distintos biomarcadores: TBARS, MDA y HHNE, en ratas controles (ratas- <i>sham</i>) y ratas hiperamonémicas (ratas- <i>dpc</i>)	Página 106
Tabla-R&D9	Contenido de grupos carbonilos en las proteínas del cerebro de ratas- <i>sham</i> y ratas- <i>dpc</i>	Página 108
Tabla-R&D10	Abundancia relativa de los <i>spots</i> E, F y G en cada uno de los geles	Página 123
Tabla-R&D11	Proteínas identificadas en las muestras DPC-8 (rata- <i>dpc</i>) y C-9 (rata- <i>sham</i>)	Página 124
Tabla-R&D12	Valores de la cinética de marcaje con DNPH a distintos tiempos	Página 127
Tabla-R&D13	Proteínas oxidadas diferencialmente en la corteza cerebral de ratas- <i>dpc</i> a las 6 semanas	Página 135
Tabla-R&D14	Proteínas oxidadas diferencialmente en el cerebelo de ratas- <i>dpc</i> a las 6 semanas	Página 160

RESUMEN (ABSTRACT)

RESUMEN

En esta Tesis se ha estudiado el efecto del estrés oxidativo inducido por un estado de hiperamonemia, utilizando como modelo animal ratas con derivación porto-cava (ratas-*dpc*). El objetivo principal ha sido ver como se afecta la expresión de proteínas en el cerebro de ratas-*dpc* y cual es la correlación existente entre estas posibles alteraciones y la sintomatología y/o base de la Encefalopatía Hepática (EH).

Para ello, en primer lugar se ha procedido a la confirmación de que el modelo animal empleado, ratas con derivación porto-cava, era un buen modelo para el estudio de la hiperamonemia asociada a EH. La observación de que las ratas-*dpc* presentan niveles de amonio en el plasma ($303,98 \pm 13,56 \mu\text{mol/l}$ frente $97,50 \pm 9,23 \mu\text{mol/l}$) y en el cerebro ($8,39 \pm 1,078,39 \pm 1,07 \mu\text{mol/g}$ de tejido frente a $3,44 \pm 0,56 \mu\text{mol/g}$ de tejido) significativamente mayor que el encontrado en las ratas controles operadas, pero sin practicar la derivación porto-cava (ratas-*sham*), y el comportamiento anómalo en el laberinto (test de aprendizaje: Y Maze test), indican que las ratas-*dpc* muestran un comportamiento propio de la EH.

Establecido el hecho de que los animales eran hiperamonémicos, que presentaban sintomatología propia de la Encefalopatía Hepática, y teniendo en cuenta que concentraciones altas de amonio (hiperamonemia) podrían causar estrés oxidativo, fundamentalmente a nivel del cerebro, procedimos a investigar esta hipótesis en el modelo animal citado. Para lo que, inicialmente, centramos nuestra atención en el estudio de la producción de oxidantes activos y de marcadores de estrés oxidativo relacionados con los lípidos y las proteínas.

La producción de oxidantes activos se ha llevado a cabo mediante el método de la diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA), observándose que la

producción de este tipo de sustancias es significativamente mayor en las ratas-*dpc* (247%) que en la ratas-*sham* (100%).

Dado que el método de la DCFH-DA mide fundamentalmente las especies reactivas de oxígeno (ERO), se procedió a medir la producción de óxido nítrico (NO) como índice de producción de las especies reactivas de nitrógeno (ERN), observándose que la producción de NO en la ratas-*dpc* era significativamente mayor que en las ratas-*sham* ($21,80 \pm 1,57$ $\mu\text{moles/mg}$ proteína frente a $14,76 \pm 1,26$ $\mu\text{moles/mg}$ proteína, respectivamente).

La oxidación lipídica se ha medido por tres métodos diferentes: sustancias ácido tiobarbitúrico reactivas (TBARS), malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), obteniéndose, en todos los casos, mayores índices de oxidación lipídica en las ratas-*dpc* que en las ratas-*sham*: $0,180 \pm 0,020$ $\mu\text{moles eq-MDA/mg}$ proteína frente a $0,112 \pm 0,023$ $\mu\text{moles eq-MDA/mg}$ proteína; $0,062 \pm 0,006$ $\mu\text{moles MDA/mg}$ proteína frente a $0,021 \pm 0,004$ $\mu\text{moles MDA/mg}$ proteína y $0,018 \pm 0,003$ $\mu\text{moles HNE/mg}$ proteína frente a $0,008 \pm 0,002$ $\mu\text{moles HNE/mg}$ proteína, respectivamente.

La oxidación de proteínas se ha estudiado midiendo los niveles de grupos carbonilos. La determinación del contenido en grupos carbonilos se ha llevado a cabo mediante el método de dinitrofenil hidrazina (DNPH), observándose que la oxidación de restos aminoácidos en las proteínas de las ratas-*dpc* es significativamente mayor en las proteínas de las ratas-*sham*, $4,70 \pm 0,57$ nmoles/mg proteína frente a $2,72 \pm 0,24$ nmoles/mg proteína, respectivamente.

Estos resultados apuntan claramente hacia una participación directa del estrés oxidativo en las ratas-*dpc*, pero no nos dicen nada sobre los mecanismos y proteínas/enzimas implicados en el desarrollo fisiopatológico de la EH.

Con el fin de investigar qué proteínas/enzimas podrían estar implicadas en la fisiopatología observada en las ratas-*dpc* hemos procedido a estudiar la

expresión diferencial de proteínas en ratas-*dpc* y ratas-*sham*, ya que una expresión diferencial de proteínas/enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno, sistemas antioxidantes celulares, receptores de membrana y/o relacionadas con el hinchamiento de los astrocitos, podrían contribuir a explicar y entender mejor la fisiopatología de la EH. Además, teniendo en cuenta que dichas alteraciones también podrían ser debidas a modificaciones post-traduccionales, fundamentalmente oxidativas, también han sido estudiadas.

La expresión diferencial de proteínas en el cerebro de ratas-*dpc* y ratas-*sham* se ha estudiado en dos centros: corteza cerebral y cerebelo, mediante la técnica de DIGE (*Differential In Gel Electrophoresis*) y marcaje mínimo (*minimal label*), ya que mediante esta técnica se minimizan los errores instrumentales, de manipulación e interpretación de resultados. De los resultados obtenidos, tanto en corteza cerebral como en cerebelo, no podemos concluir que exista una expresión de proteínas estadísticamente significativa entre las ratas-*dpc* y las ratas-*sham*. Si bien, sí hemos observado una expresión diferencial sistemática para un grupo de proteínas relacionadas con la EH.

El estudio de la oxidación de proteínas (carbonilación) en el cerebro de ratas-*dpc* y ratas-*sham* mediante técnicas oxi-proteómicas utilizando la DNPH como marcador de grupos carbonilos, revela que las proteínas del cerebro de ratas-*dpc* están más oxidadas que las del cerebro de ratas-*sham* ($4,70 \pm 0,57$ nmoles/mg proteína frente a $2,72 \pm 0,24$ nmoles/mg proteína, respectivamente). Además, no todas las proteínas del cerebro son igual de sensibles frente a los oxidantes activos (ERO y ERN, fundamentalmente) y que al menos 6 bandas (proteínas), en un gel 1D, (correspondientes a las bandas de 170, 120, 87, 54, 47 y 38 kDa) son más sensibles a la oxidación que el resto de proteínas (bandas). Así pues estas proteínas muestran un factor de oxidación (f_{ox}) mayor en las muestras de ratas-*dpc* que en las ratas-*sham*, lo que corrobora el estado de estrés oxidativo en las ratas-*dpc*. El estudio detallado de la oxidación de proteínas en el cerebro se ha llevado a cabo en la corteza cerebral y en el cerebelo mediante la técnica 2D-Oxy-blot.

Mediante el análisis de la oxidación de proteínas en cerebro mediante 2D Oxyblot hemos encontrado 16 spots en corteza (Tabla 1) y 12 spots en cerebelo (Tabla 2) que presentan un factor de oxidación (f_{ox}) mayor en ratas-*dpc* con respecto a ratas-*sham*. Las proteínas que se han identificado a partir de esos spots mediante espectrometría de masas se muestran en las tablas indicadas.

La derivación porto-cava en ratas es un buen modelo de EH. Las ratas-*dpc* muestran un claro estado de estrés oxidativo comprobado con los correspondientes biomarcadores (peroxidación lipídica y oxidación de proteínas). En el estudio de expresión diferencial de proteínas mediante la técnica del DIGE no se ha encontrado diferencias estadísticamente significativas ni en cerebelo ni en corteza. El estudio de modificaciones post-traduccionales oxidativas (carbonilación) mediante técnicas proteómicas (*Redox-proteomic*) revela que las ratas-*dpc* presentan un mayor nivel de oxidación que los animales control (ratas-*sham*) y que no todas las proteínas se oxidan por igual, habiendo proteínas más sensibles a la oxidación que otras. En este estudio hemos identificado 14 proteínas oxidadas en corteza y 12 en cerebelo: el 33% implicadas en el metabolismo energético; el 8% relacionadas con las proteínas de unión; el 8% implicadas en el transporte mediado por vesículas; el 33% forman parte del citoesqueleto; el 8% implicadas en la regulación de la expresión génica; el 5% relacionadas con la maquinaria implicada en la degradación de proteínas; y el 5% en otras funciones. La alteración de la mayor parte de estas proteínas puede relacionarse con la fisiopatología de la EH.

Tabla 1. Proteínas oxidadas diferencialmente en la corteza cerebral de ratas-dpc.

Nº de acceso	Proteína identificada	Protein score	Punto isoelectrico (pI)	Peso molecular (Da)
gi 149032469	guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	453	5.18	40613.1
gi 62078893	ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	252	5.36	118910.4
gi 1000439	grp75	706	5.87	73983.9
gi 149054035	aminopeptidase puromycin sensitive	265	5.24	93358.2
gi 78365255	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	249	8.76	67636.6
gi 45737866	mitochondrial aldehyde dehydrogenase precursor	410	6.69	56079.4
gi 209862801	alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	521	5.41	107521.5
gi 157820845	elongation factor Tu, mitochondrial precursor	669	7.23	49890.1
gi 38181948	Glul protein	454	6.47	42982.6
gi 13489067	vesicle-fusing ATPase	352	6.55	83170.2
gi 9506811	alpha-internexin	804	5.2	56252.7
gi 9506811	alpha-internexin	886	5.2	56252.7
gi 149017236	rCG49429	450	5.33	25374.7
gi 149065791	septin 3, isoform CRA_a	152	6.04	34509.5
gi 19909845	CDCrel-1AI	291	6.21	42486.6
gi 149060015	rCG53214, isoform CRA_a	340	6.23	49441.1

Tabla 2. Proteínas oxidadas diferencialmente en el cerebelo de ratas-dpc.

Nº de acceso	Proteína identificada	Protein score	Punto isoelectrico (pI)	Peso molecular (Da)
gi 47477769	Snap2 protein	311	5.19	283004.3
gi 9506811	alpha-internexin	427	5.2	56252.7
gi 149032469	guanine nucleotide binding protein, alpha o, isoform CRA_b	659	5.18	35118.1
gi 38512104	Arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)	297	5.47	73355.6
gi 158138568	serum albumin precursor	475	6.09	70709.9
gi 38328248	Tubulin, alpha 1A	396	4.94	50815.9
gi 31543764	spectrin alpha chain, brain	970	5.19	285218.4
gi 149064296	rCG46767, isoform CRA_c	571	5.11	66873.8
gi 6981146	L-lactate dehydrogenase B chain	308	5.7	36874.2
gi 290677865	Septin 6, rCG53214 isoform CRA_a	397	6.23	49146
gi 149041704	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha, isoform CRA_f	614	5.87	39408.9
gi 56388799	Ckb protein	288	5.4	45561.8

ABSTRACT

In this Thesis the effects of oxidative stress induced by hyperammonemia have been studied. For this purpose, the portacava-shunted animal model (*pcs-rats*) have been used. The major aim in this work has been the analysis of protein expression in the brain of *pcs-rats* and the correlation between these alterations and the physiopathology of the Hepatic Encephalopathy (EH).

First of all, we have confirmed that the experimental strategy, portacava-shunted, is a suitable model to study EH-associated hyperammonemia. The ammonia level in plasma ($303,98 \pm 13,56 \mu\text{mol/l}$ versus $97,50 \pm 9,23 \mu\text{mol/l}$) and in brain ($8,39 \pm 1,078,39 \pm 1,07 \mu\text{mol/g}$ tissue versus $3,44 \pm 0,56 \mu\text{mol/g}$ tissue) were higher in *pcs-rats* compared with *sham-rats* (simulated-operated rats without portocava-shunted ligation). Furthermore, the behavior in the learning test, Y maze test, is a well-defined marker for HE.

Once it has been established that TAA-rats were hyperammonemic, and that animals showed behaviours and hallmarks typical of HE, we tested if the high level of ammonia produced could induce oxidative stress in the brain. For this purpose the production of active oxidants and biomarkers of oxidative stress in lipids and proteins have been quantified.

Levels of active oxidants have been determined by diclorofluorescein-diacetate method (DCFH-DA), and the generation of these substances was higher in *pcs-rats* (247%) than in *sham-rats* (100%)

Since the DCFH-DA method mainly measures ROS (reactive oxygen species), we decided to investigate the production of RNS (reactive nitrogen species) using NO (nitric oxide) as an appropriate marker. Results shown that the production of NO in *pcs-rats* was higher than in *sham-rats* ($21,80 \pm 1,57 \mu\text{mol/mg}$ protein versus $14,76 \pm 1,26 \mu\text{mol/mg}$ protein).

Lipid peroxidation has been analyzed using different methods: TBARS (thiobarbituric acid), MDA (malondialdehyde) and HNE (4-hydroxy-2-nonenal). In all cases, we found higher levels in *pcs*-rats than *sham*-rats (0.18 ± 0.02 $\mu\text{mol eq-MDA/mg protein}$ versus 0.112 ± 0.023 $\mu\text{mol eq-MDA/mg protein}$; 0.062 ± 0.006 $\mu\text{mol MDA/mg protein}$ versus 0.021 ± 0.004 $\mu\text{mol MDA/mg protein}$; and 0.018 ± 0.003 $\mu\text{mol HNE/mg protein}$ versus 0.008 ± 0.002 $\mu\text{mol HNE/mg protein}$, severally).

Protein oxidation has been studied through the quantification of carbonil groups, by 2,4-dinitrophenylhydrazine method (DNPH). Results shown higher level of protein oxidation in *pcs*-rats (4.70 ± 0.57 nmol/mg protein) as compared with *sham*-rats (2.72 ± 0.24 nmol/mg protein).

From these data we concluded that hyperammonemia promotes oxidative stress. Thus, we explored the mechanisms and proteins involved in this process.

We studied differential protein expression in *pcs*-rats and *sham*-rats trying to identify the proteins/enzymes that can be implicated in the physiopathology of HE due to hyperammonemia. The value of this study is that the differential expression of proteins/enzymes involved in the nitrogen metabolism, cellular antioxidative process, membrane receptors of and/or related with astrocytes swelling, could contribute to explain and understand the physiopathology of HE. Moreover, taken into consideration that these alterations could be due post-translational modifications, we also studied oxidative post-translational modification.

Differential protein expression profile has been studied in cortex and cerebellum samples from *pcs* and *sham*-rats by DIGE method (Differential In Gel Electrophoresis) using minimal label, trying to minimize the experimental error of handling and better performance of the technique.

No significant differences in protein expression in *pcs* and *sham*-rats were found. However, we observed a systematic differential expression, although no statistically significant, for a group of proteins related with HE.

Protein oxidation analysis (carbonylation) from the brain of *pcs*- and *sham*-rats by oxyproteomic techniques using DNPH as labeling agent reveal that brain proteins in *pcs*-rats are more oxidized than in *sham*-rats (4.70 ± 0.57 nmol/mg protein versus 2.72 ± 0.24 nmol/mg protein, respectively; $p < 0.05$). Besides, brain proteins had different sensitivity for active oxidants (ROS and RNS) and at least 6 bands –proteins- (corresponding to proteins of 170, 120, 87, 54, 47 and 38 kDa) of a 1-D gel are more sensitive at oxidation than the other proteins. Moreover, these proteins showed a statistically significant higher oxidation factor (f_{ox}) in *pcs*-rats compared to *sham*-rats. These results corroborate the existence of an oxidative stress status in the brain of *pcs*-rats.

The detailed study of protein oxidation in brain tissue of *pcs*- and *sham*-rats by 2D oxyblot technique showed 16 spots in cortex (Table 1) and 12 spots in cerebellum (Table 2) with a statistically significant higher oxidation factor (f_{ox}) in samples from *pcs*-rats than in *sham*-rats samples. Proteins present in the spots were identified by mass spectrometry (SM) and bioinformatics techniques:

Portacaval-anastomosis (*pcs*) is a suitable animal model for HE. According to oxidative biomarkers (lipid peroxidation and protein oxidation), *pcs*-rats show a clear oxidative stress induction. There are not significant differences in protein expression in samples from cortex and cerebellum analyzed by DIGE. The analysis performed by redox-proteomics of oxidative post-translational modification (carbonylation) showed increased and differential levels of protein oxidation in *pcs*-rats. We identified 14 and 12 oxidized proteins in cortex and cerebellum, respectively: 33% implicated in energy-related metabolism; 8% related with binding proteins; 8% related with vesicle trafficking-mediated transport; 33% were members of cytoskeleton; 8% were related with gene expression regulation; 5% were involved in proteolytic degradation processes (proteasome); 5% were involved in other functions. Changes in the most of these proteins could be related with the pathophysiology of EH.

Table 1. Differential oxidated proteins in cortex of *pcs*-rats.

Accession number	Identified protein	Protein score	Isoelectric point (pI)	Molecular weight (Da)
gi 149032469	guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	453	5.18	40613.1
gi 62078893	ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	252	5.36	118910.4
gi 1000439	grp75	706	5.87	73983.9
gi 149054035	aminopeptidase puromycin sensitive	265	5.24	93358.2
gi 78365255	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	249	8.76	67636.6
gi 45737866	mitochondrial aldehyde dehydrogenase precursor	410	6.69	56079.4
gi 209862801	alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	521	5.41	107521.5
gi 157820845	elongation factor Tu, mitochondrial precursor	669	7.23	49890.1
gi 38181948	Glul protein	454	6.47	42982.6
gi 13489067	vesicle-fusing ATPase	352	6.55	83170.2
gi 9506811	alpha-internexin	804	5.2	56252.7
gi 9506811	alpha-internexin	886	5.2	56252.7
gi 149017236	rCG49429	450	5.33	25374.7
gi 149065791	septin 3, isoform CRA_a	152	6.04	34509.5
gi 19909845	CDCrel-1AI	291	6.21	42486.6
gi 149060015	rCG53214, isoform CRA_a	340	6.23	49441.1

Table 2. Differential oxidated proteins in cerebellum of *pcs*-rats.

Accession number	Identified proteins	Protein score	Isoelectric point (pI)	Molecular weight (Da)
gi 47477769	Snap2 protein	311	5.19	283004.3
gi 9506811	alpha-internexin	427	5.2	56252.7
gi 149032469	guanine nucleotide binding protein, alpha o, isoform CRA_b	659	5.18	35118.1
gi 38512104	Arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)	297	5.47	73355.6
gi 158138568	serum albumin precursor	475	6.09	70709.9
gi 38328248	Tubulin, alpha 1A	396	4.94	50815.9
gi 31543764	spectrin alpha chain, brain	970	5.19	285218.4
gi 149064296	rCG46767, isoform CRA_c	571	5.11	66873.8
gi 6981146	L-lactate dehydrogenase B chain	308	5.7	36874.2
gi 290677865	Septin 6, rCG53214 isoform CRA_a	397	6.23	49146
gi 149041704	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha, isoform CRA_f	614	5.87	39408.9
gi 56388799	Ckb protein	288	5.4	45561.8

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN.

I. Notas preliminares.

La oxidación de proteínas se ha venido considerando durante mucho tiempo como dañina, irreversible, conduciendo finalmente a la inactivación, degradación y eliminación de las proteínas (**Stadtman 2006, 1992; Grune et al., 2003, 1997; Bautista et al., 2000**).

A partir de los estudios sobre la oxidación de proteínas realizados durante décadas, la oxidación de proteínas se contempla como un fenómeno de doble cara:

- Por un lado, los mecanismos de oxidación forman parte de muchos procesos de regulación fisiológicos (independientemente de los procesos de conversión energética), tales como modulación de la actividad enzimática (**Claiborne, 1993**), procesos de transducción de señales (**Finkel, 2000; Herrlich and Boehmer, 2000**) o regulación génica (**Allen and Tresini, 2000; Rahman and MacNee, 2000; Morel and Barouki, 1999; Sun and Oberley, 1997**).

- Por otro lado, las modificaciones oxidativas también aparecen cuando el estado de estrés oxidativo supera las defensas antioxidantes, conduciendo a daño molecular (**Figura-I1**) (**Forrester and Stamler, 2007; Shacter, 2000**).

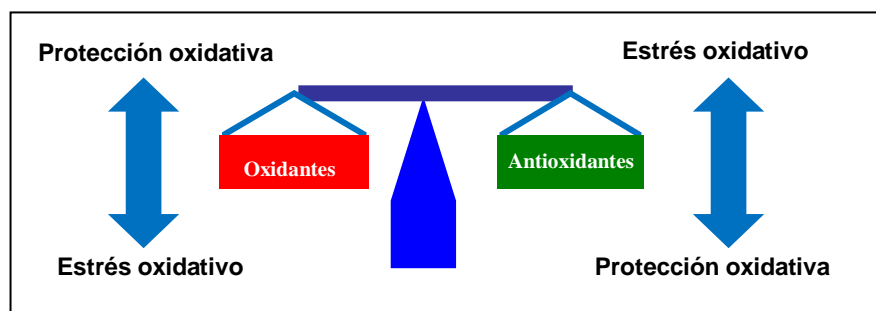


Figura-I1. Estado de equilibrio oxidación-antioxidantes.

La respuesta de los organismos vivos al estrés oxidativo es de gran importancia para entender los procesos de defensa celulares, así como el envejecimiento (**Macario and de Macario, 2005; Levine and Stadtman; 2001; Sohal, 2000; Berlett and Stadtman, 1997**). Se ha demostrado que la alteración del metabolismo oxidativo normal, o los daños debidos al estrés oxidativo, también desempeñan un papel importante en un amplio número de enfermedades, que van desde enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer (**Butterfield, 2004, 2003; Butterfield et al., 2002, 2001; Choi et al., 2002; Varadarajan et al., 2000**) hasta varios tipos de cáncer (**Kinnula and Crapo, 2004; Cerutti, 1994, 1991, 1985**), diabetes (**Dalle-Donne et al., 2003b; Baynes, 1991; Wolff et al., 1991**), aterosclerosis (**Mertens and Holvoet, 2001; Jurgens et al., 1987; Berliner et al., 1995**) y últimamente enfermedades neuro-hepáticas o patologías relacionadas con ellas, como la Encefalopatía Hepática (EH) (**Widmer et al., 2007, Carbonero-Aguilar et al., 2011**).

Desde un punto de vista molecular, la oxidación de proteínas conduce a una amplia gama de modificaciones químicas, que incluyen la rotura de cadenas polipeptídicas, el entrecruzamiento de cadenas (*crosslinking*), la modificación de restos aminoacídicos (nitrición), además de la introducción de nuevos grupos reactivos en la proteína, tales como aldehído y cetona, y/o dejar extremos N- y/o C-terminales no usuales.

Este conjunto de modificaciones no es fácil de estudiar de manera global, por lo que los estudios sobre la oxidación de proteínas generalmente se centran en el estudio de un tipo particular de oxidación, como por ejemplo la oxidación de cisteínas, de tirosinas, o en la formación de grupos carbonilos. Si bien el estudio de todas estas modificaciones es necesario para entender los procesos de oxidación y su efecto global, actualmente no disponemos de metodología para obtener una imagen proteómica completa de un proteoma oxidativo en un momento dado, por lo que actualmente el estudio se realiza de manera separada. Así, por ejemplo, en el caso de la Encefalopatía Hepática (EH) se está abordando el problema, primero estudiando la carbonilación (aparición de grupos carbonilos), seguidamente la nitrición, etc.

A continuación intentaremos ofrecer una definición de la EH e información de las características y/o causas principalmente implicadas en la misma, así como una visión global del proceso de oxidación de las proteínas desde un punto de vista bioquímico, discutiendo tanto los principales aspectos metodológicos como instrumentales para su estudio mediante técnicas proteómicas.

II. Encefalopatía Hepática.

La Encefalopatía Hepática es un síndrome neuro-psiquiátrico tanto en enfermedades hepáticas agudas como crónicas (**Ferenci et al., 2002**). Se caracteriza, principalmente, por alteraciones de la consciencia, de la conducta, trastornos de personalidad, alteraciones electroencefálicas, signos neurológicos fluctuantes, acumulación de manganeso en cerebro, aparición de astrocitos de Alzheimer tipo II, manifestaciones de estrés oxidativo y edema cerebral (**Seyan et al., 2010; Bismuth et al., 2010**).

En la **Figura-I2** se muestran un sistema de clasificación para los desórdenes de la EH revisados en el *Working Party at the 1998 World Congress of Gastroenterology in Vienna, Austria* (**Prakash and Mullen, 2010**). Esta clasificación ayuda a estandarizar la nomenclatura usada en el diagnóstico de la EH a nivel mundial.

Los mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de la EH de tipo A parecen ser muy parecidos a los del tipo C, aunque no siempre se ha constatado así. Por ejemplo, el edema cerebral, que participa en el cuadro clínico y aumenta la mortalidad de los pacientes, se consideraba exclusivo de la EH de tipo A, en cambio se ha confirmado que juega un papel fundamental, también en la de tipo C (**Córdoba et al., 2001**), además la respuesta inflamatoria sistémica puede ser un factor importante en ambos tipos (**Muckart and Bhagwanjee, 1997**).

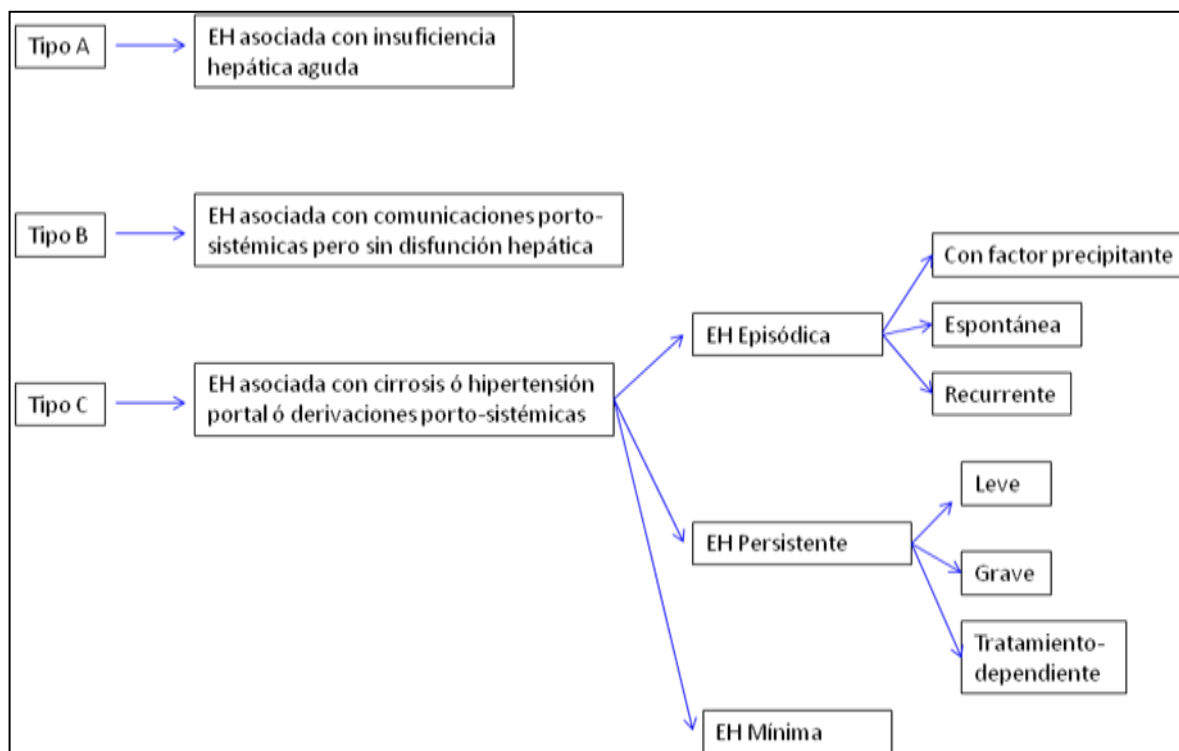


Figura-I2. Clasificación de la Encefalopatía Hepática.

Varias hipótesis intentan explicar la patogenia de este síndrome, (**Ahboucha and Butterworth, 2007; Norenberg et al., 2007**) abarcando diversas sustancias, de manera sinérgica, como responsables de la disfunción cerebral y de las lesiones estructurales y metabólicas que modifican la función neurotransmisora como, principalmente: **i)** altos niveles de amonio (hiperammonemia); **ii)** acúmulos de manganeso en los ganglios basales (**Spahr et al., 2000**); **iii)** alteración del nº de receptores periféricos de benzodiazepinas/ácido γ -amino butírico (GABA); **iv)** edema de bajo grado (*swelling* ó hinchazón); **v)** implicación del óxido nítrico (NO) intracerebral; **vi)** la síntesis de falsos neurotransmisores debido al aumento de los aminoácidos aromáticos respecto de los ramificados que pasan de forma competitiva por la barrera hematoencefálica (**Herneth et al., 1998**); ó **vi)** la implicación del estrés oxidativo (**Norenberg et al., 2004**). Actualmente, aunque no existen datos que confirmen una u otra teoría, la teoría de la hiperamonemia parece jugar un papel crucial en el desarrollo de esta patología (**Butterworth, 2002**).

La primera evidencia de la relación entre los niveles elevados de amonio y la EH se remonta a 1983 cuando Hahn *et al.* describieron “el síndrome de intoxicación por carne” en perros (Hahn *et al.*, 1983). Este grupo observó que perros sometidos a derivación porto-cava alimentados con una dieta rica en proteínas les ocasionaba estupor, desorientación y estado de coma. Años más tarde estos mismos síntomas se han descrito asociados a los altos niveles de amonio en paciente humanos (McDemmott and Adams, 1954). Además, el 90% de los pacientes con EH presentan niveles altos de amonio en sangre, se han encontrado valores elevados de glutamina en el líquido cefalorraquídeo y estos niveles se correlacionan con el grado de EH, y el tratamiento con sustancias que disminuyen los niveles de amonio, mejoran los síntomas de los pacientes.

Esta relación no siempre se encuentra en todos los trabajos publicados, de hecho, más de la mitad de los pacientes cirróticos sin EH presentan niveles elevados de amonio. Estas contradicciones podrían explicarse, bien por el método de determinación o por el tipo de muestra (sangre arterial y venosa), por el tiempo transcurrido desde la extracción de la muestra hasta su determinación (Huizenga *et al.*, 1994) o por el tabaquismo, ya que cifras altas de la enzima gammaglutamiltranspeptidasa, el uso de diuréticos, el pH urinario y el pH de la sangre pueden alterar los resultados de las pruebas (Yurdaydin, 2003).

Con todo ello, resulta clave el papel desempeñados por los astrocitos y la relación entre estos y las neuronas (Márquez-Aguirre, *et al.*, 2010). Los astrocitos ocupan cerca de un tercio del volumen de la corteza cerebral y forman una barrera de segregación del ambiente externo para las neuronas. Son esenciales para el funcionamiento del cerebro, mantienen y regulan el medio extracelular, participan en la captación de radicales libres y de metales, modulan la respuesta inflamatoria e inmunitaria, influyen en la excitabilidad neuronal y en la neurotransmisión. Además, son una fuente importante de proteínas extracelulares y moléculas de adhesión. Desempeñan un papel

central en la formación de cicatriz glial posterior a diversas lesiones para preservar la integridad del tejido y delimitar la zona de lesión.

II.1.- Papel del amonio en la Encefalopatía Hepática.

El metabolismo del amonio depende de tres rutas metabólicas: **i)** ciclo de la urea, donde se permite la eliminación del amonio mediante la síntesis de urea; **ii)** eliminación de amonio y glutamato mediante la síntesis de glutamina por la glutamina sintetasa; **iii)** síntesis de amonio y glutamato mediante la desaminación de la glutamina por la glutaminasa.

El ión amonio (NH_4^+) es la forma más abundante en condiciones basales, en cambio la forma gaseosa (NH_3^+) sólo supone un 2% del total. Inicialmente se pensaba que la gran producción del amonio procedía del desdoblamiento de los productos nitrogenados en el colon (intestino grueso) (**Wolpert et al., 1970**). Posteriormente se ha comprobado que la mayoría de la producción de amonio procede del intestino delgado, de la desaminación de la glutamina por la glutaminasa mitocondrial activada por fosfato (GAP) (**Romero-Gómez et al., 2006, 2004**).

El amonio producido en el intestino por vía portal alcanza el hígado para ser detoxificado mediante el ciclo de síntesis de urea en los hepatocitos periportales (**Figura-I3**). Un 80% del amonio se detoxifica mediante esta vía metabólica ya que no consume energía. Si fuese necesario, además, en los hepatocitos pericentrales, el amonio puede ser metabolizado hacia síntesis de glutamina por la glutamina sintetasa. En situaciones de disfunción hepática (por ejemplo, cirrosis), la capacidad de síntesis de urea se ve reducida. En estas situaciones el amonio pasa a la circulación sistémica y alcanza el músculo. Éste juega un papel importante en la detoxificación del amonio por destinarlo a la síntesis de glutamina por la glutamina sintetasa, sin liberar aminoácidos los cuales se destinan a la producción de masa muscular. Esto hace al músculo un sumidero considerable en la cirrosis hepática (**Lockwood, et al., 1979**). Por

otra parte el riñón también posee actividad glutaminasa en el túbulo proximal, con lo que produce amonio; pero un tercio es eliminado por la orina y sólo las dos terceras partes pasan a circulación sistémica.

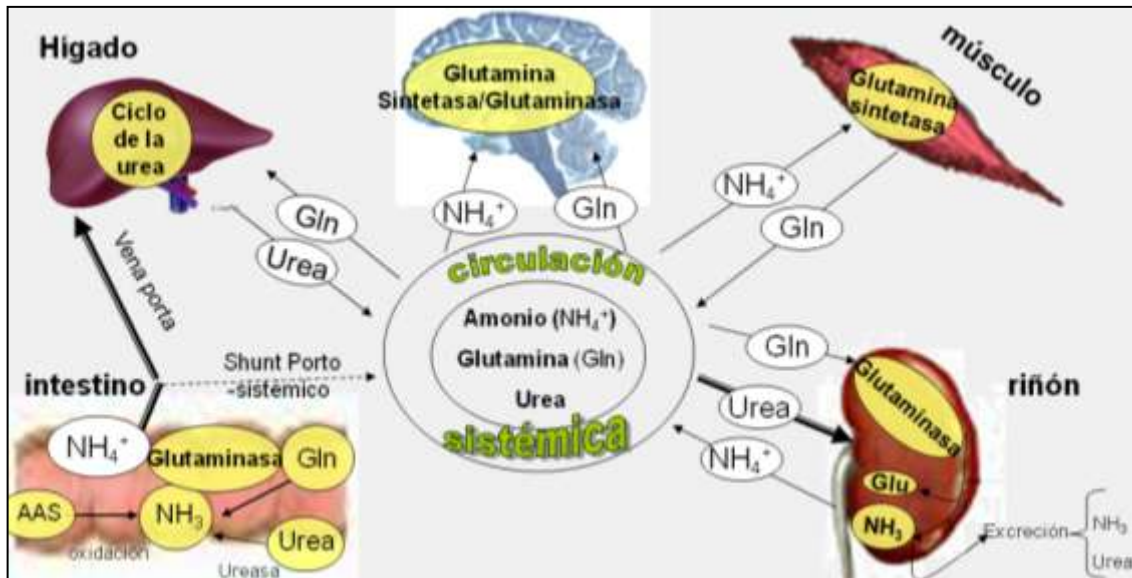


Figura-I3. Representación esquemática de la circulación del amonio entre los diferentes tejidos implicados en su metabolismo.

II.2.- Metabolismo cerebral del amonio.

El amonio circulante pasa al cerebro a través de la barrera hematoencefálica. En el cerebro, la principal vía metabólica de incorporación del amonio es su incorporación al aminoácido glutamato para formar glutamina mediante la glutamina sintetasa, principalmente en los astrocitos (**Norenberg and Martínez-Hernández, 1979**). Sólo un pequeño porcentaje es metabolizado por la vía de la aminación reductiva del 2-oxoglutarato a glutamato. Las neuronas poseen actividad glutaminasa, encargada de sintetizar glutamato a partir de glutamina y amonio (**Cooper and Lai, 1987**). Ambas vías se incluyen en el denominado ciclo glutamato-glutamina que tiene lugar entre las neuronas y los astrocitos. También aparece implicada la transaminación de

glutamato a alanina como un paso de transferencia intracelular de amonio (**Waagepetersen et al., 2000**).

La acumulación del amonio en el cerebro provoca una serie de alteraciones que son responsables, en parte, de las alteraciones neurofisiológicas típicas de la EH (**Figura-14**).

El principal mecanismo para detoxificar el amonio en el cerebro es su incorporación en forma de glutamina por la acción de la glutamina sintetasa, como antes se ha citado, enzima localizada en el retículo endoplásmico de los astrocitos. La glutamina es liberada mediante transportadores específicos al medio extracelular siendo captada, a su vez, por otros transportadores de membrana de la neurona o de las células endoteliales, para evitar que, debido al incremento de su concentración, se aumente la osmolaridad cerebral. Tanto en las neuronas como en las células endoteliales se hidroliza por la glutaminasa para formar glutamato y amonio. El glutamato se libera al espacio sináptico como neurotransmisor o bien a través de la membrana luminal. El liberado como neurotransmisor activaría muchos receptores de glutamato (conduciría a la muerte de la neurona). Para evitarlo se recapta por transportadores específicos localizados tanto en las neuronas como en el astrocitos (N-metil-D-aspartato, NMDA o bien *excitatory amino-acid transporter*, EAAT). La mayoría del glutamato es captado por los astrocitos, donde la glutamina sintetasa incorpora amonio para formar glutamina. De esta forma se inicia de nuevo el ciclo glutamato-glutamina, eliminándose el amonio. Por otro lado, el amonio liberado desde el cerebro a la sangre estaría en un compartimento (células endoteliales) localizado en el lado de la barrera hematoencefálica en contacto con la sangre. En hiperamonemia y fallo hepático todo este proceso está alterado. Los niveles de amonio en sangre se encuentran elevados; el amonio atraviesa la barrera hematoencefálica (cuya permeabilidad se encuentra alterada) y llega al cerebro. La glutaminasa va tener más sustrato, acumulándose la glutamina. Este aumento parece estar relacionado con el edema cerebral. Además el aumento de amonio conduce a alteraciones en la neurotransmisión y en la función cerebral.

Por tanto, las enzimas encargadas del metabolismo del amonio en el cerebro son, principalmente, dos: la glutamina sintetasa y la glutaminasa (**Figura-15**). Ambas se encuentran compartimentalizadas: la mayoría de la actividad glutamina sintetasa se encuentra en los astrocitos (**Norenberg and Martínez-Hernández, 1979**) mientras que la actividad glutaminasa se localiza en neuronas (**Curthoys and Watford, 1995**).

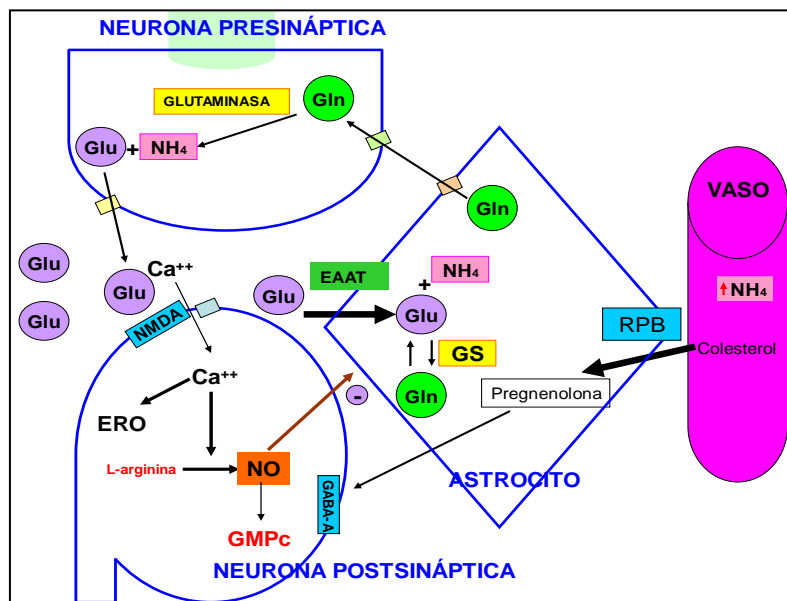


Figura-14. Comunicación entre las neuronas, los astrocitos y el endotelio vascular. Glu: Glutamato; Gln: Glutamina; GS: Glutamina sintetasa; EAAT: Receptor de glutamato; RPB: Receptor periférico de benzodiazepinas; NMDA: Receptor de glutamato; ERO: Especies reactivas de oxígeno; NO: óxido nítrico.

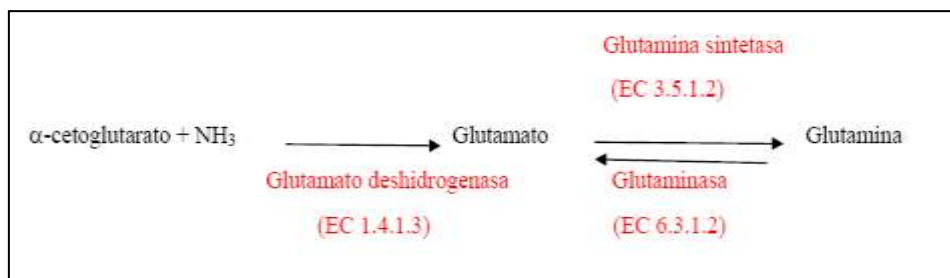


Figura-15. Reacciones enzimáticas desarrolladas por la glutamina sintetasa y la glutaminasa.

II.3.- Teoría de la hiperamonemia como una de las principales causas de la Encefalopatía Hepática /Características de la Encefalopatía Hepática.

El amonio es un metabolito que participa en diferentes vías metabólicas, como se ha citado con anterioridad, pero a concentraciones elevadas alcanza la barrera hematoencefálica y resulta tóxico para el cerebro (**Lin and Rabe, 1985**) por diferentes mecanismos directos o indirectos:

II.3.1- Influencia del amonio en el metabolismo energético cerebral.

La tasa de consumo de energía metabólica desciende en los astrocitos analizados en modelos con derivación porto-cava. En este modelo se describe una menor tasa de consumo de glucosa en el cerebro, localizado en el cíngulo anterior del córtex, estructura asociada con el control de la atención, debido a una inhibición del ciclo de Krebs (ciclo de los ácidos tricarbóxicos).

Cuando el amonio alcanza concentraciones del orden de milimolar se altera el metabolismo cerebral a través de la inhibición de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa (**Lai and Cooper, 1986**), enzima limitante del ciclo de Krebs. Una consecuencia de ello es la disminución de la incorporación del piruvato al ciclo de Krebs y por tanto la interrupción del ciclo aerobio, aumentándose los niveles de lactato, hecho encontrado en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EH (**Hilfielt et al., 1977**).

También se aprecia un incremento de expresión de los receptores de glucosa, GLUT-1, en los astrocitos. Con ello se consigue una mayor disponibilidad del sustrato inicial de la glucólisis, la glucosa, lo que se traduce en un incremento de la glucólisis y en consecuencia de lactato (**Butterworth, 2003; Lockwood et al., 1997**). Este incremento de lactato aparece en estados severos de la enfermedad, como consecuencia de la inhibición de la α -cetoglutarato deshidrogenasa del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (**Lai and Cooper, 1986**) y del incremento en la expresión de la lactato deshidrogenasa 1

y 5. Esta acumulación de lactato se relaciona con el edema de los astrocitos (*swelling*).

II.3.2- Influencia del amonio en la anatomía de los astrocitos.

La presencia de astrocitos de Alzheimer tipo II se ha detectado tanto en cerebro de pacientes con EH (**Norenberg, 1996, 1987**) como en cultivo de astrocitos en presencia de altas concentraciones de amonio (hiperamoniemia) (**Gregorios et al., 1985**). La hiperamoniemia induce cambios estructurales en el astrocito, de manera que adquieren una morfología característica de los astrocitos de Alzheimer tipo II: aparición de nucléolo prominente, núcleo pálido y marginación en el patrón de cromatina. La morfología que adoptan es totalmente variada desde redondeada (corteza cerebral) hasta forma irregular (ganglios basales) (**Norenberg, 1987**).

En ratas con EH se encuentra un cambio tanto en la morfología como en la composición del astrocito, aumento del tamaño celular, del número de mitocondrias y del retículo endoplasmático, acúmulo de cuerpos densos con lipofusina, pérdida de filamentos intermedios (**Sobe et al., 1981**); incrementos en la basofilina citoplasmática, vacuolización y desintegración celular en estadios más avanzados. Los astrocitos son las células donde se metaboliza el amonio por la glutamina sintetasa, enzima mayoritaria en ellos (**Butterworth, 2002**).

Los cambios neuropatológicos en los astrocitos pueden estar relacionados con la alteración de las proteínas que mantienen su arquitectura (proteínas del citoesqueleto, receptores de membrana, etc.). En ratas con EH aguda se ha descrito un descenso de la expresión de la proteína ácido fibrilar glial (GFAP) directamente relacionado con el grado de edema en el astrocito (**Bélanger et al., 2002**). Es una proteína del citoesqueleto encargada de la regulación del volumen celular (**Butterworth, 2001b**). Además es el principal componente de los filamentos intermedios de astrocitos diferenciados en el sistema nervioso central, de hecho, se ha utilizado como marcador de la integridad astrocítica en estudios inmunohistoquímicos (**Sobel et al., 1981**). Se

sugiere que esta pérdida sería capaz de explicar las pérdidas de las propiedades de los astrocitos, del desequilibrio en la visco-elasticidad ó la aparición del *swelling*. En el cerebelo, por otra parte, no se observan cambios en cuanto al cambio de expresión.

Los cambios tanto en la expresión como en la actividad de la glutamina sintetasa, enzima encargada de la producción de glutamina, también afecta, indirectamente, a la arquitectura del astrocito por ser la glutamina un osmolito celular (será desarrollado en el apartado siguiente).

II.3.3- Influencia del amonio en el desarrollo del edema de bajo grado (hinchazón ó *swelling*).

La presencia de los astrocitos de Alzheimer tipo II, descrita en el apartado anterior, es una de las consecuencias finales de un proceso que comienza con el desarrollo del edema astrocitario. Así mismo el descenso de la GFAP, también afecta a la regulación del volumen del astrocito. En cultivo de astrocitos bajo condiciones de hiperamonemia se encuentra elevada la expresión de la aquaporina-IV, proteína de membrana que regula el movimiento del agua a través de la membrana celular (**Rama Rao et al., 2003a**). Además se detecta un incremento en la permeabilidad mitocondrial de transición (como consecuencia del incremento de estrés oxidativo y nitrosativo), fenómeno en el cual se abre un poro específico en la membrana interna mitocondrial. Como consecuencia de ello, se colapsa el gradiente iónico, es decir, desacopla el potencial de la membrana mitocondrial interna, lo que conlleva a una fosforilación oxidativa defectuosa y a una disrupción de la producción de ATP, además de la generación de radicales libres. Este fenómeno ha sido implicado en el inicio del proceso de apoptosis (**Kim et al., 2003**).

La estructura del poro mitocondrial de transición no se conoce con exactitud pero parece ser que el receptor periférico de benzodiazepinas (RPB) forma parte de él, ya que se ha descrito la relación del consumo de benzodiazepinas con el inicio del hinchazón/edema cerebral (**Rama Rao et al.,**

2003b). Este receptor es un complejo heterodímero proteico localizado en la membrana externa mitocondrial de, principalmente, los astrocitos. El incremento de la permeabilidad mitocondrial de transición puede ser favorecido por factores implicados en el desarrollo de la EH como radicales libres, aumento del calcio intracelular, el NO, pH alcalino y la concentración de la glutamina. La ciclosporina A inhibe el funcionamiento del poro, con lo que evita la formación del edema.

La activación de los receptores RPB conduce a un aumento en el transporte del colesterol hacia el interior mitocondrial (**Hazell et al., 1999**). Allí la enzima P450 convierte el colesterol a pregnenolona, precursor de los neuroesteroides. La alopregnenolona mejora los flujos de cloruro asociados a los receptores GABA_A al ejercer una modulación positiva sobre ellos (**Figura-16**). Estas podrían ser las causas del incremento del tono GABAérgico encontrado en la EH y ser las responsables de los síntomas característicos como anomalías en el ciclo vigilia-sueño, depresión y desequilibrio en el aprendizaje.

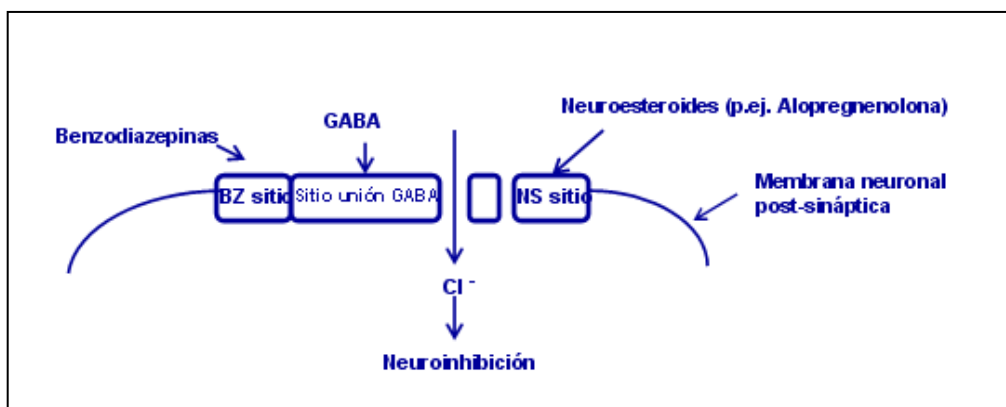


Figura-16. Modulación del receptor de GABA_A mediante el neuroesteroide pregnenolona. BZ sitio: receptor con sitio de unión para benzodiazepinas; GABA: ácido γ -amino butírico; Cl⁻: ión cloruro; NS sitio: receptor con sitio de unión para neuroesteroides.

La inducción de la permeabilidad mitocondrial no sólo parece estar inducido por el amonio “*per se*”, sino también por la glutamina ya que la metionina sulfoximina (MSO), un inhibidor de la glutamina sintetasa, bloquea la permeabilidad mitocondrial inducida por el amonio, sugiriendo que la glutamina podría ser la responsable de la permeabilidad mitocondrial inducida por el amonio (**Albrecht and Norenberg, 2006; Bai et al., 2001**). También se ha observado que la glutamina es capaz de inducir permeabilidad mitocondrial directamente en cultivo de astrocitos (**Rama Rao et al., 2003d**).

Por otro lado, el aumento de la síntesis del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en situaciones de hiponatremia, de interleuquinas 1 β y 6 (IL-1 β , IL-6) se ha descrito que está asociado a la formación del edema astrocitario (**Häussinger et al., 2002**).

La acumulación de glutamina en los astrocitos de los ganglios basales y corteza es otra característica detectada en condiciones de hiperamonemia, y sin la previsible inducción de la glutamina sintetasa. La glutamina es un aminoácido osmótico y por tanto su acumulación podría provocar un incremento en la captación de agua para regular la osmolaridad del astrocito, favoreciendo el edema. Este hecho hace que se incremente la presión intracraneal, lo que supone una importante causa de mortalidad en pacientes con fallo hepático agudo (**Jover et al., 2005**). Como mecanismo compensatorio, se detecta un descenso de los niveles de mioinositol y colina (**Spahr, et al., 2000**), como consecuencia de la metabolización cerebral del amonio hacia la síntesis de glutamina que provoca una acumulación de la misma y la salida de otros osmolitos como el mioinositol y la colina.

La entrada de esta glutamina en la mitocondria del astrocito, y su desdoblamiento a amonio y glutamato por la acción de la glutaminasa podría generar más amonio, persistiendo el estado de hiperamonemia. El bloqueo de la síntesis de los niveles de glutamina y la normalización de sus niveles con MSO parece prevenir la aparición del edema (**Albrecht et al., 2010**).

El edema generado en el astrocito por el estado de hiperamonemia altera el funcionamiento normal del mismo, de manera que no se desarrollan las principales funciones de mantenimiento del medio extracelular perineural, la captación del potasio sobrante, liberación de neurotransmisores y la canalización de las señales intercelulares cerebrales, lo que conlleva a una neurotransmisión defectuosa, a una alteración del transporte de metabolitos entre los astrocitos y las neuronas (comunicación) y, por último, a una disfunción neuronal presente en la EH.

Como consecuencia directa del incremento de este aminoácido en el cerebro, se intenta favorecer su eliminación por intercambio activo, a través de la barrera hematoencefálica, con aminoácidos plasmáticos neutros y no osmóticamente activos (valina, leucina, isoleucina, triptófano, fenilalanina y tirosina). Como consecuencia del aumento del catabolismo muscular y/o a un defecto de la desaminación hepática (**Morgan et al., 1978**), la concentración plasmática de los aminoácidos aromáticos es mayor que la de los aminoácidos ramificados, por lo cual el intercambio se hace fundamentalmente con los aminoácidos aromáticos, aumentando éstos a nivel cerebral de manera notable. Como consecuencia se sintetizan falsos neurotransmisores como la octopamina y la feniletanolamina, que compiten con las catecolaminas y la dopamina, neurotransmisores habituales (**James et al., 1979**).

II.3.4- Influencia del amonio en moléculas relacionadas con la neurotransmisión.

El amonio es capaz de modificar la transmisión sináptica directamente al inhibir la salida del ión cloruro en las neuronas post-sinápticas y por causar depresión en la transmisión sináptica (**Faint, 2006**).

Los efectos del amonio en el transporte del glutamato, así como en la síntesis del lactato y en la de los neuroesteroides vía receptores RPB, alterarían la comunicación establecida entre las neuronas y los astrocitos descrita en la **Figura-17**, modificando el amonio las bases de la excitación y la

inhibición neural (vía glutamato y GABA) y consecuentemente proporcionar una explicación convincente para la compleja y rápida evolución de los síntomas característicos de la EH.

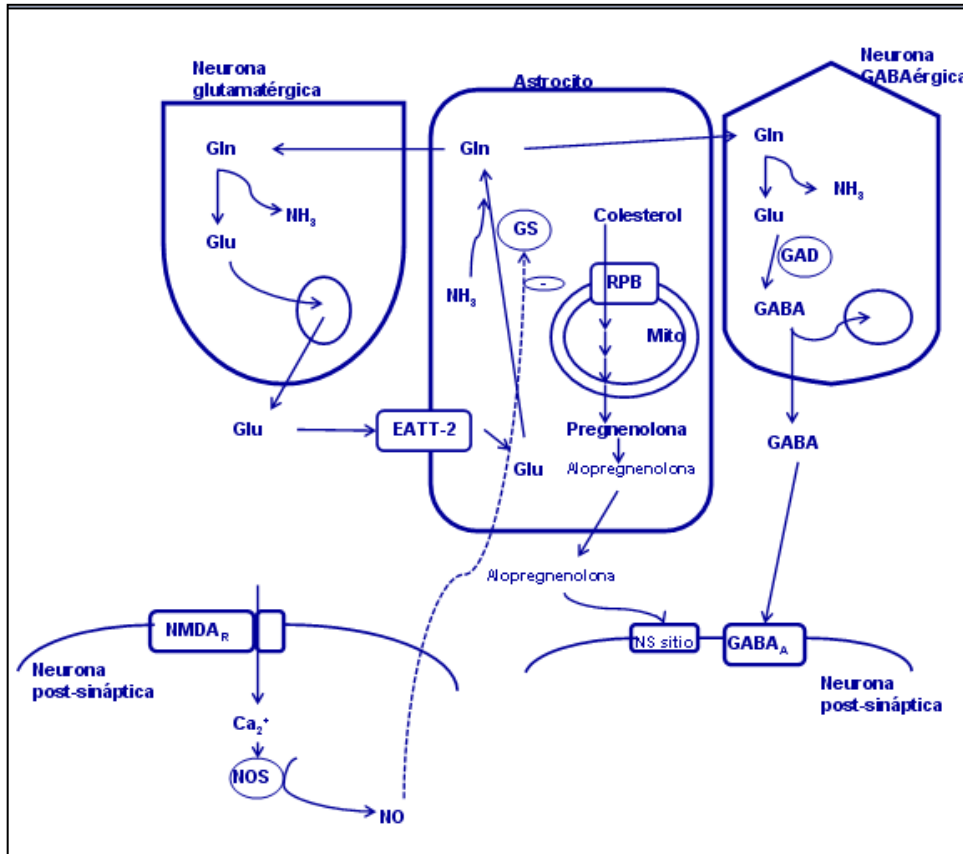


Figura-17. Modulación tanto de la ruta excitatoria (glutamatergica) como inhibitoria (GABAérgica) en la comunicación neurona-astrocito como en astrocito-neurona. Gln: glutamina; Glu: glutamato; NH₃: amoníaco; EAT-2: receptor de glutamato; RPB: receptor periférico de benzodiazepina; NMDA_R: receptor NMDA (para glutamato); Ca₂⁺: ión calcio; NOS: óxido nítrico sintetasa; NO: óxido nítrico; NS sitio: receptor con sitio de unión para neuroesteroides; GS: glutamina sintetasa; GABA_A: receptor para GABA; Mito: mitocondria; GAD: glutamato descarboxilasa.

La expresión de la monoamina oxidasa (MAO), enzima encargada de metabolizar la serotonina a ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y localizada en la membrana externa mitocondrial de las neuronas monoaminérgicas, está aumentada en pacientes con EH, lo que conlleva a una disfunción en la neurotransmisión serotoninérgica y a una posible alteración en el ritmo vigilia sueño y de conducta que aparecen en la EH (**Butterworth, 2001a**).

El incremento en la densidad de los RPB que aparece en astrocitos (citado anteriormente) se relaciona con el incremento en el transporte de colesterol al interior mitocondrial, lo que provoca la síntesis de neuroesteroides, potentes estimuladores del receptor GABA_A, lo que favorece la neuroinhibición (**Ahboucha et al., 2003**).

La neurotransmisión glutamatérgica (glutamato principal neuroestimulador) también se encuentra afectada con la hiperamonemia: una disminución en la expresión de los receptores EAAT-1 y EAAT-2 (transportadores de glutamato; *excitatory amino-acid transporter*) en los astrocitos impide la recaptación hacia el astrocito provocando un incremento del glutamato extracelular, dificultando la síntesis de glutamina en el interior del astrocito lo que evita la detoxificación del amonio y se relaciona directamente con el estrés oxidativo (**Chan and Butterworth, 2006**).

También la neurotransmisión de la glicina (neuroinhibidor): una disminución del transportador GLYT-1, lo que genera que la glicina se acumule extracelularmente, provocando una alteración en la excitabilidad neuronal (**Häussinger et al., 2002**).

El estado de hiperamonemia genera una mayor expresión en los niveles de expresión de los receptores para glucosa, GLUT-1, encargados del transporte de la glucosa hacia el interior del astrocito. Esto se traduce en un incremento en la glucólisis y el consecuente incremento en la producción de lactato (**Butterworth, 2003**).

La deposición de la neurotoxina manganeso en los ganglios basales ha sido implicada en la patogénesis de la EH (**Spahr et al., 2000**). El manganeso como catión bivalente (Mn²⁺) inhibe la fosforilación mitocondrial oxidativa, por lo que disminuye los niveles de ATP e incrementa los de lactato. Este metal induce alteración en el sistema dopaminérgico responsable de las alteraciones motoras en la EH por un incremento en la conversión a dopamina (**Butterworth et al., 1995**) en el sistema GABAérgico, por la estimulación de proteínas

translocadoras en los astrocitos (**Talwalkar and Kamath, 2005**), así como de cambios estructurales en los astrocitos como la aparición de los astrocitos de Alzheimer tipo II (**Aschner, et al., 1992**).

II.3.5- Influencia del amonio en la homeostasis del óxido nítrico y del GMPc.

El amonio induce nitración de las proteínas (**Brück et al., 2011**). Se ha visto que la actividad de la óxido nítrico sintetasa (NOS) está incrementada en modelos de animales de EH (**Rama Rao et al., 1997**) y se han observado niveles elevados de NO en el cerebro. Por lo que la hipótesis de que el estrés oxidativo y nitrosativo juega un papel importante en la fisiopatología de la EH es cada vez mayor (**Görg et al., 2003**).

El amonio estimula la captación del aminoácido L-arginina, precursor del óxido nítrico (NO) (**Rama Rao et al., 1997**), además la actividad cerebral de la óxido nítrico sintetasa se encuentra elevada en estados de hiperamonemia, lo cual conlleva a un incremento de la producción del NO (**Jover et al., 2005**). Pero la L-arginina puede actuar como precursor del glutamato, con lo que la recaptación de este aminoácido podría favorecer el incremento de glutamina derivada del glutamato.

El amonio, también produce sobre-estimulación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) de glutamato en las neuronas post-sinápticas (**Figura- I8**). La activación ionotrópica de estos receptores conduce a un incremento en la entrada de Ca^{2+} , que puede unirse a la calmodulina, la cual activaría a la óxido nítrico sintetasa neuronal, elevándose las concentraciones de NO. Este NO puede, por un lado, difundir hasta el astrocito e inhibir la glutamina sintetasa por nitrosilación, inhibiendo la única vía de detoxificación del amonio (**Master et al., 1999**), y/o por otro lado, podría activar la guanilato ciclasa soluble (GSs), aumentándose los niveles de guanosina monofosfato cíclico (GMPc). La activación de la vía glutamato-NO-GMPc modula importantes procesos cerebrales como la comunicación intercelular, ritmos

circadianos (por ejemplo vigilia-sueño), potenciación a largo plazo y algunas formas de aprendizaje y de memoria (**Boulton et al., 1995**).

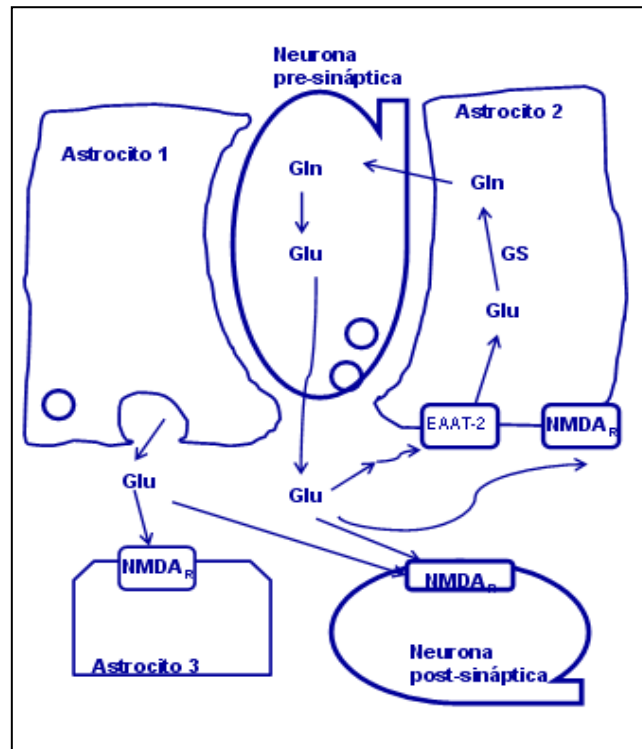


Figura-18. Representación esquemática de la ruta de señalización del glutamato entre neurona-astrocito y entre astrocito-astrocito mediada por receptores NMDA tanto en la neurona post-sináptica como en los astrocitos. Gln: glutamina; Glu: glutamato; NMDA_R: receptor NMDA (para glutamato); GS: glutamina sintetasa; EAAT-2: receptor para glutamato.

Este NO producido también podría estar implicado en el desarrollo del edema cerebral y el consiguiente deterioro cognitivo (**Rama Rao et al., 2002**). Cultivos de astrocitos de la corteza expuestos a amonio presentan estrés oxidativo-nitrosativo, reflejándose en dos aspectos: (a) un incremento en la expresión de la óxido nítrico sintetasa neuronal (NOSI; implicada en la comunicación celular) como en la inducible (iNOS ó NOSII; implicada en la defensa inmune contra patógenos) (**Murthy et al., 2001**); y (b) un incremento en la hemo-oxigenasa (HO-1) en el cerebro debido a la devascularización (**Butterworth., 2010**).

II.3.6- Influencia del amonio en el estrés oxidativo.

El estado de hiperamonemia genera un incremento en la producción de radicales libres superóxidos, una disminución de la actividad de enzimas antioxidantes en el cerebro como glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa (**Rama Rao et al., 1995**), una disminución de la superóxido dismutasa dependiente de Cu/Zn y la aparición pigmentos de lipofusina en el interior de los astrocitos como signo de peroxidación lipídica (**Norenberg, 1981**). Por tanto, el exceso de amonio contribuye a la alteración del estado redox de la célula.

Una diana de la nitración de proteínas es la glutamina sintetasa (GS). Esta enzima cataliza la amidación del glutamato a glutamina, reacción ATP dependiente. No existen evidencias de la inducción de la GS tanto en fallo hepático crónico como agudo, lo que si disminuye moderadamente es su actividad (**Figura-I9**). En fallo hepático agudo, la síntesis *de novo* de la glutamina no aumenta, la acumulación de la misma parece ser debida a mecanismos tales como la disminución de la degradación por la glutaminasa ó por la inhibición de la glutamina liberada (**Zwingmann et al., 2003**).

La actividad de la GS en el cerebro está disminuida en ratas con derivación porto-cava. Esto contrasta, en cambio, con el incremento de actividad en el músculo. Este desequilibrio en la actividad de la GS y por tanto en el balance del amonio, hacen que las concentraciones de amonio en el cerebro lleguen a alcanzar niveles de 5 mM de amonio (**Swain et al., 1992**).

El grupo de Norenberg (**Jayakumar et al., 2002**) publicó que los ligandos de los RPB inducían la nitración de proteínas tanto en cultivos de astrocitos como en el cerebro de ratas con EH, por lo que las benzodiazepinas agravan los síntomas de esta patología.

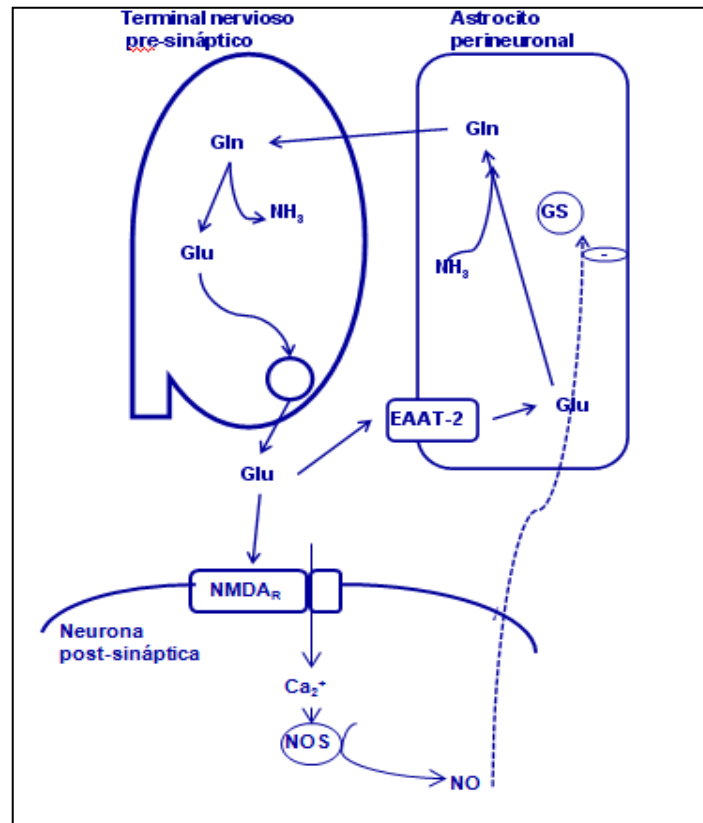


Figura-19. Liberación del glutamato por el terminal pre-sináptico para estimular el receptor de glutamato NMDA post-sináptico. El exceso de glutamato es rápidamente retirado por el transportador EAAT-2 en el astrocito y convertido a glutamina por la vía de la GS. La activación de los receptores NMDA activa la ruta de señalización del NO, donde la producción del NO y la nitración de la GS ocurren como consecuencia del incremento de amonio en el cerebro. Gln: glutamina; Glu: glutamato; NMDA_R: receptor NMDA (para glutamato); GS: glutamina sintetasa; EAAT-2: receptor para glutamato. Ca₂⁺: ión calcio; NOS: óxido nítrico sintetasa; NO: óxido nítrico.

En hiperamonemia, el cociente glutamina/glutamato se encuentra alterado. El glutatión es el principal antioxidante intracelular, sintetizado a partir de estos aminoácidos, entre otros. La alteración del cociente no favorece la síntesis del glutatión, lo que podría llevar a una serie de implicaciones patológicas.

En pacientes con fallo hepático fulminante y EH se produce una respuesta inflamatoria sistémica que agrava la EH. En ella, se liberan citoquinas, que se unen a los receptores en las células endoteliales o bien estas citoquinas pueden ser generadas en los astrocitos, como la IL-1. La IL-1 provoca un incremento en la liberación de NO, de radicales libres y de prostaglandinas, que son factores que favorecen la toxicidad del amonio. Además, estas citoquinas pueden modular la neurotransmisión glutamatérgica al inhibir la recaptación astrocitaria de glutamato, dificultando la detoxificación del amonio (**Hu, et al., 2000**). También, citoquinas como el TNF puede modular el flujo sanguíneo cerebral, y potenciar el edema astrocito. Con lo cual la respuesta inflamatoria sistémica podría influir sobre las manifestaciones clínicas de la EH (**Wright and Jalan, 2007**).

A continuación, en los siguientes apartados, vamos a desarrollar los dos abordajes que hemos realizado para estudiar cómo afectaría la desregulación que ocurre en la EH en los sistemas antioxidantes de las ratas con esta patología:

- i) por un lado, vamos a analizar si existen alteraciones en el patrón de la expresión de las proteínas, para lo cual vamos a utilizar la técnica de *Differential In Gel Electrophoresis* (DIGE).
- ii) por otro lado, vamos a analizar las modificaciones post-traduccionales de las proteínas utilizando para ello el marcaje y detección de los grupos carbonilo.

III. Metodología aplicada en el análisis diferencial de proteínas.

El abordaje del estudio de la expresión diferencial de proteínas puede hacerse mediante dos técnicas:

- i) electroforesis bidimensional (2D), abordaje clásico, donde para teñir los geles se utilizan las tinciones como la tinción con plata, con Coomassie o con Sypro-Ruby.
- ii) DIGE, que utiliza un sistema de fluoróforos como sistema de tinción / “marcaje”

La metodología clásica utilizada es la citada en primer lugar, pero si analizamos las ventajas e inconvenientes de ambas, podríamos decir que la segunda, DIGE, presenta mayores ventajas, además de ser más cómoda, rápida y fiable (**Figura-I10**).

	Electroforesis bidimensional (2D)			DIGE
	Tinción con plata	Coomassie	SyproRuby	
Sensibilidad	Muy alta	Media	Alta	Muy alta
Linealidad/ Rango dinámico	Baja	Media	Alta	Muy alta
Estándar interno	No	No	No	Si
Facilidad de manejo	Varios pasos	Fácil	Fácil	Media
Reproducibilidad	Baja	Baja	Baja	Muy alta
Análisis por masas	Media	Difícil	Difícil	Fácil
Coste económico	Bajo	Medio	Medio	Elevado

Figura-I10. Ventajas e inconvenientes de ambas técnicas.

III.1- *Differential In Gel Electrophoresis (DIGE)*.

La técnica DIGE consiste, brevemente, en una electroforesis bidimensional donde la muestra es marcada con un sistema de fluoróforos (Cy2, Cy3, Cy5) y es analizada mediante un programa informático (*DeCyder software*) que nos facilita el “macheo” o comparación de los *spots* (manchas correspondiente a las proteínas), además de su estudio estadístico.

El concepto de DIGE fue originalmente desarrollado por el grupo de Minden y colaboradores (**Unlu et al., 1997**). Para analizar mediante esta técnica dos muestras, se marcan covalentemente con fluoróforos, Cy3 y Cy5, respectivamente, a nivel de restos de lisina. Estas proteínas marcadas se mezclan y se separan en un mismo gel 2D.

Las reacciones de marcaje suelen llevarse a cabo bajo condiciones de “marcaje mínimo” (*minimal labeled*): los *minimal dyes* tienen un grupo N-hidroxisuccinimidil-éster reactivo diseñado para unirse covalentemente al grupo e-amino de los residuos de lisina formando un enlace tipo amida mediante una sustitución nucleofílica (**Figura-I11**). Esto conlleva a que sólo un 20% de las moléculas de una proteína en particular sean modificadas covalentemente con una molécula de fluoróforo, es decir, que la cantidad usada de fluoróforo para marcar las muestras está controlada, de forma que sólo un 3% lo hacen en exceso. Este marcaje no afecta a la movilidad de las proteínas en el gel ni interfiere en la identificación por espectrometría de masas (**Zhou et al., 2002**).

La excitación de los fluoróforos, con una longitud de onda diferente para cada fluoróforo (**Figura-I12**), permite la captación de la imagen del patrón de proteínas. Luego, mediante un software adecuado (*Decyder 7.0*) se pueden comparar las imágenes bidimensionales del proteoma de cada una de las muestras analizadas y cuantificar la intensidad de la fluorescencia de cada spot.

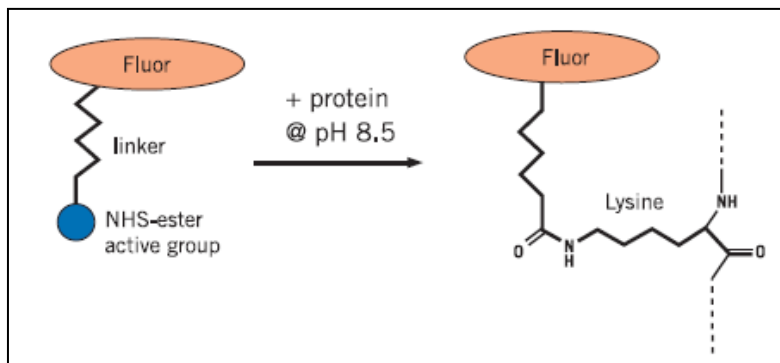


Figura-I11. Reacción del fluoróforo con un resto de lisina (*minimal labeling*).

La incorporación del estándar interno (mezcla o *pool* de todas las muestras analizadas en los geles), marcado con Cy2 y tratado de igual forma que si fuese otra muestra y la posibilidad de comparar directamente en el mismo gel las muestras (normalización) permite minimizar el problema de reproducibilidad o variación entre geles comparado con las técnicas de 2D convencionales, además de reducir el número de geles necesarios por experimento. Otra ventaja añadida a este método es que requiere menor tiempo de detección de los *spots* (el marcaje con los fluoróforos es más o menos 45 min) en comparación con la tinción con plata (>1 hora) o la tinción con *Sypro-Ruby* (toda la noche) además de un mayor rango de detección (0.125ng- 10µg; rango inferior al detectado en espectrometría de masas).

La estructura de los tres fluoróforos es similar, la sustitución nucleofílica de una lisina con un grupo ε-amino forma una amida, pero son espectralmente diferentes (**Figura-I13**). Los fluoróforos tienen una masa muy similar y están cargados positivamente para compensar la carga de la lisina. La masa y la carga compensadas nos aseguran que todas las muestras migran junto a los fluoróforos hacia el mismo punto en la electroforesis. En la reacción de marcaje, el cociente *dye*: marcaje de proteína, permanece bajo. Esto nos asegura que las proteínas sólo se marcan con una sólo molécula de fluoróforo (**Tonge et al., 2001**).

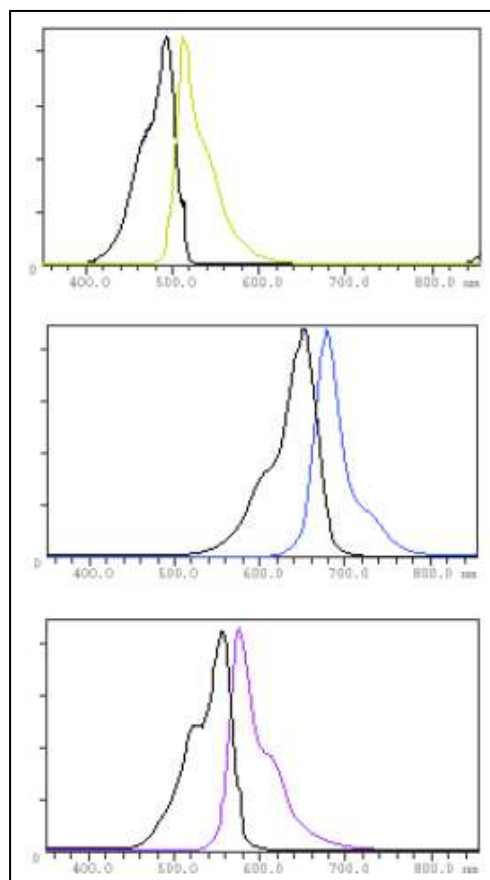


Figura-112.

Espectro de excitación y emisión (coloreado) para CyDye DIGE Fluor Cy2, Cy3, Cy5.

En la **Figura-114** se muestra esquemáticamente el diseño experimental con tres fluoróforos para el procedimiento básico seguido en nuestro estudio.

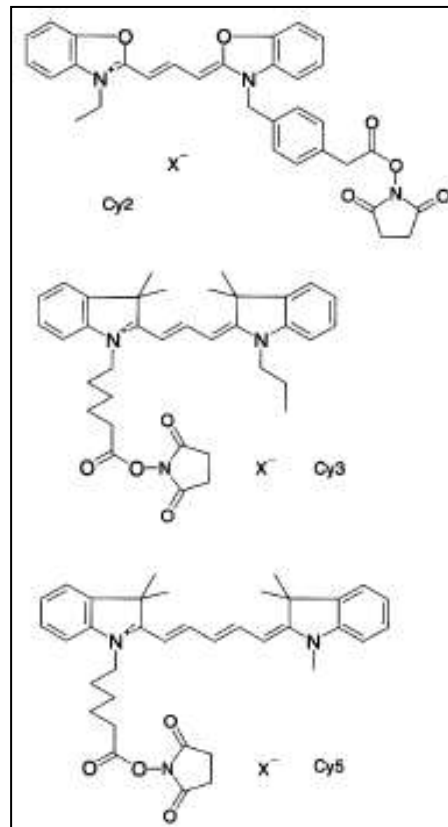


Figura-I13. Estructura de de los fluoróforos derivados de cianinas (*cyanine dyes*)

Marcaje por saturación.

Lo comentado, con anterioridad es referido a un tipo de marcaje llamado “marcaje mínimo”, que suele utilizarse cuando la cantidad de muestra no es limitante. Existe otro tipo de marcaje que tiene mayor sensibilidad para muestras poco abundantes (5µg para cada reacción de marcaje). Las proteínas se marcan con unos nuevos fluoroforos derivados de la maleidimida (maleidimida cianina dyes, generalmente utilizados para el Cy3 y Cy5). Estos están diseñados para unirse covalentemente a los grupos sulfhidrilos de los residuos de cisteínas mediante un enlace tioeter.

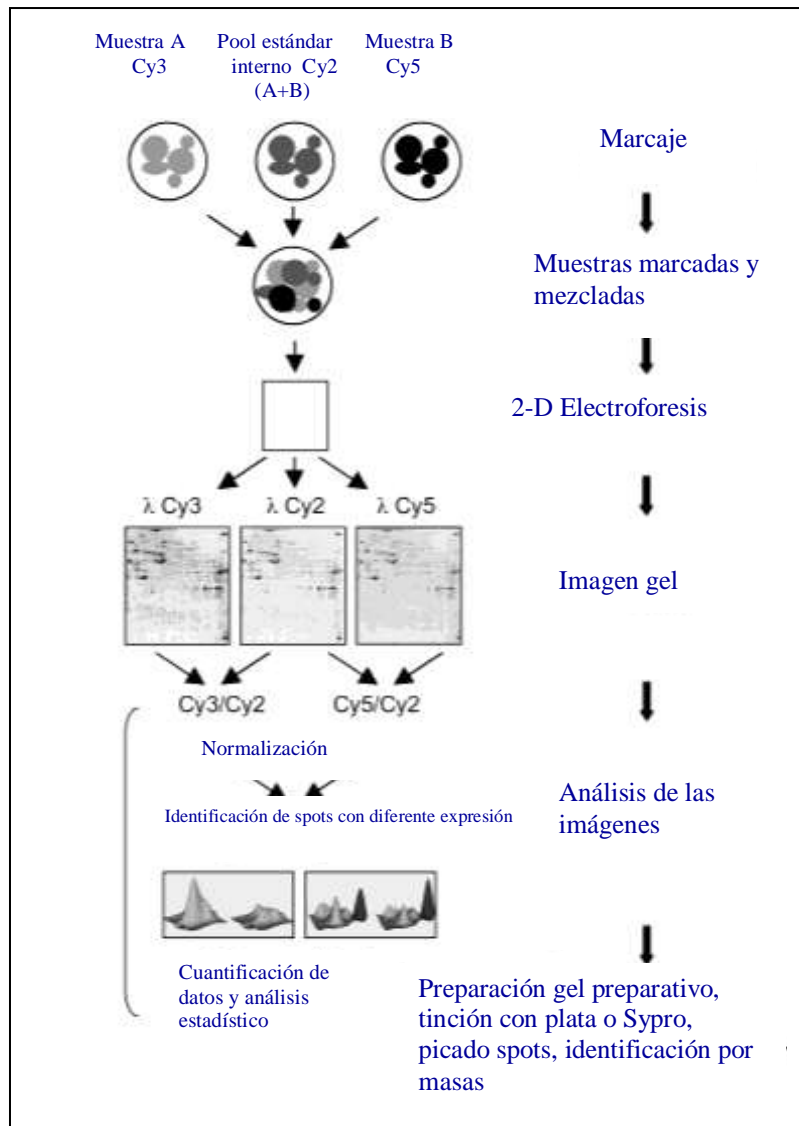


Figura-I14. Esquema general del método *Differential In-Gel Electrophoresis* (DIGE). Diseño experimental con tres fluoróforos, incluyendo muestras A, B y un estándar interno (mezcla de igual cantidad de todas las muestras incluidas en el experimento). Cada una es marcada con los fluoróforos Cy3, Cy5 y Cy2, respectivamente. Las muestras marcadas se mezclan y se resuelven en un gel 2D. El patrón de *spots* de proteínas se visualiza alternativamente excitando con diferentes longitudes de onda los fluoróforos. La imagen del gel se analiza mediante el software DeCyder, utilizando el estándar para normalizar. Se realiza el análisis estadístico y las proteínas con expresión diferencial son identificadas mediante espectrometría de masas a partir de un gel preparativo teñido con plata o con Sypro-Ruby.

Para obtener el máximo número de cisteínas marcadas, se requiere una gran proporción de fluoróforo (marcador), de ahí el nombre de “*saturation*”. De esta manera se pretenden marcar todas las cisteínas disponibles para cada proteína.

En este caso, no se utiliza el estándar interno.

Los *spots* (manchas) se pueden picar directamente del gel, eliminando el paso de tener que hacer un gel preparativo (**Shaw et al., 2003**).

IV. Una visión bioquímica global.

La finalidad de este apartado no es dar una visión detallada y comprensiva sobre los mecanismos de oxidación de las proteínas, ya que esto se puede encontrar en cualquiera de las siguientes revisiones (**Xu and Chance, 2007; Dalle-Donne et al, 2006; Imlay, 2003; Hawkins and Davies, 2001; Stadtman and Berlet, 1997; Stadtman, 1993**). Su finalidad es proporcionar una visión global sobre los productos que se forman en la oxidación de las proteínas en términos de diversidad y especificidad química con el fin de resaltar las posibles estrategias analíticas y actuales retos de la proteómica redox.

Las modificaciones oxidativas de las proteínas tienen lugar por el ataque de especies reactivas de oxígeno (ERO) tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido (O_2^-), o el radical hidroxilo (OH^\bullet), y especies reactivas de nitrógeno (ERN) tales como el NO, nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), y peroxinitritos ($ONOO^-$), como se muestra en la **Figura-I15 (Beckman and Koppenol, 1996)**.

Estas especies pueden estar presentes en el medioambiente o aparecer como co-productos naturales del metabolismo del oxígeno y el nitrógeno, o bien como una interacción entre ambas situaciones. Como ya hemos indicado anteriormente, el ataque de las proteínas por estas especies altamente reactivas puede conducir a la modificación de cadenas aminoácidas laterales, roturas de la cadena proteica, generación de grupos carbonilos y formación de entrecruzamientos (*crosslinking*) complejos de cadenas proteicas. Algunas reacciones son limitadas y específicas de determinados restos aminoácidos, mientras que otras dan lugar a una amplia gama no específica de modificaciones.

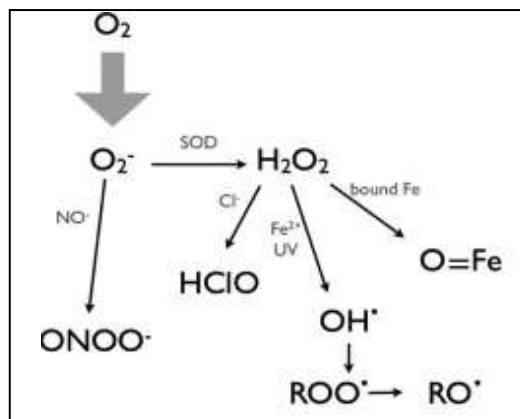


Figura-115. Especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN). SOD: superóxido dismutasa.

Además, las sustancias oxigenadas y nitrogenadas activas también son responsables del daño de las bases del DNA y de los monómeros de los hidratos de carbono (polisacáridos, principalmente), y de la degradación de lípidos a través de procesos de peroxidación, cuyos sub-productos también pueden reaccionar con las proteínas, modificándolas.

En la célula, en condiciones homeostáticas-fisiológicas, se van produciendo modificaciones oxidativas. Cuando éstas modificaciones se van acumulando, la célula se va adaptando hasta que pasado un cierto valor se va alcanzando un estado de estrés, que si no es eliminado por

procesos/moléculas antioxidantes se van a generar daños que afectarán al funcionamiento o a la fisiología de la célula (**Figura-I16**).

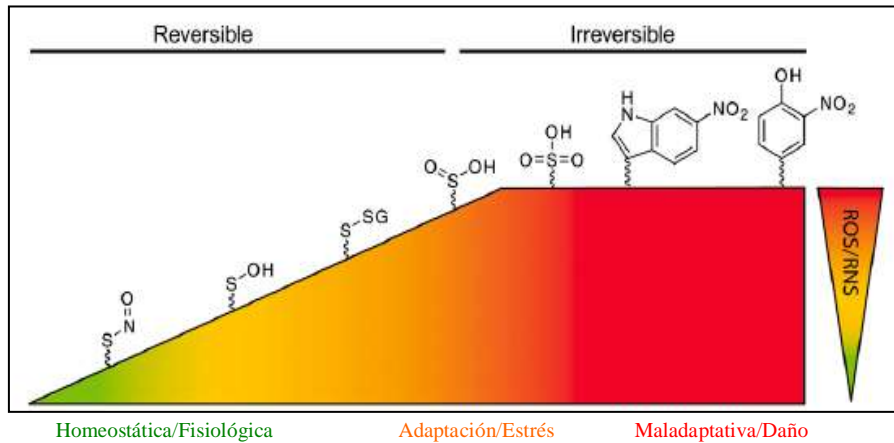


Figura-I16. Relación entre la continuidad de las modificaciones redox, los niveles de ERO/ERN y sus consecuencias

IV.1.- Oxidación y rotura de la cadena polipeptídica.

El esqueleto peptídico puede ser atacado por el radical hidroxilo sobre el carbono- α de los restos aminoacídicos, dando lugar a la formación de un radical centrado en carbono (*carbon-center radical*). Bajo condiciones anaerobias, dos de estos radicales centrados en carbono se pueden combinar para formar un entrecruzamiento intra- o inter-proteico (ver más abajo). En presencia de oxígeno, se puede añadir un grupo hidroxilo a este radical centrado en carbono. Seguidamente, el carbono- α hidroxilado puede sufrir la rotura de la cadena polipeptídica a nivel del enlace N-C a través de la vía de α -amidación, formándose un grupo amida en el extremo C-terminal de la parte N-terminal de la proteína, y un residuo α -ceto-acil en el extremo N-terminal de la parte C-terminal de la proteína (**Stadtman, 2006, 1993; Davies, 2005; Hawkins and Davies, 2001**)

El mismo radical centrado en carbono puede ser atacado por O₂, e inducir la rotura de la cadena polipeptídica, a nivel de un enlace C-C, a través de la vía de la diamida, como se muestra en la **Figura-I17**. La vía de la diamida inicialmente induce la rotura, dejando un derivado diamídico en el extremo C-terminal de la parte N-terminal, y un derivado isocianato en el extremo N-terminal de la parte C-terminal de la proteína, que espontáneamente forma el derivado que se muestra en la parte inferior de la **Figura-I17** (**Stadman, 2006**).

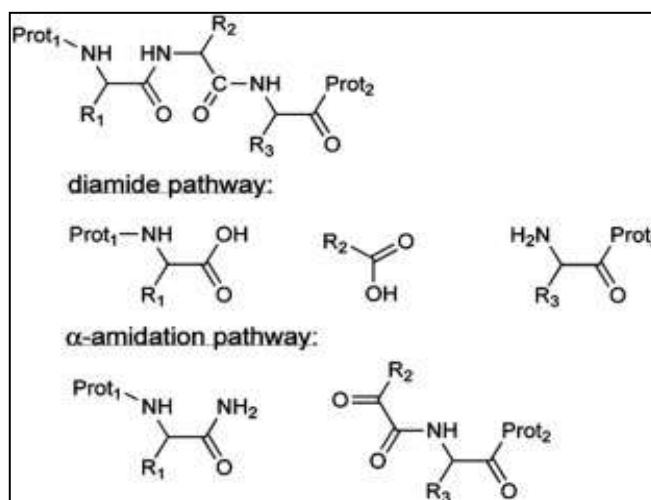


Figura-I17. Esquemas de las vías de la diamida y de la α-amidación.

Adicionalmente, la oxidación de restos aminoacídicos de glutámico y prolina también pueden conducir a la rotura de la cadena polipeptídica. Como se muestra en la **Figura-I18**, la rotura a nivel del resto de glutamilo libera una amida en el extremo C-terminal de la parte N-terminal de la proteína, y un resto de piruvil en el extremo N-terminal de la parte C-terminal de la proteína, mientras que la oxidación de restos de prolina libera dos fragmentos proteicos con extremos convencionales y ácido α-amino-butírico (**Stadman, 2006**).

Por último, la escisión-β puede ocurrir a través de un ataque radical sobre la posición-β (C3), como se muestra en la **Figura-I19** (**Headlam and Davies, 2004; Hawkins and Davies, 2001; Stadman, 1993**): la liberación de la

cadena lateral como un compuesto carbonílico genera un radical sobre el carbono- α , que seguidamente facilita la rotura de la cadena polipeptídica a través de un mecanismo similar al de la vía de la diamida o de la vía de la α -amidación.

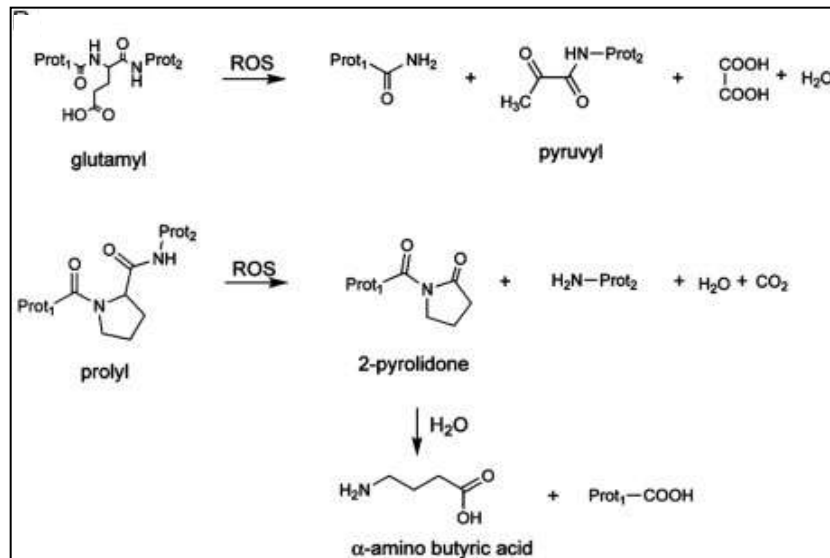


Figura-I18. Rotura de la cadena polipeptídica por oxidación de restos aminoácidos de glutámico y prolina.

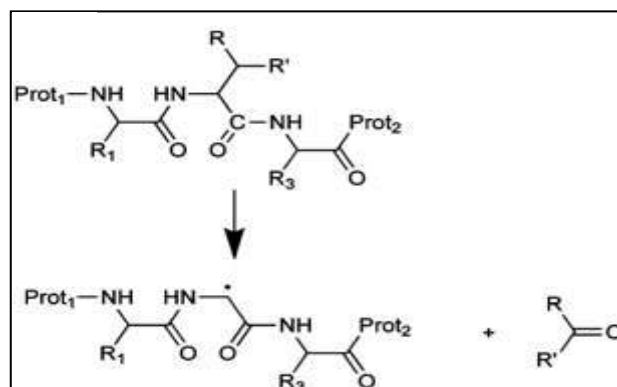


Figura-I19. Esquema de la β -escisión.

IV.2.- Carbonilación de proteínas.

Los grupos carbonilos en las proteínas se forman por la oxidación de las cadenas laterales de restos aminoacídicos de prolina, arginina, lisina (**Figura-I20**) y treonina (**Nystrom, 2005; Hawkins and Davies, 2001; Levine and Stadman, 2001**). Estos grupos carbonilos también pueden generarse como consecuencia de la rotura de la cadena polipeptídica por vía de la α -amidación o β -escisión. Alternativamente, estos grupos pueden introducirse en las proteínas mediante una adición de tipo Michel de aldehídos insaturados producidos por peroxidación lipídica, siendo la adición de 4-hidroxi-2-nonenal sobre restos de cisteína, histidina y lisina el principal fenómeno, tal como se muestra en la **Figura-I21** (**Burcham and Kuhan, 1996; Yoritaka et al., 1996; Uchida and Stadman, 1993; Esterbauer et al., 1991**).

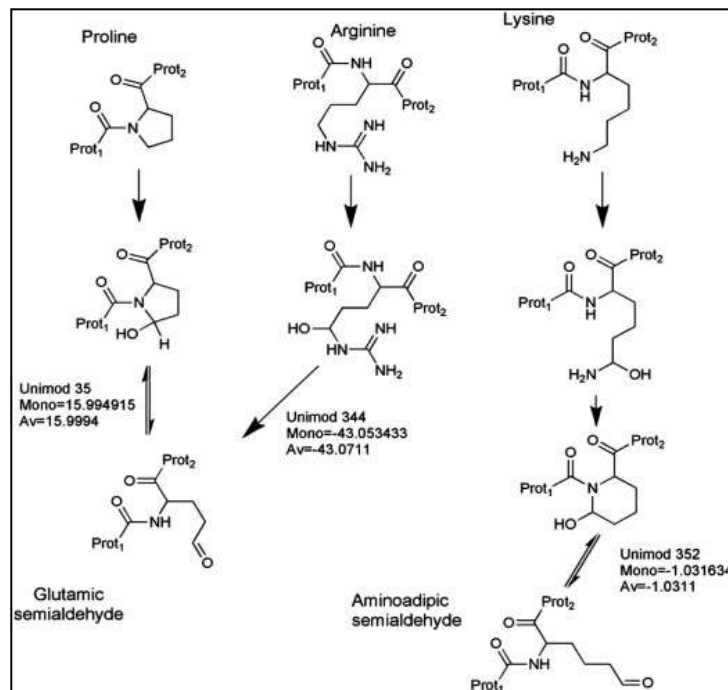


Figura-I20. Carbonilación de la cadena lateral de restos aminoacídicos.

Como la carbonilación es el resultado de la introducción de grupos aldehídos y cetonas reactivos en las proteínas, su cuantificación resulta

relativamente fácil, como discutiremos más abajo, y de hecho su incremento, en la práctica, se considera como un marcador fiable de estrés oxidativo (**Dalle-Donne et al., 2006a; 2005**).

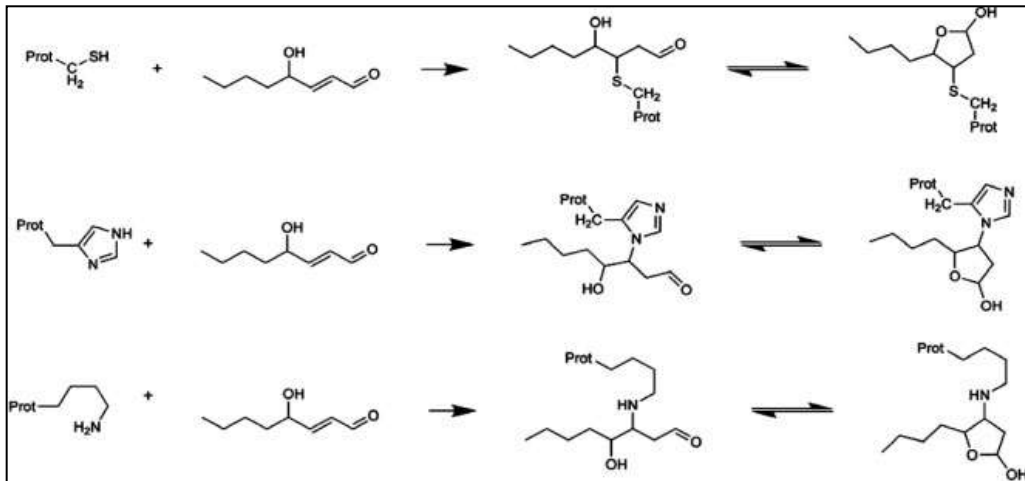


Figura-I21. Introducción de grupos carbonilos en las proteínas por la adición de 4-hidroxi-2-nonenal sobre restos de cisteína, histidina o lisina a través de una adición tipo Michel.

IV.3.- Tiol y tioésteres en las proteínas.

Los grupos tiol de los restos aminoacídicos de cisteína en las proteínas, dependiendo de su localización y las especies con que interaccionen, pueden sufrir una gran cantidad de modificaciones oxidativas. Además, como las cisteínas suelen desempeñar un papel importante desde el punto de vista estructural gracias a la formación de puentes disulfuros, su estado de oxidación es de una importancia capital para la función de la proteína.

En los últimos años, la oxidación de las cisteínas se está reconociendo cada vez más como un mecanismo de regulación basal (**Rhee et al., 2000**). Los grupos sulfhidrilos libres pueden sufrir directamente, oxidación reversible a ácido sulfénico, y con mayor frecuencia oxidaciones irreversibles a ácido sulfínico y sulfónico (**Figura-I22**). Los grupos sulfhidrilos se pueden también nitrosilar (**Hogg, 2002**).

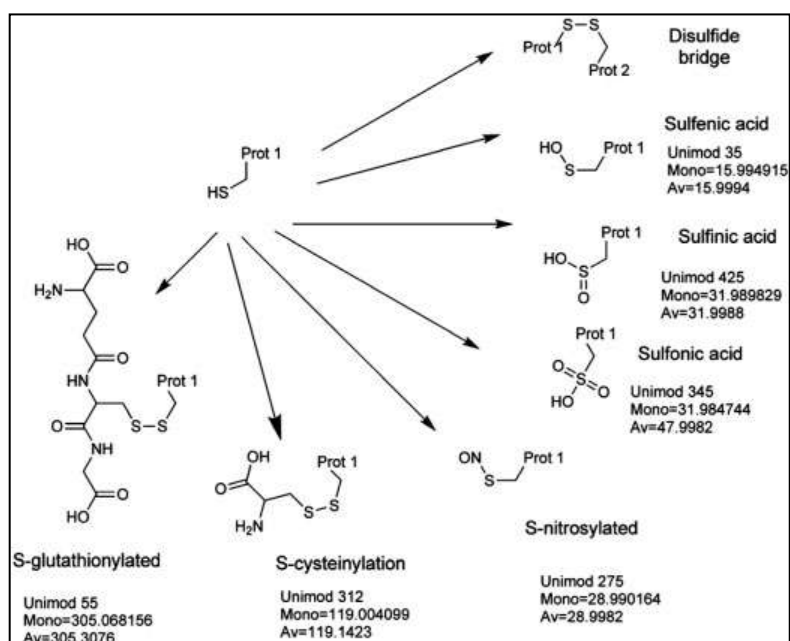


Figura-I22. Principales productos de oxidación de los restos de cisteína.

Además los grupos sulfhidrilos libres pueden formar puentes disulfuros, bien reaccionando con otros grupos sulfhidrilos libres de la propia molécula proteica o de moléculas de glutatión (**Dalle-Donne et al., 2007; Fratelli et al., 2004; Dormann et al., 1993; Bergenhem et al., 1986**). La S-glutathionización, en la mayoría de los casos, son modificaciones permanentes, excepto si en la molécula proteica hay un segundo grupo sulfhidrilo libre susceptible de formar un puente disulfuro intramolecular.

Conjuntamente con la cisteína, los restos de metionina constituyen el grupo de restos aminoacídico proteícos más fácilmente oxidables. En la **Figura-I23** se muestran los productos de oxidación a que puede dar lugar la metionina (**Vogt, 2005**).

El proceso cíclico de oxidación-reducción de la metionina NADPH-dependiente gracias a la tiorredoxina reductasa es un importante mecanismo antioxidante celular (**Stadman et al., 2005, 2003b; Levine et al., 1999, 1996**). El incremento de sulfóxido de metionina con la edad en las proteínas se ha

encontrado en diferentes tejidos, pero sobre todo en eritrocitos (**Stadman et al., 2005**).

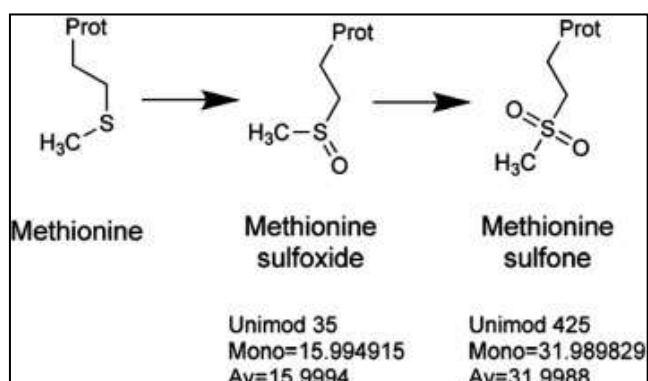


Figura-I23. Productos de oxidación a que puede dar lugar la metionina

IV.4.- Nitración de tirosinas (Nitrotirosinas).

El ión peroxinitrito (ONOO^-) formado como consecuencia de la reacción entre el ión superóxido (O_2^-) y el NO (**Pacher et al., 2007; Szabo et al., 2007; Radi, 2004; Alvarez and Radi, 2003; Goldstein et al., 2000, Beckman and Koppenol, 1999; Patel et al., 1999; Eiserich et al., 1998; Lymar and Hurst, 1998; Murphy et al., 1998; Beckman et al, 1990**), es un oxidante muy fuerte, pero con una vida media muy corta. Una vez formado intravascularmente, puede experimentar directamente una oxidación con otras biomoléculas dianas o generar radicales que, posteriormente, pueden llevar a cabo reacciones de oxidación o nitración. La nitración de las tirosinas tiene lugar a través de un mecanismo en dos etapas: *i*) formación de un radical tirosil; *ii*) el radical tirosil reacciona con el radical libre NO para formar 3-nitrotirosina (**Figura-I24**) (**Quijano et al., 2005**).

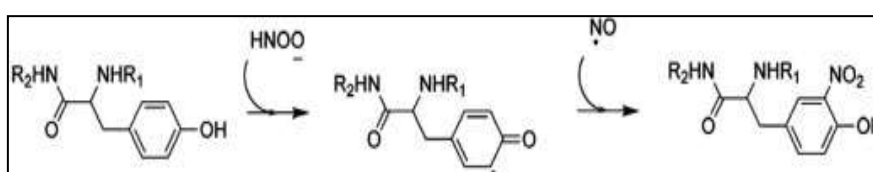


Figura-I24: Formación de la 3-nitrotirosina.

La 3-nitrotirosina se ha mostrado como un buen biomarcador de estrés nitrosoactivo y puede utilizarse en el pronóstico de enfermedades coronarias arteriales (**Radi, 2004; Shishehbor et al., 2003**), entre otras, y probablemente también en la EH (**Schliess et al., 2004**).

IV.5.- Entrecruzamiento de proteínas (*Protein crosslinking*).

Como ya hemos dicho previamente, la cadena polipeptídica puede ser atacada por el radical hidroxilo sobre el carbono- α de los restos aminoacídicos, dando lugar a un radical centrado en un carbono. En ausencia de oxígeno, dos de estos radicales centrados en carbono pueden combinarse para formar un entrecruzamiento (*crosslinking*) intra- o intermolecular. Adicionalmente, los enlaces entrecruzados también pueden aparecer por la oxidación de restos de cisteína intra- o intermoleculares, dando lugar a la formación de puentes disulfuro. Por último, también se han descrito otros enlaces entrecruzados inducidos por oxidación de restos aminoacídicos específicos, tales como dos tirosinas para formar ditirosinas (**Di Marco et al., 2007**), o uniones sulfuro-nitrógeno (por ejemplo, Cys-Lys y Cys-Arg) (**Fu et al., 2002**).

V. Metodología aplicada en Proteómica-redox.

El campo de la Proteómica redox ha heredado de la Bioquímica clásica una gran cantidad de metodología, para el análisis de los productos formados en la oxidación de proteínas. Sin embargo, la proteómica intenta analizar todas las proteínas presentes en una determinada muestra, y la identificación de las modificaciones a nivel de restos aminoacídicos. Al mismo tiempo, las modificaciones oxidativas no son estequiométricas, y presentan una gran diversidad (fragmentos proteicos con extremos convencionales y no convencionales, hidroxilaciones, carbonilaciones, oxidación de cisteínas y metioninas, nitrotirosinas, entrecruzamiento, sólo por mencionar las más

importantes). Como se ha comentado con anterioridad, actualmente no existe un protocolo proteómico-redox que nos permita estudiar globalmente toda esta diversidad de modificaciones, teniéndose que centrar en el estudio de determinados tipos de oxidación por separado.

A continuación describimos la metodología para el estudio de las principales modificaciones oxidativas que tienen lugar en las proteínas. En nuestro caso, nos centraremos en la metodología para el estudio de grupos carbonilos (carbonilación)

V.1.- Detección y cuantificación de grupos carbonilos.

Desde hace tiempo los grupos carbonilos vienen considerándose como un biomarcador de carácter global de la oxidación de proteínas. La detección de grupos carbonilos es relativamente sencilla debido a la presencia de grupos aldehído y/o cetonas reactivos. Estos grupos reaccionan cuantitativamente con las hidracinas e hidracidas para formar hidrazonas. Por lo que, de esta manera, puede cuantificarse espectrofotométricamente el contenido en grupos carbonilos, por ejemplo, utilizando 2,4-dinitrofenil-hidracina (DNPH) (**Figura-I25**).

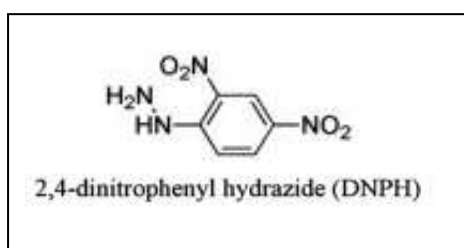


Figura-I25: Esquema de la estructura de la 2,4-dinitrofenil-hidracina (DNPH).

Los resultados, generalmente, se expresan en moles o micromoles de grupos carbonilos por gramos de proteína (**Levine et al., 1994; Reznick and**

Packer, 1994). Este ensayo espectrofotométrico no está exento de errores, tales como la presencia de exceso de DNPH (**Fagan et al., 1999**), o de grupos carbonilos no-proteicos.

Alternativamente, también se han desarrollado ensayos tipo ELISA para el estudio cuantitativo de grupos carbonilos derivatizados con DNPH (**Alamdari et al., 2005; Robinson et al., 1999; Buss et al., 1997**).

La misma química puede utilizarse en combinación con la electroforesis en geles, seguida de inmunodetección (**Yan et al., 1998; Nakamura and Goto, 1996**).

Como alternativa a los métodos basados en las hidracinas e hidracinas, Yoo y Regnier (**Yoo and Regnier, 2004**) han desarrollado un método basado en la biotinylación para el marcaje específico de proteínas carboniladas separadas por electroforesis bidimensional (2D) (**Figura-I26**).

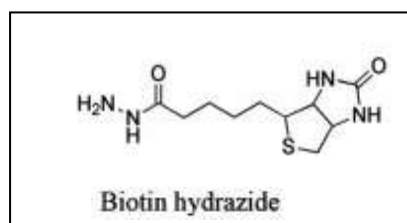


Figura-I26: Esquema de la estructura del reactivo Biotin hydrazide utilizado para el marcaje específico de las proteínas carboniladas separadas mediante 2D.

Frecuentemente las proteínas carboniladas necesitan concentrarse y/o aislarse, ya que no están en concentraciones suficientes o para evitar interferencias analíticas debido a la presencia de otras proteínas mayoritarias, sobre todo en los análisis por espectrometría de masas (MS).

V.2.- Enriquecimiento de proteínas carboniladas.

El enriquecimiento en proteínas carboniladas puede llevarse a cabo de varias maneras que describiremos a continuación.

Una posible estrategia es usar la derivatización con DNPH en combinación con anticuerpos anti-DNPH para precipitar las proteínas marcadas (proteínas carboniladas), tal como England y Cotter han demostrado en el estudio de la oxidación de proteínas del retículo endoplasmático de células HL-60 mediante electroforesis 2D e Ionización Desorción asistida por Láser con una Matriz (MALDI-TOF MS) (**England and Cotter, 2004**), y por Kristensen *et al.*, (**Kristensen *et al.*, 2004**) en el estudio de la oxidación de las proteínas mitocondriales del arroz mediante 2D *Liquid Chromatography masas/masas* (LC-MS/MS).

Otra alternativa es el marcaje por afinidad para el aislamiento específico de las proteínas carboniladas. Por ejemplo, usando hidracina-biotinilada para marcar los grupos ceto y aldehído y columnas de avidina para el aislamiento específico de las proteínas o péptidos derivatizados (**Meany *et al.*, 2007; Mirzaei and Regnier, 2007, 2006a, 2005; Temple *et al.*, 2006; Soreghman *et al.*, 2003**).

Recientemente, Mirzaei y Regnier (**Mirzaei and Regner, 2007**) han comparado tres diferentes estrategias basadas en el marcaje de grupos carbonilos con hidracina-biotinilada antes de su análisis por espectrometría de masas: separación por cromatografía de afinidad, proteolisis y *Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC). Ellos han encontrado que la realización de la separación por cromatografía de afinidad y luego la cromatografía RP-HPLC a nivel de proteína, antes de la proteolisis y la identificación por espectrometría de masas, proporcionan mayor cantidad de información, ya que el trabajo con las proteínas íntegras permite la detección de las modificaciones por *crosslinking* o de proteínas truncadas.

Roe *et al* (Roe *et al.*, 2007) utilizando una aproximación similar, han derivatizado directamente bolitas de cristal con grupos hidracida, permitiendo la separación de las proteínas carboniladas por simple decantación o centrifugación.

Una técnica que facilita la concentración de la muestra es la inmunoprecipitación con *Dynabeads® Protein-A or Protein-G* desarrollada por Invitrogen (Budde *et al.*, 2001). Las *Dynabeads®* son partículas magnéticas esféricas a las que se les une bien la proteína A o bien la proteína G (**Figura-127**). Combinando la distinta capacidad de unión de estas proteínas por los diferentes tipos de inmunoglobulinas y la posibilidad de separarlas con un imán podemos inmunoprecipitar las proteínas de interés, en este caso las carboniladas, ya que como anticuerpo utilizamos un anti-DNP.

Recientemente el grupo de Regnier ha desarrollado un reactivo diferente para marcar los grupos carbonilos: el reactivo de Girard-P (**Figura-128**), que consta de un grupo hidracina unido a un brazo con carga positiva permanente.

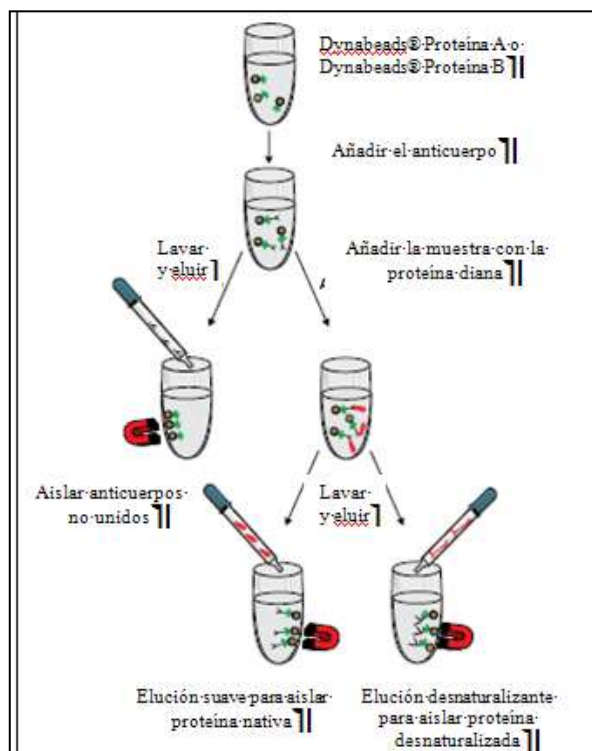


Figura-I27: Aislamiento de la proteína diana utilizando el anticuerpo específico y Dynabeads.

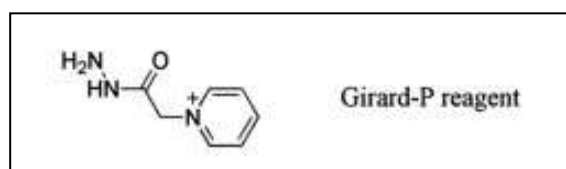


Figura-I28: Esquema de la estructura del reactivo de Girard-P desarrollado por el equipo de Regnier (Mirzaei and Reigner, 2006 b, c)

Utilizando este reactivo en combinación con la cromatografía de intercambio catiónico fuerte, estos autores han sido capaces de enriquecer sus muestras en péptidos y/o proteínas carboniladas y cuantificarlos gracias al marcaje isotópico con el reactivo de Girard-P.

Por último, recientemente han introducido el denominado *Oxidation dependent element coded affinity tags* (O-ECAT), que son reactivos que llevan un grupo amino-oxy capaz de formar enlaces covalentes con aldehídos y cetonas, y un grupo quelante de metales (**Figura-I29**) (Lee *et al.*, 2006). El uso de anticuerpos anti-grupo quelante metálico, permite la selección, aislamiento y enriquecimiento de los péptidos/proteínas derivatizados. Utilizando reactivos cargados con diferentes metales podemos utilizar este procedimiento de manera cuantitativa en los análisis por MS.

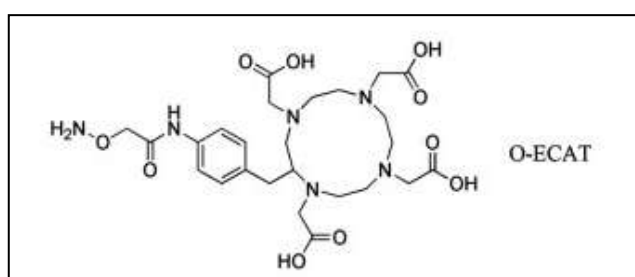


Figura-I29: Esquema de la estructura común de los denominados O-ECAT.

HIPÓTESIS DE TRABAJO
Y
OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Procedencia de reactivos químicos, bioquímicos y aparatos.

Todos los reactivos y materiales utilizados han sido de calidad analítica, de las siguientes empresas: Sigma-Aldrich, Bio-Rad, Gealthcare-Biosciences, Invitrogen, Dako-Cytomation, Millipore, Eppendorf, Waters, Pierce, Beckam Braun, Heraeus, Sartorius, Qiagen Hilder, Fujifilm, National Labnet, Laser Biolabs, Favorgen Biotech Corp, Romero y Applied Biosystem.

Los detalles específicos sobre cada uno de ellos se indican en el correspondiente apartado.

II. Material biológico: Operación de animales y extracción de tejido.

II.1.- Animales experimentales.

Se han utilizado ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), machos de 250-350g de peso procedentes del animalario de Espartinas (Universidad de Sevilla). Para la producción del estado de EH se ha utilizado el modelo animal: derivación porto-cava (**Jover, 2006**).

Los animales se han dividido en dos grupos: animales operados a los que se les practica una derivación porto-cava (ratas-*dpc*; para producirle EH), y animales sometidos a las mismas condiciones de la intervención quirúrgica, pero en las que no se realiza la anastomosis (ratas-*sham*) (**Figura-M&M1**). Los animales se alimentaron con una dieta estándar (Panlab, Barcelona, España), de composición: 54% carbohidratos, 12% proteínas (caseína) y 5% lípidos,

siendo el resto material no digerible. Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándares de luz (12 horas luz /12 horas oscuridad), temperatura de 23 ± 2 °C, humedad del 60-70 % y con libre acceso tanto a la comida como al agua. Los animales tras la intervención, se han mantenido, bajo las mismas condiciones, durante un periodo de 6 semanas. El cuidado y la manipulación animal se ha efectuado siguiendo la Norma Directiva 86/609/CEE. Se ha evitado, en todo momento, cualquier sufrimiento innecesario, y se han seguido las normas dictadas por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla (<http://investigacion.us.es/area-investigacion/comite-etico>). Todas las intervenciones quirúrgicas se han realizado bajo la Normativa vigente, RD 223 de 14 de Marzo de 1998 (BOE 18 de Marzo de 1998), en el quirófano de Cirugía Experimental del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

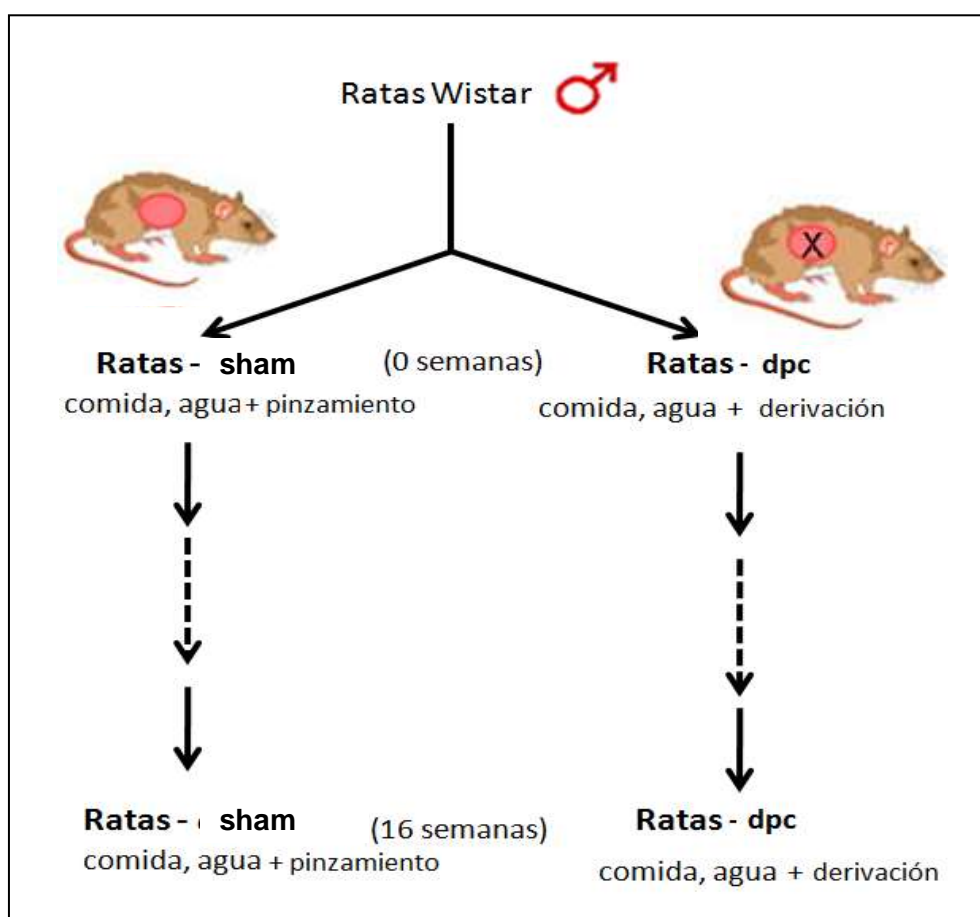


Figura-M&M1.- Esquema del planteamiento experimental en el modelo de EH con derivación porto-cava.

II.2.- Modelo experimental de anastomosis o derivación porto-cava.

La intervención fue realizada por el Dr. Daniel Díaz Gómez del Hospital Universitario de Valme. Previamente a la intervención, los animales se han sometido a anestesia general por inhalación con isofluorano, mediante la exposición del animal a una mezcla de oxígeno, aire y gases anestésicos (5%), a flujos altos. Se ha aplicado la mezcla gaseosa mediante una mascarilla en la que se introduce la cabeza completa del animal, consiguiéndose su efecto anestésico en unos 20-30 segundos. El animal queda en ventilación espontánea. El mantenimiento de la anestesia se consigue con porciones del gas anestésico de entre el 2 y el 3% (según peso del animal). Una vez que se ha producido el clampaje de los grandes vasos, ya sea para la realización de la técnica de la anastomosis o para el grupo *sham*, la proporción del gas anestésico se reduce a un 0,5%-0,75%. Tras la anestesia, se procede al rasurado abdominal y desinfección de la piel con povidona yodada. La operación se lleva a cabo por laparotomía media y evisceración del paquete intestinal, disección de la cava infrahepática por encima de las venas renales y de la grasa del retroperitoneo y disección del hilio hepático, en especial de la vena porta, prestando especial atención a la liberación de la misma de la arteria hepática común, que se encuentra íntimamente unida a la porta por su cara posterior (**Figura-M&M2**). En esta fase es fundamental no lesionar ninguna de las dos, puesto que durante el clampaje de la porta, la arteria es la única que suministra flujo sanguíneo al hígado. A continuación se hace pasar un primer hilo trenzado de 2-3 ceros por detrás de la cava y por detrás de la porta, justo por encima del confluente espleno-mesaraico y otro segundo hilo por debajo de dicho confluente. Al traccionar de ambas suturas en sentidos cefálico y caudal, respectivamente, ambos vasos sanguíneos quedan aproximados entre sí. Una vez dispuestos de este modo los vasos, son clampados con un clamp vascular de Satinsky, que mantiene ambos vasos en esa postura, permitiendo la realización de la técnica de anastomosis (**Numata, 1983**).

Para garantizar el éxito de la técnica, así como la viabilidad del animal tras la intervención, es necesario que el tiempo de oclusión vascular no exceda

de 20 minutos, minimizando así el efecto de los fenómenos trombóticos tanto en la porta como en la cava, que impiden la supervivencia del animal.

En el grupo *sham* se ha mantenido el clampaje 25 minutos en todos los animales, sin producirse ningún caso de mortalidad post-operatoria. En ratas con *dpc* o anastomosis esta mortalidad ha sido de un 12%.

Tras ser operadas, se mantuvieron dos días en el Centro de Experimentación Animal del Hospital Universitario Virgen del Rocío, trasladándose posteriormente al estabulario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, manteniéndose allí hasta su sacrificio en condiciones dietéticas y ambientales correspondientes a un mantenimiento estándar controlado, descrito anteriormente

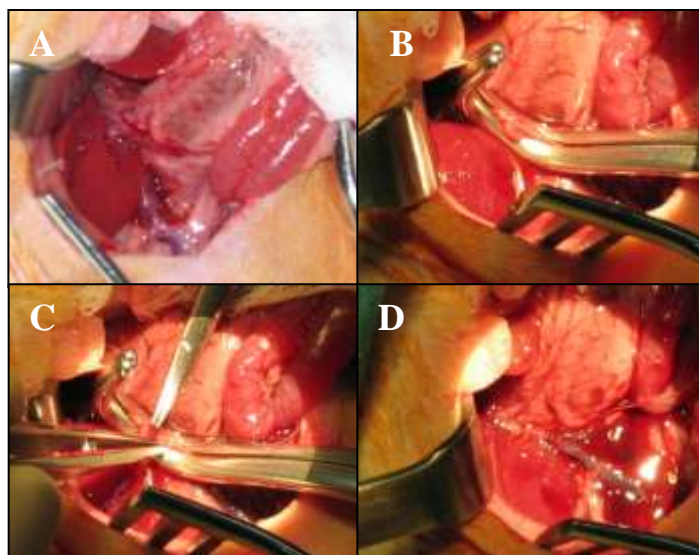


Figura-M&M2: Operación de anastomosis. **A)** Evisceración y búsqueda de la vena hepática; **B)** Clampaje; **C)** Cortar y coser cada extremo de las venas porta y cava; **D)** Vista de la anastomosis terminada.

II.3.- Test de comportamiento: laberinto.

La capacidad de aprendizaje de las ratas-*dpc* y ratas-*sham* se llevó a cabo mediante el test del laberinto, de acuerdo con el procedimiento descrito

por Murray and Ridley (1997) y modificado por Erceg *et al.* (2005) en un laberinto de tres brazos (en forma de Y) construido con plástico (PV) y con las siguientes dimensiones: 60 cm de largo, 11,5 cm de ancho, y 25 cm de alto. La rata se coloca, al inicio, en el extremo de uno de los brazos (punto de partida), siempre el mismo y en el extremo de los otros dos se coloca un cuenco con comida (puntos de llegada).

Todas las ratas se han entrenado en el laberinto durante 4 días con el fin de que se familiaricen con el ensayo. Para ello, los brazos con los puntos de llegada se cubrieron con un inserto blanco uno, y negro el otro. En cada ensayo las ratas se adiestraron para elegir el brazo izquierdo cuando el inserto era negro y el brazo derecho cuando el inserto era blanco, premiándolas con cuatro piezas de alimento cuando acertaban. Cuando las ratas se equivocaban se las dejaba llegar hasta el final y no se las premiaba, retirándolas a los 5 segundos. El número de ensayos (entrenamiento) fue de 10 por día, dejando un intervalo de unos 5 minutos entre ensayo.

II.4.- Aislamiento y recogida de muestras del tejido cerebral.

Tras 6 semanas de la operación y/o realización de la derivación portocava, se sacrificaron los animales con una sobredosis de pentobarbital, extrayendo lo más rápidamente posible los siguientes tejidos y órganos: sangre arterial, cerebro, hígado, riñón e intestino delgado, si bien, en el presente trabajo únicamente se han utilizado el cerebro y puntualmente la sangre arterial (plasma) de ratas-*dpc* y ratas-*sham*.

Una vez extraído el cerebro, en unos casos se ha utilizado todo el órgano y en otros casos se han separado diferentes centros: obteniéndose en primer lugar el cerebelo, para posteriormente tomar las diferentes áreas (corteza cerebral; ganglios basales o restos) siguiendo el protocolo utilizado por el Dr. Vicente Felipe del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia (**Figura-M&M3**). Una vez extraídos los tejidos estos se han congelado en N₂ líquido y se han almacenado a -80°C hasta su uso.

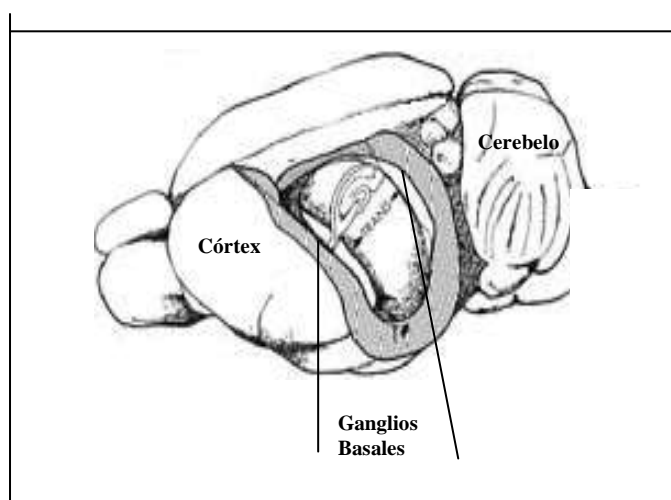


Figura-M&M3: Esquema de las diferentes áreas cerebrales, de rata, utilizadas en el estudio.

II.5.- Preparación de las muestras para procedimientos analíticos.

Cada área cerebral o bien el cerebro completo, según el tipo de muestra (ratas-*dpc* y ratas-*sham*), se troceó con tijeras en fragmentos de aproximadamente el mismo tamaño y se homogenizó en tampón de homogenización (0,25 M sacarosa, 0,5 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, 0,2 μ M PMSF que se añade antes de usar, pH 7,4): 0,1 g en 1 ml, en un homogenizador mecánico (Potter-Elvehjem) con pistilo de teflón en posición 8 (600 rpm), dando 5 pasadas, manteniendo la muestra en hielo. Obteniendo un homogenado bruto que se centrifugó a 2000 x g (Sepatech Megafuge 1.0R, Heraeus) durante 3 minutos a 4°C (**Figura-M&M4**). El pellet obtenido (P_0) se resuspendió en 400 μ l de tampón de homogenización y se volvió a centrifugar, recogiendo el sobrenadante y eliminándose el pellet obtenido (P_1), constituido por células no rotas, núcleos, citoesqueleto y restos celulares grandes que se depositan en el fondo del eppendorf. Los dos sobrenadantes obtenidos se mezclaron para formar S_1 (Sobrenadante 1; Homogenado), del cual se guardó una parte para su posterior análisis (a -80°C) y el resto se centrifugó a 12.500 x g durante 8 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante (S_2) lo conformaba el citoplasma, que se guardó a -80°C. El pellet 2 (P_2) que

contenía una fracción enriquecida en mitocondrias (además de peroxisomas, lisosmas) se resuspendió en 70 μ l de sample buffer (50 mM imidazol pH 7, 5 0mM ácido ϵ -amino caproico, 0,5 mM EDTA- Na_2). Para facilitar la solubilización de las mitocondrias, seguidamente se sonicaron las muestras en un sonicador (Braun) (3 ciclos de 3 segundos a máxima amplitud). Del homogenado resultante (Homogenado mitocondrial) se guardó una parte a -80°C. Al resto se le añadieron 10 μ l de solución detergente (10%(w/v) η -dodecil- β -D-maltósido) y se incubó durante 1 hora en hielo para que con el β -maltósido se solubilizaran las proteínas de membrana. La mezcla resultante se centrifugó a máxima revolución (16.000 x g) durante 10 minutos (Spectrofuge 16M) para separar las proteínas solubles contenidas en el sobrenadante (S_3) de aquellas no solubles y restos de membranas que se depositaron en el fondo del eppendorf (P_3).

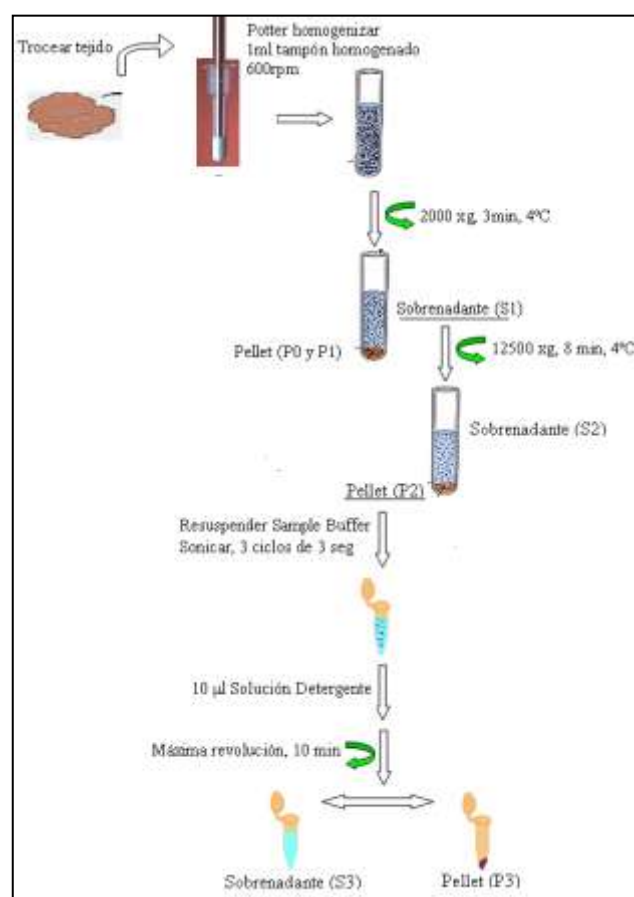


Figura-M&M4. Esquema del método de obtención del homogenado (para detalles ver texto).

II.6.- Preparación de las muestras para procedimientos electroforéticos.

Obtención del homogenado cerebral.

Las muestras de corteza cerebral y cerebelo (de ratas-*dpc* y ratas-*sham*) se pulverizaron con nitrógeno líquido manualmente. Ese polvo se guardó a -80°C para su conservación o bien se disolvió en buffer de lisis (10 mg/0.1 ml) (30 mM Tris-Cl pH 8.5, 2 M Thiourea, 7 M Urea, 4% (w/v) Chap). El homogenado se dejó en hielo 10 min y luego se sonicó durante 5 min en un baño con hielo. El ADN fue eliminado pasando el homogenado por una columna de QIA-Shredder (Qiagen Hilden) (máximo 0.7 ml de homogenado por sistema): centrifugar durante 5 min a 10.000 x g; el eluido se pasó a un nuevo eppendorf y se centrifugó a 18.000 x g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante constituye el homogenado, que se conservó a -80°C.

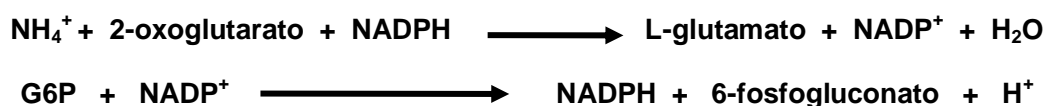
III. Determinación de parámetros bioquímicos.

III.1.- Determinación de los niveles de amonio plasmático.

Dormido el animal, con hidrato de cloral, se pincha la yugular y, rápidamente, se recogen unos 150 µl de sangre en un tubo eppendorf con 150 µl de trifluoroacético, TCA, al 10 % (frío), se pone en hielo, y se deja precipitar las proteínas durante 15 minutos. Centrifugamos a 13.000 x g, durante 15 min, a 4 °C y nos recogemos el sobrenadante. Del sobrenadante obtenido tomamos 150 µl en un eppendorf y lo ponemos en hielo. Añadimos KHCO₃ 2 M, preparado el mismo día de su uso, para neutralizar las muestras, pH 6,8- 7,5, ya que en medio ácido la glutamina se descompone en glutámico y amonio.

La cantidad de amonio presente en sangre se ha medido por el método enzimático de la glutamato-deshidrogenasa utilizando un analizador COBAS Integra 700. El método se basa, brevemente, en: la glutamato-deshidrogenasa

(GLDH) cataliza la aminación reductora del 2-oxoglutarato en presencia de NH_4^+ y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) para producir glutamato y NADP^+ . La concentración del NADP^+ es directamente proporcional a la concentración del amonio consumido. Para desplazar la reacción completamente hacia la derecha y poder hacerla cuantitativa, esta reacción se acopla a una segunda reacción, la de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), que consume el NADP^+ que se forma en la primera reacción, convirtiéndolo en NADPH.



El NADPH formado en la segunda reacción se secuestra mediante el sistema phenazine-ethosulfate/ 3(4-5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide (PES/MTT), por lo que la reacción se desplaza completamente hacia la derecha y se puede seguir midiendo la disminución de la absorbancia del NADPH a 340 nm (**Van Anken and Schiphorst, 1974**).

III.2.- Determinación de la concentración de proteínas: Método de Bradford.

Es un método colorimétrico para cuantificar la concentración de proteínas totales solubles dentro de un rango de 1-100 $\mu\text{g/ml}$ (**Bradford, 1976**). Se basa en la formación de un compuesto de adsorción de coloración azul entre los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas y el colorante azul Coomassie que presenta un máximo de absorción a 595 nm.

Las soluciones stock y de trabajo empleadas se muestran en la **Tabla-M&M1**. El protocolo seguido se indica, esquemáticamente, en la **Tabla-M&M2**. Todas las muestras se han analizado por triplicado, y la concentración se ha expresado como el valor medio \pm la desviación estándar (DE). Las concentraciones de las distintas muestras se determinaron por extrapolación a

partir de una recta patrón de concentraciones conocidas (0-100 µg/ml), construida a partir de una solución estándar de ovoalbúmina (0,1 mg/ml) (Figura- M&M5).

Tabla-M&M1: Soluciones del método de Bradford.

SOLUCIONES		
Solución stock	Etanol 95%	100 ml
	Ácido fosfórico 88%	200 ml
	Serva Blue G	350 ml
	Estable a temperatura ambiente al menos durante 6 meses	
Solución de trabajo	H ₂ O MilliQ	425 ml
	Etanol 95%	15 ml
	Ácido fosfórico 88%	30 ml
	Solución stock	30 ml
	Filtrar a través de papel Whatman nº1. Estable a temperatura ambiente al menos durante 6 meses	

Tabla-M&M2: Esquema del protocolo para el método de Bradford.

CURVA PATRÓN				
Solución ovoalbúmina 0.1 mg/ml (µl)	H₂O (µl)	Solución trabajo (µl)	Concentración (µg/ml)	Absorbancia 595 nm
0	100	1000	0	
10	90	1000	10	
20	80	1000	20	
25	75	1000	25	
50	50	1000	50	
75	25	1000	75	
100	0	1000	100	
MUESTRAS				
Muestra (µl)	H₂O (µl)	Solución trabajo (µl)	Concentración (µg/ml)	Absorbancia 595 nm
Cb S1	20	80	1000	
Cb S1	50	50	1000	
Cb S1	100	0	1000	

La medida de la absorbancia se toma tras 15 min de incubación a temperatura ambiente.

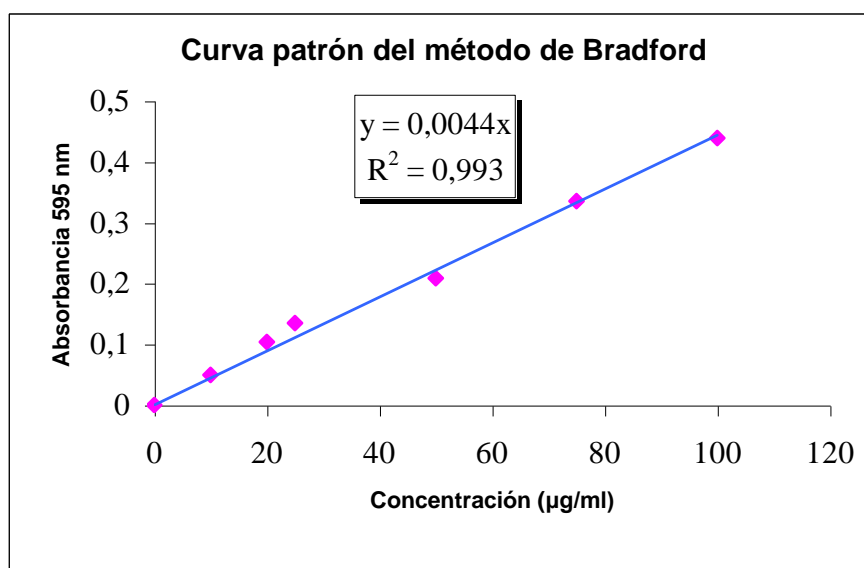


Figura-M&M5: Curva patrón de ovoalbúmina. Método de Bradford.

III.3.- Determinación del estado oxidativo de las muestras: oxidantes activos.

La medida del nivel de “oxidantes activos” o especies oxidativas (ERO y ERN) se ha llevado a cabo mediante el método de la DCFH-CA (Diclorofluoresceína-diacetato) (**Wang and Joseph, 1999**) modificado para tejidos. El DCFH-DA es permeable a las membranas celulares, una vez en el interior de la célula es hidrolizado a diclorofluoresceína (DCFH) por las esterasas. La DCFH en presencia de oxidantes es oxidado a un compuesto fluorescente, la diclorofluoresceína oxidada (DCF), el cual puede utilizarse como marcador citosólico de estrés oxidativo (**Figura-M&M6**).

Una vez tratado el tejido (*slices*), resuspendido en medio FBS (Fetal Bovine Serum), con tripsina y colagenasa para separar/disgregar las células lo más posible, se añade DCFH-CA a una concentración final de 25 µM (a partir de una concentración stock 25 mM) y se incuba durante 90 min a 37°C. Seguidamente, se centrifuga a 2.000 x g durante 10 min y el *pellet* se lava dos

veces con tampón fosfato salino a pH 7,4. Seguidamente se rompen las células del *pellet* y se centrifuga a 10.000 x g, recogiendo el sobrenadante para medir la fluorescencia debida al DCF formado intracelularmente. Los radicales libres se miden fluorimétricamente utilizando una $\lambda_{exc} = 485$ nm y una $\lambda_{em} = 538$ nm.

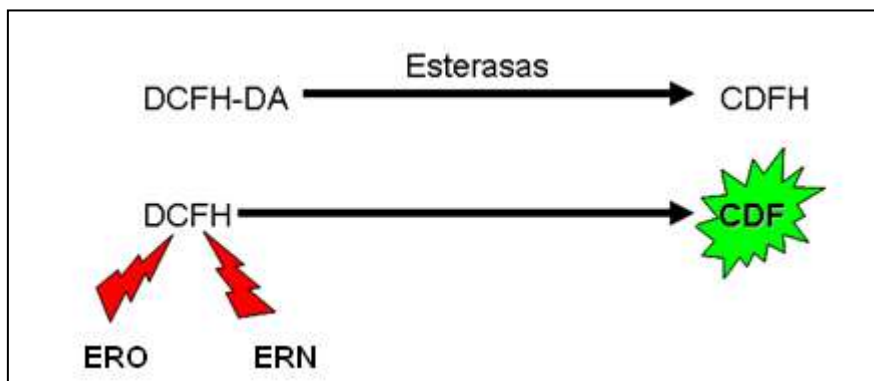


Figura-M&M6: Esquema del fundamento teórico del método de la DCFH-DA.

III.4- Determinación de óxido nítrico.

La producción de óxido nítrico (NO) se ha determinado mediante el método de Griess, a partir del contenido de nitrito. El nitrito es un producto estable del NO que al reaccionar con el reactivo de Griess, forma el producto azo- α -aminonaftaleno-parabencen-sulfónico (Schaus, 1956) (Figura-M&M7), que puede determinarse espectrofotométricamente a 540 nm.

El reactivo de Griess [sulfanilamida al 1% (reactivo-I) y N-(1-naftil)-etilendiamina (reactivo-II) en proporción 1:2] se suele preparar el mismo día de uso. Ahora bien, una vez mezclados los dos reactivos en la proporción indicada, si se añade H_3PO_4 al 0,5% el reactivo es estable al menos durante tres meses a 4°C. Brevemente: 100 μ l de muestra se tratan con 200 μ l de reactivo de Griess y se incuban a temperatura ambiente durante 10 min. La cantidad de nitrito formado se cuantifica midiendo la absorbancia a 540 nm en un lector de placas. La cuantificación se ha realizado por extrapolación sobre una curva estándar de nitrito (0-100 μ M).

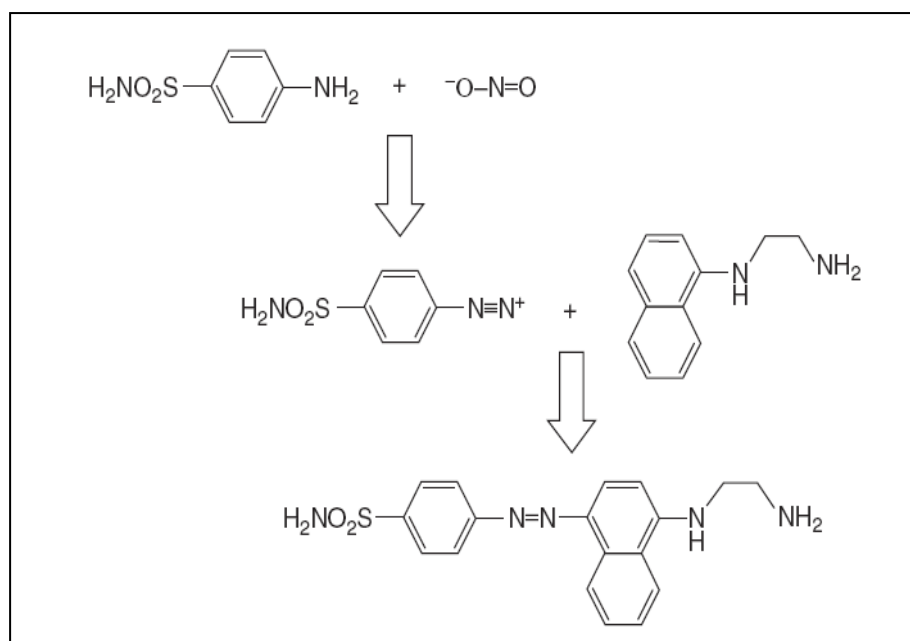


Figura-M&M7: Esquema de la reacción de Griess

III.5.- Determinación de los niveles de TBARS

Los niveles de las sustancias ácido tiobarbitúrico reactivas (TBARS) se han determinado mediante el método espectrofotométrico de Esterbauer y Cheeseman a 532 nm (**Esterbauer and Cheeseman, 1990**). La concentración de TBARS se ha determinado por extrapolación a partir de una curva patrón trazada con 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Los resultados se han expresado como equivalentes de malondialdehído (nmol/mg de proteína).

III.6.- Determinación de los niveles de MDA

El malondialdehído (MDA) es un producto característico de la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poli-insaturados. Los niveles de MDA se han determinado de acuerdo con el método de Wong *et al.* (**Wong *et al.*, 1987**) modificado por Sommerburg *et al.* (**Sommerburg *et al.*, 1993**). Brevemente: 50 μl de muestra (homogenado) se tratan con 0,25 M de ácido tiobarbitúrico y 0,0105 M de ácido fosfórico, se mezcla bien, y se incuba

durante 1 hora en baño de agua hirviendo. En estas condiciones el MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico formando un aducto fluorescente. La reacción se para por incubación en baño de hielo durante 15 min. Seguidamente se neutralizan las muestras por dilución 1:2 con NaOH 0,1 M en metanol. 50 µl de muestra neutralizada se inyectan en un *high-performance liquid chromatography* (HPLC, Waters) y se separan isocráticamente los componentes en una columna de fase reversa (C18) utilizando como fase móvil un tampón K-fosfato/Metanol (50 mM K₂HPO₄, pH 6,5/Methanol, 60:40) a un flujo de 1 ml/min. Como estándar se ha utilizado malondialdehído-bis-(dietilacetato) (0 - 100 µM). La cuantificación se ha llevado a cabo fluorimétricamente utilizando una $\lambda_{exc} = 525$ nm y una $\lambda_{em} = 550$ nm.

III.7.- Determinación de los niveles de HNE

Los niveles de 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) se han determinado de acuerdo con un método estándar de inmunodetección (**Kurisaki and Hiraiwa, 2009**). Brevemente, las muestras de cerebro (corteza y cerebelo) preparadas en tampón de homogenizado (50mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA, 1/500 cóctel de inhibidores de proteasas) con un contenido en proteínas de 75-100 µg se separaron en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) (T = 12%, C = 3%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa o *polivinilidene fluoride* (PVDF). Tras bloquear la membrana con proteínas de leche al 5% en tampón TBS (1mM Tris, 10mM NaCl and 0.5% Tween 20) durante una hora a temperatura ambiente, se incubó durante una hora con el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal anti-HNE) diluido 1:1000 en tampón TBS-T. Seguidamente la membrana se lavó tres veces, 5 min cada vez, con tampón TBS-T, a temperatura ambiente; y se incubó con el segundo anticuerpo (anti-conejo marcado con peroxidada) diluido 1:10.000 en tampón TBS-T. Seguidamente la membrana se lavó tres veces, 5 min cada vez, con tampón TBS-T. Detectándose la inmunoreactividad por quimioluminiscencia (GE Healthcare), recogiendo la señal sobre una película de rayos-X. Como se ha utilizado un anticuerpo monoclonal anti-actina diluido 1:200.000.

III.8.- Determinación de grupos carbonilo.

- **Método espectrofotométrico**

El contenido en grupos carbonilo en las muestras de cerebro control (*sham*) y de ratas con derivación porto-cava (*dpc*), se ha determinado mediante el método de Levine *et al.* (Levine *et al.*, 1994; 1990) con algunas modificaciones. Brevemente: 100 μ l de homogenado (~500 μ g proteína) se incuban con 20 μ l de sulfato de estreptomicina (10% w/v) durante 3 horas en baño de hielo y se centrifuga la mezcla a 3.000 x g. El sobrenadante se divide en dos partes iguales y las proteínas se precipitan añadiendo un volumen igual de tricloroacético al 20 %, se incuban en hielo durante 1 hora y se vuelven a centrifugar a 3.000 x g, y se decanta el sobrenadante. Seguidamente se añade a un tubo (problema) 0.5 ml de DNPH (10 mM) en clorhídrico 2 M y 0.5 ml de clorhídrico 2 M al otro tubo (blanco). Ambos tubos se agitan en el *vórtex* y se mantienen con agitación durante 5 min. A cada tubo se le añade 1.5 ml de tricloroacético al 20 %, se mantiene 30 min a temperatura ambiente, y se centrifugan a 5.000 x g. Se recoge el precipitado y se lava 3 veces con una mezcla de etilacetato:etanol (1:1) para eliminar el exceso de DNPH. El *pellet* final se disuelve en 1.3 ml de clorhidrato de guanidina 6 M y la absorbancia de la muestra problema (DNP-proteína) se lee frente al blanco (ácido clorhídrico, HCl) a 366 nm en un espectrofotómetro-UV.

Los resultados se expresan como nmoles de grupos carbonilos/mg de proteínas utilizando un coeficiente de extinción de 22.0 mM⁻¹cm⁻¹ para las hidrazonas alifáticas.

- **Método inmunológico**

La cuantificación de grupos carbonilos se ha llevado a cabo utilizando una curva patrón de 0 a 100 nm de proteína (albúmina) mediante la técnica del Dot-Blot de acuerdo con el procedimiento establecido en nuestro laboratorio (Bautista *et al.*, 2000). Brevemente, una vez fijadas las muestras (patrones y muestras de ratas-*dpc* y rats-*sham*), se tratan con un anticuerpo primario de conejo (anti-DNP) y un segundo anticuerpo anti-conejo y revelado por quimioluminiscencia, como más abajo se describe con detalle.

IV. Técnicas analíticas.

IV.1.- PAGE-SDS.

El método seguido ha sido, básicamente, el método de Laemmli (Laemmli, 1970), adaptado por Blackshear (Blackshear, 1984). Los geles de poliacrilamida se realizaron en condiciones desnaturalizantes para analizar las cadenas de proteínas por separado. Las cantidades que se utilizaron se detallan en la **Tabla-M&M3**.

Tabla-M&M3: Composición de los geles discontinuos de poliacrilamida. *Running buffer 4X (1,5 M Tris-HCl pH 8.8, 0,4% sodium dodecil sulfato, SDS).*

12% Running		5% Stacking	
Agua	1,88 ml	Agua	0,83 ml
Acrilamida 30%	4ml	Solución A	1 ml
Bis-acrilamida 1%	1,58 ml	(acrilam/bis-acrilam)	
Running buffer 4X	2,54 ml	Solución C (stacking	3,17 ml
TEMED	20 µl	buffer 4X)	
(APS) Persulfato	20 µl	TEMED	15 µl
de amonio 50%		(APS) Persulfato de	30 µl
(p/v) en agua		amonio 50% (p/v)	
		en agua	
Volumen final	10 ml	Volumen final	5 ml

Solución A (solución stock de acrilamida T= 30%, C= 2,7%). Solución C (0,5 M Tris-HCl pH 6.8, 0,4% SDS). El APS, preparado antes de su uso, y el TEMED se añaden en último lugar.

Una vez cargado el *running-gel*, se añade una fina capa de agua para evitar el intercambio de oxígeno con el medio y formar una superficie completamente lisa y rectilínea. Una vez polimerizado, se retiró la capa de agua, se carga el *stacking-gel* y se coloca el peine. La polimerización se lleva a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente, u “*overnight*”; a 4°C. Al día siguiente, se retira el peine, y se lavan los pocillos con tampón de electroforesis 1X (25 mM Tris-HCl pH 8.4, 190 mM glicina, 0,1 % SDS).

Para la segunda dimensión, en los geles 2D, sólo se realiza el *running gel*.

Las muestras, antes de ser cargadas, se resuspenden en tampón de muestra 4X (*mixer*: 0,02 M Tris-HCl pH 6,8, 20 % β -mercaptoetanol, 4,6 % SDS, 0,01% azul de Bromofenol), se sumergen en un baño de agua a 95°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y facilitar la acción reductora del β -mercaptoetanol sobre los puentes di-sulfuro. Para facilitar su recogida y carga en el gel, las muestras se centrifugaron en una microcentrífuga a máxima revolución (12.000 x g) (Spectrofuge 16M, National Labnet) unos 5 minutos. La electroforesis (Novex Mini-Cell, X-Cell sure Lock, Invitrogen) se desarrolla a una intensidad constante de 25 mA/gel, (EPS 1001, GE Healthcare), hasta que el colorante azul de Bromofenol, que indica el frente, alcanza el extremo inferior del gel.

El peso molecular de cada banda se ha estimado a partir de la movilidad electroforética por comparación con proteínas patrones (Sigma), utilizando un patrón de amplio rango 120 a 14 kDa (Bio-Rad): miosina 199,356 Da, β -galactosidasa 116,275 Da, seroalbúmina bovina 79,551 Da, ovoalbúmina 52,908 Da, anhidrasa carbónica 37,350 Da, inhibidor de la tripsina de soja 29,223 Da, lisozima 19,834 Da, aprotinina 6,873 Da.

IV.2.- Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.

Los geles se han teñido de distintas maneras: con azul de Coomassie, con plata o con Sypro-Ruby. Se realizó una u otra tinción en función de la necesidad de ver bandas con una menor o mayor sensibilidad:

- *Tinción con Coomassie (R-250).*

El protocolo seguido ha sido el estándar. Brevemente: **1)** añadir unos 100 ml de solución Coomassie, de forma que quede cubierto el gel; **2)** mantener en agitación “overnight”; **3)** eliminar la solución y añadir ácido acético 20%:metanol 70% en proporción 1:1, en agitación hasta que el gel se destiña apareciendo las bandas coloreadas.

- **Tinción con Plata** (Plus One™ Silver Staining Kit, GE Healthcare).

Es una tinción más sensible, su rango de detección de proteínas es de 1-10 ng, gracias a la elevada capacidad reductora del ión plata (Ag^+). Este es capaz de formar complejos con las proteínas con mayor afinidad que con la poliacrilamida, siendo estos complejos reducidos mucho más rápido que cuando el ión Ag^+ está libre. El protocolo seguido ha sido el descrito por Heukeshoven and Dernick, (**Heukeshoven and Dernick, 1985**). El gel se tiñe, bien tras desteñirlo del Coomassie o bien tras terminar la electroforesis. Todo el proceso ocurre en constante agitación. Brevemente: el primer paso es la fijación de las proteínas al gel (etanol 100 ml, ácido acético glacial 25 ml en un volumen de 250 ml) durante 30 minutos. Luego se añade la solución de sensibilización (etanol 75 ml, glutaraldehído 25% w/v, *sodium* tiosulfato 5% w/v, *sodium* acetato 17 g en un volumen de 250 ml) durante otros 30 minutos (el glutaraldehído y el *sodium* tiosulfato actúan como agentes complejantes uniéndose a las proteínas), lavamos con agua destilada y durante 20 minutos se desarrolla la reacción con plata (solución de nitrato de plata 2,5% w/v, formaldehído 37% w/v en un volumen de 250 ml) donde el formaldehído se usa como agente reductor. Tras eliminar la plata con lavados, se pasa al revelado (carbonato de sodio 6,25 g, formaldehído 37% w/v en un volumen de 250 ml) en unos 2-5 minutos y cuando las bandas que se deseen teñir se vean con claridad, se para el revelado con la solución de parada (EDTA- Na_2 2- H_2O 3,65 g en un volumen de 250 ml). El gel se deja en agua destilada.

- **Tinción con Sypro-Ruby** (Bio-Rad) (compatible con MS).

El protocolo seguido ha sido el recomendado por la casa comercial. Usar siempre contenedor de plástico. Brevemente: **1**) fijar las proteínas durante 30 min en agitación en solución a (40% (v/v) etanol, 10% ácido acético); **2**) eliminar la solución; **3**) añadir un volumen de Sypro-Ruby suficiente para cubrir el gel, dejarlo toda la noche a temperatura ambiente y en agitación; **4**) enjuagar con agua; **5**) visualizar las proteínas (*spots*) con láser de longitud de onda 450, 473, 488 ó 532 nm.

Una vez desteñido el gel es necesario guardar los resultados. Con el gel aun húmedo, se escanea en un escáner equipado con un transiluminador

(FUJIFILM FLA5100) y las imágenes se guardan en formato TIFF con una resolución de 150-300 dpi.

Las imágenes escaneadas de los geles se cuantificaron mediante el programa PDQuest de BioRad (versión 7.3)/ Multi-Gauge (versión 3.0).

IV.3.- Inmunoprecipitación de proteínas carboniladas con *Dynabeads*.

Para enriquecer las muestras en proteínas carboniladas, se utilizaron bolitas magnéticas unidas a Proteína A o G, *Dynabeads* (Invitrogen). La proteína G es un componente de la pared celular de *Streptococcus sp*, que se une al dominio Fc de un amplio rango de inmunoglobulinas. La proteína G está unida a una bolita paramagnética, *Dynabeads*, que es capaz de una manera eficiente y rápida de capturar un amplio rango de inmunoglobulinas. En nuestro caso se utilizará el anticuerpo primario que nosotros queramos, anti-DNP, el cual reconocerá unas proteínas determinadas, proteínas carboniladas (**Figura-M&M8**). Brevemente:

(a) Previa resuspensión de las bolitas unidas a proteína G, transferimos a un vial un volumen de *Dynabeads* suficiente para aislar unos 100 μ l de anticuerpos;

(b) mantenemos la suspensión en un imán durante 1 min, se elimina el sobrenadante sin quitar el vial del imán

(c) se añaden 0,5 ml de tampón de lavado (0,024 M ácido cítrico, 0,05 M Na_2HPO_4), para resuspender las bolitas;

(d) repetir los dos últimos pasos para lavarlas;

(e) añadir 50 μ l de anticuerpo a las *Dynabeads* lavadas y dejarlas en agitación suave a temperatura ambiente 40 min;

(f) colocando el vial 2 min en el imán, se elimina el sobrenadante y se lava con 0,5 ml de tampón de lavado;

(g) este paso se repite dos veces más;

(h) lavar el complejo anticuerpo-*Dynabeads* dos veces con tampón (0,2 M Trietanolamina pH8,2);

(i) resuspenderlo en 1 ml de tampón B (20 mM Dimetil-pimelimidato en 2N HCl) y mantenerlo en agitación suave durante 30 min a 20°C;

(j) colocar el vial 1 min en el imán, eliminar el sobrenadante y resuspender los complejos en 1 ml de tampón C (50 mM Tris pH 7,5), manteniéndolos en agitación suave 15 min;

(k) colocar en el imán, eliminar el sobrenadante;

(l) quitando el vial del imán, resuspenderlo en 1 ml de TPBS 1X (NaCl 1,4 M, PO₄Na₂ 0.1 M, 0,1% Tween-20);

(m) repetir este paso 1 vez;

(n) resuspender las *beads* en 100 µl de TPBS 1X y luego añadir la muestra que contiene las proteínas diana, dejarlo 10 min en agitación suave para que se una el anticuerpo a la proteína;

(ñ) colocar el vial en el imán y eliminar el sobrenadante;

(o) quitamos el vial del imán y resuspendemos el complejo *Dynabeads*-anticuerpo-proteína en 20 µl de 1X NuPAGE (Bis-Tris 1 M pH 6,8); calentar a 70°C, 10 min, disociándose el complejo al calentarse; (o) colocar el vial en el imán antes de utilizar la muestra, para que se separe la muestra concentrada en proteínas carboniladas, en este caso, del resto del complejo *Dynabeads*-anticuerpo.

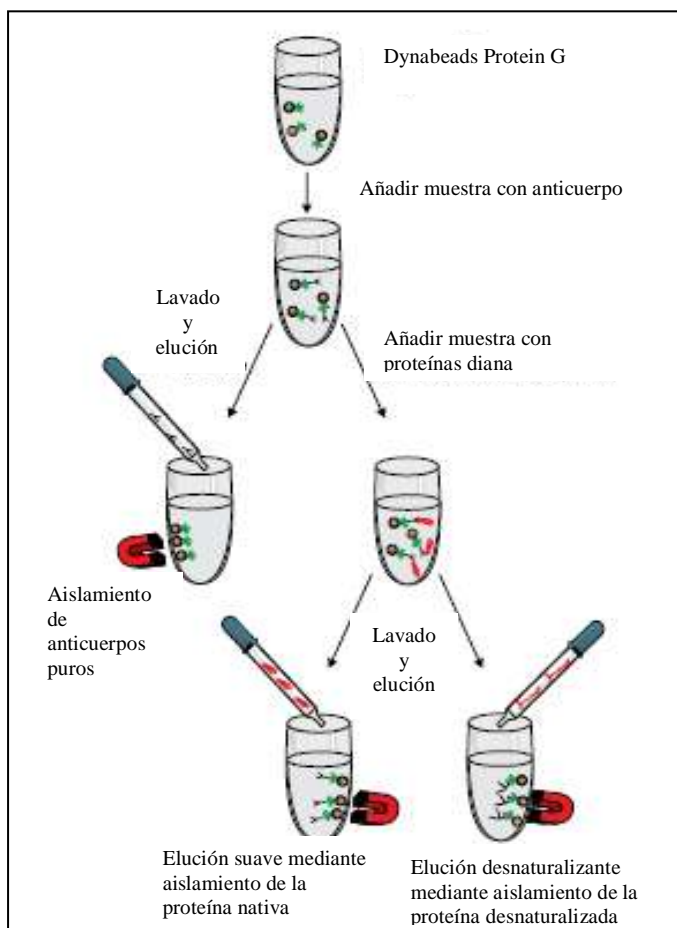


Figura-M&M8.-
Esquema de la inmunoprecipitación usando Dynabeads

IV.4- Establecimiento de la cinética de marcaje con DNPH: *Dot-Blot*.

Establecer el tiempo más adecuado de incubación y/o marcaje de los grupos carbonilo con la DNPH, es muy importante, ya que si nos excedemos, se podrían marcar todos los grupos carbonilos, ya sean procedentes de la oxidación proteica, propios de las estructuras de las proteínas, como procedentes de otras moléculas celulares (ácidos nucleicos), dándonos una señal intensa y saturada. Por ello se realizó un estudio cinético, en el cual se marca la muestra con DNPH, se inmoviliza la muestra en una membrana de nitrocelulosa (*Dot-Blot*), se incuba la membrana con anticuerpos anti-dinitrofenil (DNP) y se revela la membrana con diaminobencidina (DAB) para estudiar las bandas visibles.

Para facilitar e inmunoprecipitar las muestras, concentrándolas en grupos carbonilos, para una posterior facilitación del proceso, se utilizaron *Dynabeads* (ver apartado anterior).

Preparación de la muestra:

Unos 3 µg de proteína de la muestra se disolvieron con 6% SDS y se mezclaron con solución DNPH (DNPH 10 mM en 10% de ácido trifluoroacético) en una relación 1,5 µg DNPH/µg proteína, durante distintos tiempos de marcaje (0-30 min, recogidos en intervalos de 5 min). Para neutralizar la reacción se le añadió 2M Tris-HCl de manera que la concentración final sea 0,52 M.

Inmovilización de la muestra a la nitrocelulosa:

En una membrana de nitrocelulosa (BioRad, poro 0,45µm) se depositó la muestra tratada dejándose fijar hasta sequedad (*Minifold I Spot, Favorgen Biotech Corp*). La fijación se comprobó con rojo Ponceau S (0,1 % en ácido acético al 5 %) (Sigma) ya que esta solución nos permite teñir temporalmente las proteínas trasferidas y luego se elimina fácilmente con 3 lavados en TPBS (NaCl 140 mM, HPO₄Na₂ 10 mM y Tween 0.1% (p/v), pH 7,4)

Incubación con los anticuerpos y lavados:

Tras lavar la membrana con TPBS 1X (tampón fosfato salino a pH 7,4 + 0,1% Tween 20), se bloqueó con leche descremada (5 % en TPBS 1X) durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación con el objetivo de bloquear los posibles sitios no específicos de la membrana de nitrocelulosa. Una vez lavada la membrana con TPBS 1X, se incubó con el anticuerpo primario (de conejo anti-dinitrofenil (DNP) Sigma; 1:1000 en TPBS 1X), *overnight*, en agitación y a 4°C. Eliminado el primario con sucesivos lavados, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (anti-inmunoglobulina de conejo con peroxidasa conjugada, Dako; 1:3000 en TPBS 1X) durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Antes de pasar al revelado de la membrana, se eliminaron los restos de secundario mediante varios lavados.

Revelado:

Los anticuerpos secundarios están marcados con la enzima peroxidasa. Para detectar su actividad se utilizan dos métodos:

- a) **Método de revelado con DAB:** la peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cataliza la polimerización oxidativa de la DAB, generándose un precipitado marrón insoluble como producto final. La reacción puede intensificarse añadiendo iones de Cobalto o de Níquel, que provocan un cambio de color del precipitado de marrón a gris-negro. El proceso de revelado se mantuvo protegido de la luz, a temperatura ambiente y en campana de flujo laminar (Sistema electrónico Flowtronic, Romero), evitando aspirar la DAB (cancerígena). Para ello se preincubó la membrana, unos 15 min con tampón de preincubación (DAB en tampón fosfato 50 mM, solución 1 % de cloruro de cobalto y 1 % de sulfato de níquel-amonio). A continuación, se incubó con tampón de incubación (DAB en tampón fosfato 50mM, solución 1 % de cloruro de cobalto y 1 % de sulfato de níquel-amonio, solución H_2O_2 al 1 %) hasta que la reacción se desarrolló y aparecieron las bandas de DNP por precipitación del polímero DAB oxidado. Para minimizar el *background* se lavó la membrana varias veces, primero con tampón fosfato 50 mM y

por último con agua destilada. Para fijar el revelado de la membrana durante un largo tiempo se hizo con tetraóxido de Osmio (0,1% OsO₄ en H₂O).

- b) **Método de quimioluminiscencia:** es un método de mayor sensibilidad y toxicidad menor. Para ello se usó el reactivo SuperSignal ECL Plus (Thermo Scientific Inc.) y la luminiscencia se detecta en una cámara fotográfica para quimioluminiscencia (FUJIFILM LAS 3000 mini).

Las imágenes escaneadas de las membranas se cuantificaron mediante el programa Quantity One (BIORAD) y PDQuest de BioRad (versión 7.3)/Multi-Gauge (versión 3.0).

IV.5.- Derivatización de las proteínas oxidadas.

Para detectar los grupos carbonilo en las proteínas oxidadas se han usado dos métodos:

a) **Marcaje pre-electroforesis (Oxy Blot™)**

Este procedimiento se ha llevado a cabo de acuerdo con las normas proporcionadas por el Kit comercial (Oxy Blot™ Protein Oxidation Detection Kit) y ligeramente modificado en nuestro laboratorio (**Jover, 2006**). Brevemente, 100 µg de proteína de la muestra se disolvieron con 6% SDS y se mezclaron con una solución de DNPH (DNPH 10 mM en 10% de ácido trifluoroacético) en una relación 1,5 µg DNPH/µg proteína, durante 5 minutos. Para parar la reacción se añadió Tris-HCl 2 M, de manera que la concentración final sea 0,52 M. A continuación, las muestras se cargaron en un gel SDS-PAGE al 12%, seguidamente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (*immunoblotting*) y las proteínas oxidadas se detectaron usando un anticuerpo primario anti-DNP (diluído 1:150) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (diluído 1:300) durante 1 hora, a temperatura ambiente y en agitación.

b) Marcaje post-electroforesis

Este procedimiento se ha llevado a cabo de acuerdo con el método descrito en la referencia (**Conrad et al. 2002**). Brevemente: Una vez separadas las proteínas por electroforesis PAGE-SDS, y transferidas a una membrana de PVDF, incubamos la membrana durante 5 min en la solución A (20 % metanol: 80 % TPBS: 1,4 M NaCl, 0,1 M $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ pH7,4, 0,1% Tween-20); seguidamente se incubó en HCl 2 M durante 5 min, y se derivatizó durante 5 min exactos en la solución B (0,5 mM DNPH en 2 N HCl); se lavó tres veces, 5 min cada una, en HCl 2 M; y 5 veces en metanol puro; por último se hicieron 2 lavados en TPBS. Todos los pasos se hicieron con agitación. Para derivatizar la muestra, tras la transferencia, se utiliza membrana de PVDF, para minimizar el *background* de la membrana. Éste método presenta, además la ventaja de que durante el marcaje no se modifica ni el peso molecular ni el punto isoeléctrico de las proteínas.

IV.6.-Inmunoblotting.

En la **Figura-M&M9** se muestran esquemáticamente los pasos de esta técnica. Brevemente:

a) Preparación de la muestra:

100 μg de proteína de la muestra bien se mezcla con *mixer* y se carga por pocillo o bien se derivatiza y se carga, como anteriormente se han descrito ambos casos.

b) Desarrollo geles PAGE-SDS:

Estas muestras se cargaron en geles de SDS-PAGE (*stacking* 5% y *running* 12%) (25 mA/gel).

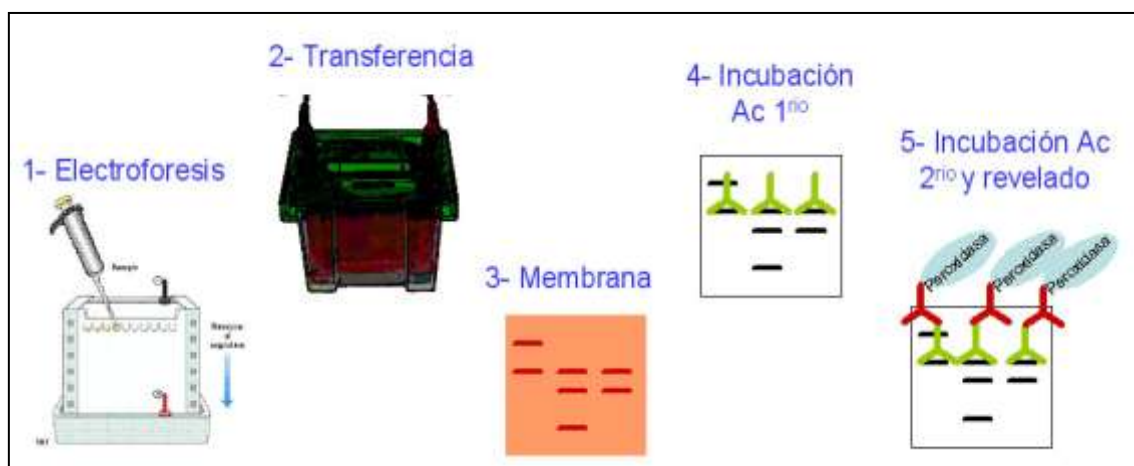


Figura-M&M9. Representación esquemática de la técnica de *Inmunoblotting*.

c) Transferencia:

Inmediatamente tras realizar la electroforesis, se cortó la parte del gel que interesaba transferir, un trozo un poco mayor de membrana de nitrocelulosa (marcada para conocer posteriormente la orientación de las proteínas respecto del gel) y dos trozos de papel de filtro grueso de la misma dimensión que la membrana. Tanto la membrana como los papeles de filtro se empaparon completamente en el tampón de transferencia (Tris- HCl 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,005%, metanol 20%, pH 8,4). Seguidamente se montó el sistema de transferencia a modo de *sandwich* (los papeles de filtro a los lados y la membrana y el trozo de gel en la orientación adecuada) (X-Cell II Blot Module, Invitrogen) (**Figura-M&M10**)

Las posibles burbujas que pueden formarse al colocar las distintas capas del *sandwich* se eliminaron con una varilla de vidrio (ya que impiden la transferencia en esa zona). Cerrado el *transfer* con el *sandwich* en su interior, se colocó en la cubeta de transferencia que fue llenada hasta el borde con tampón de transferencia. El proceso se realizó a 300 mA, a 4°C durante 2,5 horas (Power Pac 300, Bio-Rad). Una vez terminado el proceso se comprobó la transferencia tiñendo la membrana con rojo Ponceau (0,1% en ácido acético al

5%). El resto del proceso hasta concluir con el revelado de las bandas de DNP se realizó como se ha indicado anteriormente en el *Dot-Blot*.

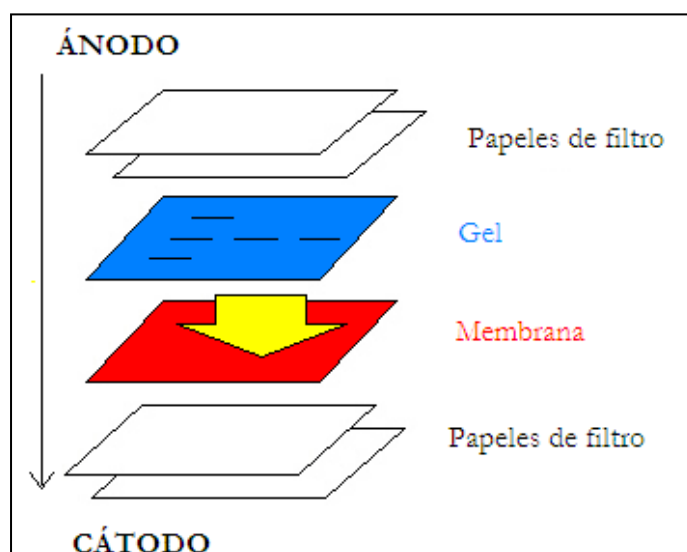


Figura-M&M10. Esquema del sistema de transferencia o *sandwich*. La direccionalidad de la transferencia se indica con la flecha negra (las proteínas con carga negativa gracias al SDS, tienden a migrar hacia el polo positivo ó cátodo). La flecha amarilla indica la transferencia de las proteínas del gel a la membrana.

d) Análisis imágenes:

Las imágenes escaneadas de los *immunoblots* se han utilizado para cuantificar las bandas y comparar el contenido en grupos carbonilos entre las muestras de ratas-*dpc* y ratas-*sham*, mediante el program PDQuest de BioRad (versión 7.3).

IV.7.- Electroforesis bi-dimensional convencional y *Oxi-blot*.

Esta técnica es capaz de separar una mezcla compleja de proteínas utilizando dos tipos de electroforesis sucesivas sobre la misma muestra (**Görg et al., 2004; Gygi et al., 2000**). Para esto, en primer lugar se realiza una primera dimensión o Isoelectroenfoco (IEF) que consiste en la separación de

las proteínas en función de su punto isoeléctrico (pI) en un gradiente de pH inmovilizado (IPG). Posteriormente se realiza una segunda dimensión que consiste en la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) atendiendo a su masa molecular. De esta forma se obtiene al final un mapa de señales (*spots*) que representan las proteínas distribuidas en dos dimensiones.

En este apartado hay que aclarar que se han enfocado dos tiras iguales por muestra (por ejemplo, 2 tiras de corteza cerebral, Cx, de ratas-*dpc*, 2 tiras de Cx ratas-*sham*, etc) para poder transferir una y derivatizarla, identificándose las proteínas oxidadas y otra se ha usado para, tras correr el gel, teñirlo con Sypro, recortar e identificar las proteínas de interés.

a) Primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF).

Las tiras de 13 cm, pH 4-7 se rehidrataron con 250 μ l de tampón de rehidratación (2 M Thiourea, 7 M Urea, 4% (w/v) Chap, 0,2% IPG Buffer pH 3-10, 0,2% (w/v) DL-Dithiothreitol, DTT, 0.0002% azul de Bromophenol) toda la noche cubiertas de aceite mineral (Ettan IPGphor ceramic strip holders, GE Healthcare). Se mezclaron 150 μ g de proteínas con tampón de muestra (2 M Thiourea, 7 M Urea, 4% (w/v) Chap, 0,2% IPG Buffer pH 3-10, 2% (w/v) DTT, 0,002% azul de Bromophenol), en igual proporción de volumen, para cargarse mediante *cup-loading* completándose el volumen con tampón de lisis hasta un volumen máximo de 100 μ l: el exceso de aceite de las tiras se eliminó, tras la re-hidratación de las mismas. La primera dimensión se desarrolló usando el sistema IPGphorTM 3 (GE Healthcare) a 20°C 300 V durante 3 horas, se fue incrementando hasta 1000 V en 3 horas, se aumentó hasta 8000 V durante 6 horas y se mantuvo 6 horas a 800V. Antes de ser cargadas las tiras en el gel, se equilibraron durante 15 min en buffer de equilibrado (50 mM Tris-Cl, 6 M Urea, 30% (v/v) glicerol, 2% (w/v) SDS con 1% (w/v) ditiotretitol (DTT) y se cambió a 2.5% (w/v) Iodoacetamida durante 15 min en agitación.

b) Segunda dimensión (2D).

Las tiras fueron colocadas, escurriendo el exceso de aceite, en la parte superior de los geles y selladas con 0,5% agarosa de bajo punto de *melting*,

evitando en todo momento la formación de burbujas que alterarían el paso de la corriente a través del gel y en consecuencia se alteraría la separación de la muestra. Las tiras se corrieron en un gel SDS-PAGE al 12% T y 2,7% C, a 20°C, 450 V, 10 W, 15 mA/gel durante 10 min y a 25 mA/gel durante 2 horas en la unidad Criterion Cell (Bio-Rad). Para la parte del gel donde se sitúa el cátodo, se utilizó tampón de electroforesis al 2X y para la parte del gel donde se sitúa el ánodo, al 1X.

c) Tinción de los geles.

Usando Sypro-Ruby para visualizar las proteínas totales y, posteriormente, poder cortarse e identificarse.

d) Inmunoblotting y post-derivatización.

Una tira con la misma muestra que la usada para teñir el gel con Sypro, se ha transferido a membrana de PVDF a 310 mA durante 2 horas en una unidad de transferencia semi-seca (Gealthcare). Para ello se ha usado el mismo esquema de *sandwich* explicado con anterioridad, sólo que el porcentaje del SDS en el tampón de transferencia se aumenta hasta un 10%. Tras ello, se derivatiza la membrana como se desarrolló en el apartado IV.5.-b.

e) Revelado.

Se realizó al igual que los pasos descritos en la técnica del *Dot-Blot* (bloqueo, incubación con anticuerpos, revelado de la señal por quimioluminiscencia).

IV.8.- Differential In Gel Electrophoresis (DIGE).

Esta técnica nos permite comparar de forma reproducible el nivel de expresión de dos muestras de proteínas en un mismo gel 2D. Consiste en una electroforesis bidimensional donde se utiliza un sistema de fluoróforos (Cy2, Cy3, Cy5) y un software (DeCyder software) que nos facilita el macheo de los *spot* (manchas correspondientes a las proteínas), y su estudio estadístico. La posibilidad de utilizar un estándar interno para normalizar la abundancia relativa

entre muestras es lo que permite que la comparación tenga un grado de fiabilidad alto. Posee un rango lineal de detección de 0.125 ng a 10 µg, rangos inferiores a los detectados por espectrometría de masas. Además este método es compatible con la identificación de las proteínas por espectrometría de masas. Con, lo cual, una vez identificados los *spots* de interés, éstos pueden analizarse e identificarse por espectrometría de masas.

a) Preparación de la muestra y marcaje de las proteínas con Cy-Dye.

50 µg de proteína (homogenado de corteza cerebral o de cerebelo) de la muestra control (ratas-*sham*) y de la muestra de ratas-*dpc* es marcada con los fluoróforo Cy3 y Cy5 (GE Healthcare), respectivamente, siguiendo el protocolo del marcaje mínimo (*minimal labelling*): 400 pmol de fluoróforo (Dye) por cada 50 µg de proteína. Para generar el estándar interno se crea una mezcla o *pool* de todas las muestras que se deseen comparar en un mismo estudio y se marcan con el fluoróforo Cy2. Este procedimiento se usa para reducir la variabilidad asociada al comparar múltiples muestras (**Alban et al., 2003; Karp and Lilley, 2005**). Brevemente (para Kit de 5nmol/Dye):

(i) *Preparar la solución stock*: Tomar una pequeña alícuota de Dimetilformamida (DMF) en un tubo eppendorf; Dejar a temperatura ambiente, 5 min, los fluoróforos; Añadir 5 µl DMF en cada vial de Dye, para tener 1 mM de concentración final; Agitar 30 s y dar un *spin*. Este *stock* puede almacenarse hasta 2 meses a -80°C.

(ii) *Preparar la solución de trabajo*: Dejar 5 min a temperatura ambiente cada solución *stock*; el fabricante recomienda 400 pmol de Dye por cada 50 µg de proteína, para ello añadir un volumen de solución *stock* a 1,5 volúmenes de DMF para tener los 400 µM solución de trabajo. Por ejemplo, a 2 µl de solución *stock* se le añaden 3 µl de DMF para tener 400 pmol de Dye en 1 µl de solución de trabajo; Agitar 30 s y dar un *spin*. Esta solución es estable hasta 1 semana entre -15° y - 30°C.

(iii) *Marcaje de las muestras*: Añadir el volumen de proteína correspondiente a 50 µg en un eppendorf; añadir 1 µl de solución de trabajo

según el diseño experimental (**Tabla-M&M4**); mezclar con la pipeta y dar un *spin*; Dejarlo incubando durante 30 min en hielo y en oscuridad; Añadir 1 µl de 10 mM L-Lisina a cada eppendorf para parar la reacción; mezclar con la pipeta, dar un *spin* y dejar 10 min en hielo y en oscuridad. Las muestras marcadas pueden almacenarse hasta 3 meses a -70°C o bien pueden ser usadas en el IEF.

Tabla-M&M4. Diseño experimental de las muestras de corteza o de cerebelo de ratas-*dpc* y de ratas-*sham*.

Gel	Cy2	Cy3	Cy5
1	Estándar interno (<i>pool</i>)	<i>dpc-7</i>	<i>sham-4</i>
2	Estándar interno (<i>pool</i>)	<i>dpc-7</i>	<i>sham-4</i>
3	Estándar interno (<i>pool</i>)	<i>sham-9</i>	<i>dpc-8</i>
4	Estándar interno (<i>pool</i>)	<i>sham-9</i>	<i>dpc-8</i>
5	Estándar interno (<i>pool</i>)	<i>sham-10</i>	<i>dpc-9</i>
6	Estándar interno (<i>pool</i>)	<i>sham-10</i>	<i>dpc-9</i>

dpc: ratas con derivación porto-cava; *sham*: ratas control. Cada gel contiene 50 µg de proteína en cada fluoróforo. El estándar interno (*pool*) está formado por la mezcla de todas las muestras que van a estudiarse. Las seis muestras se analizaron por duplicado para correr 6 geles.

b) Primera dimensión: isoelectroenfoque (IEF).

Tiras de 24 cm, pH 4-7 (GE Healthcare) se rehidrataron con 450 µl de tampón de rehidratación (7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS, 1% IPG Buffer, 0,2% w/v DTT, 0,0002% azul de Bromophenol), dejándose toda la noche, de la misma manera descrita en el apartado anterior. Las muestras marcadas (150µg de proteína) con los fluoróforos se mezclaron (según el diseño experimental, **Tabla-M&M4**) con tampón de muestra (2 M Thiourea, 7 M Urea, 4% (w/v) Chap, 2% IPG Buffer pH 3-10, 2% (w/v) DTT, 0,002% azul de Bromophenol), en igual proporción de volumen, para cargarse mediante *cup-loading*,

completándose el volumen con tampón de lisis hasta un volumen máximo de 100 µl. La primera dimensión se desarrolló usando el sistema IPGphor™ 3 (GE Healthcare) a 20°C 300 V durante 4 horas, se fue incrementando hasta 600 V en 4 horas, se aumentó hasta 1000 V durante 4 horas, hasta 8000 V durante 4 h y se mantuvo 4 horas a 8000V.

c) Segunda dimensión (2D): electroforesis.

Antes de ser cargadas las tiras en el gel del 12% SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), se equilibraron durante 15 min en buffer de equilibrado (50 mM Tris-Cl, 6 M Urea, 30% (v/v) glicerol, 2% (w/v) SDS con 1% (w/v) DTT y se cambió a 2.5% (w/v) Iodoacetamida durante 15 min en agitación. Las tiras fueron selladas en la parte superior de los geles con 0.5% agarosa de bajo punto de *melting*, evitando la formación de burbujas. Los geles corrieron en el sistema Ettan Dalt Six (GE Healthcare) a 10mA/gel durante 1 h y luego a 40mA/gel durante 6 horas.

c) Adquisición de imágenes y análisis de la variación biológica.

Los geles se escanearon en el analizador de imágenes Typhoon 9410 (GE Healthcare). Las longitudes de onda de excitación son 532 nm para Cy3, 633 nm para Cy5 y 488nm para Cy2; y las de emisión son 580 nm, 670 nm y 520nm respectivamente. Todos los geles se escanearon a una resolución de 100 µm. Las imágenes se analizaron mediante el programa DeCyder 2D V7.0 (GE Healthcare). En el módulo de DIA (*Differential In Gel analysis*) se estimaron unos 2500 *spots*. En este módulo se pueden analizar los geles individualmente, además de detectar los *spots* simultáneamente en varias imágenes, es lo que se denomina co-detección. Luego todos los *spots* co-detectados, corren en el *batch processor* donde se definen y administran de forma automatizada. A la hora de calcular los cocientes de la abundancia para cada par de *spots* co-detectados, es necesario normalizar esos valores (ya que pueden aparecer con diferente volumen por variaciones en la intensidad del láser, fluorescencia, filtros, diferente cantidad de muestra...). El proceso de normalización se basa en la asunción de que la mayoría de todos los *spots* en el experimento no tienen cambios de una imagen a la siguiente. Cuando esto es cierto, un

histograma de representación del log del cociente de volumen de todos los *spots* se parecería a una distribución normal. El pico principal del histograma lo adecúa a una distribución normal, luego identifica el cociente de volumen actual que será mapeado al cociente de volumen logarítmico como valor cero. Cuando calculando la distribución del modelo, los datos del histograma por debajo del 10% del área del pico principal se consideran datos atípicos y se quedan fuera del procedimiento de ajuste. Todos los cocientes de volumen individuales son mapeados usando el centro del modelo de distribución para alinear el histograma del cociente del volumen logarítmico a cero. En el módulo de *Biological Variation Analysis* (BVA) los *spots* normalizados son mapeados entre los distintos geles (se identifica que la posición de un *spot* en un gel es la misma en otro gel o el grado de variación o ausencia (**Figura-M&M11**) y se determina en el análisis estadístico que *spots* presentan diferencias significativas en la abundancia entre el control y las muestras (one-way ANOVA $p < 0,05$)

IV.9.- Análisis cuantitativo de las proteínas carboniladas.

La sensibilidad de oxidación de las diferentes proteínas (*spots*) se calculó mediante la estimación de la razón “señal de oxidación” determinada en la inmunodetección y la “señal de la cantidad de proteína” en los geles teñidos con Sypro-Ruby (C=O/P) usando el programa Multi-Gauge V3.0 (Fujifilm Corporation). Esta razón se conoce con el nombre de “Coeficiente o índice f_{ox} ” y es usado como indicador del daño causado por las ERO, ERN y radicales libres en las diferentes proteínas presentes en el homogenado de corteza cerebral y de cerebelo de ratas con encefalopatía hepática (ratas-*dpc*) comparadas con las ratas control (ratas-*sham*). Esta razón es índice específico de oxidación de cada proteína ya que nos proporciona una medida del daño oxidativo específico de cada proteína (banda o “spot”): μg grupos carbonilo/mg de proteína (**Butterfield and Sultana, 2011; Bautista et al., 2000**).

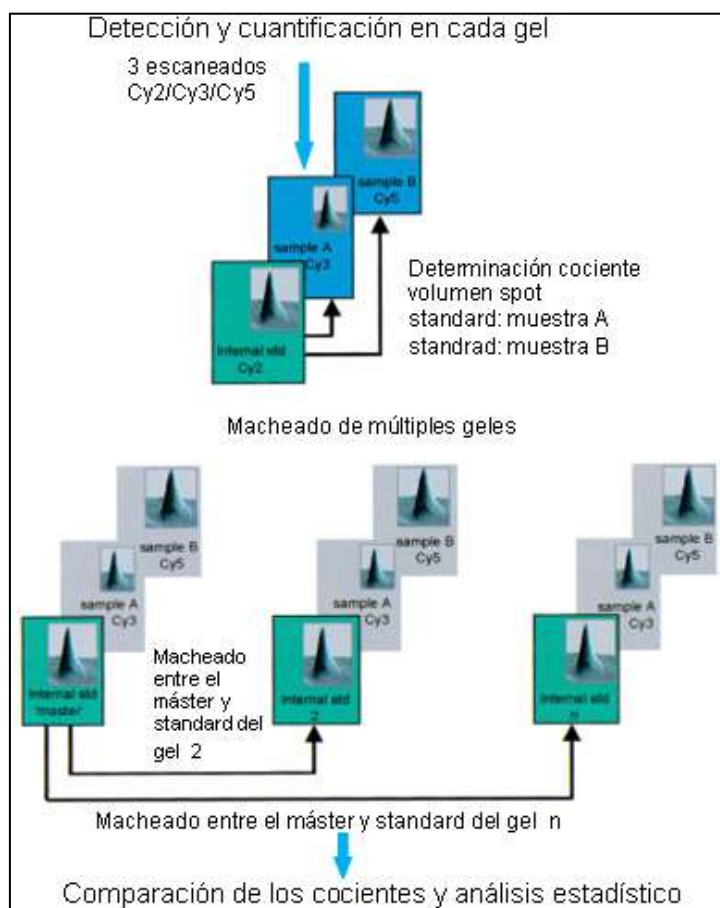


Figura-M&M11.: Esquema del análisis en DeCyder. Llamamos gel máster a aquella imagen del *standard* donde se detectan mayor nº de *spots* presentes en todas las muestras. La detección de los *spots* se lleva a cabo entre el *standard* y muestra del mismo gel. Las dos imágenes super-puestas perfectamente permiten medir directamente el cociente del volumen de los *spots* entre el *standard* y la muestra. El mapa de *spots* del *standard* es macheado junto con cociente del volumen *standard/muestra*, se comparan y se calcula la abundancia relativa del cociente entre las muestras de diferentes geles, seguido del análisis estadístico.

IV.10.- Identificación de *spots* de interés (oxidados) por espectrometría de masas.

En base a los datos del análisis del *immunoblot (oxi-blot)*, los *spots* que muestran diferencias estadísticamente significativas en el contenido en grupos carbonilos (índice f_{ox}) se han cortado manualmente con escalpelo, y seguidamente se ha procedido a su reducción, alquilación y digestión in-gel con

tripsina de acuerdo con el procedimiento descrito por Shevchenko *et al.* (Shevchenko *et al.*, 1996), para seguidamente proceder a su identificación por espectrometría de masas, tal como se muestra esquemáticamente en la **Figura-M&M12**.

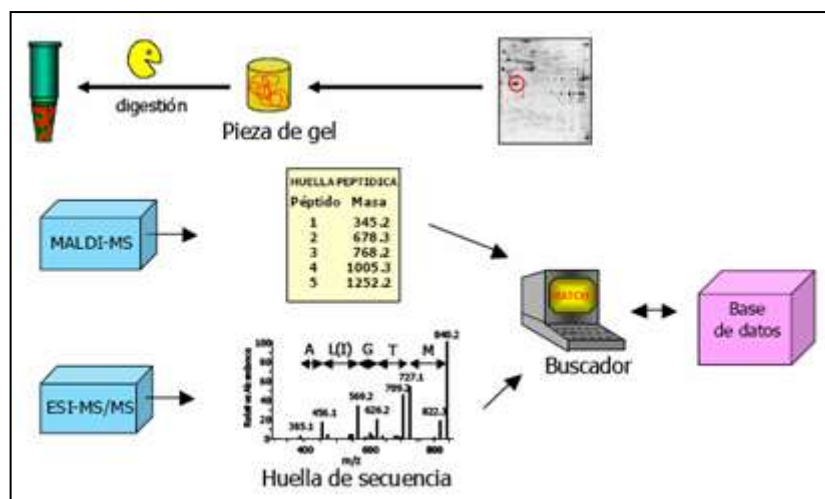


Figura-M&M12. Esquema general seguido para la identificación de las proteínas presentes en los *spots* de interés.

Las proteínas de los diferentes *spots* de interés se han identificado en la Unidad de Proteómica de la Universidad de Córdoba y en el laboratorio de Dr. Georg Arnold de *Gene Center –Proteomic Unit- de la Ludwig Maximilian Univärsitet München* (Alemania) mediante la técnica de ionización blanda: MALDI-TOF (Ionización Desorción asistida por Láser con una Matriz, Matriz-Assisted-Laser-Desorption-Ionization, y detectándose los iones en un detector de tiempo de vuelo, *Time-of-Flight*). Brevemente, los *spots* cortados se han lavado dos veces con agua bidestilada, se han sumergido en acetonitrilo al 100% durante 15 min a temperatura ambiente, y seguidamente se han secado en una Savant SpeedVac durante 30 min. Una vez secas, las muestras se han reducido con DTT 10 mM en bicarbonato amónico 25 mM, pH 8,5 durante 30 min a 56°C, y seguidamente se han alquilado con iodoacetamida 55 mM en bicarbonato amónico 25 mM, pH 8,5 durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, las muestras se han digerido con 12,5 ng/μl de tripsina de grado secuencia (Promega) en bicarbonato amónico 25 mM, pH 8,5

a 37°C, *overnight*. Los péptidos resultantes de la digestión trípica se desalan en ZipTipsC18 (Millipore) y se eluyen con una solución saturada de ácido ciano-4-hydroxycinámico (CHCA, Sigma) disuelto en 50% acetonitrilo y 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en una placa MALDI de 384 pocillos (**Figura-M&M13**).

Los análisis por MALDI-TOF MS se han realizando en un equipo 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF MS (Applied Biosystem) trabajando en el modo *reflectron*, utilizando 1000 disparos por espectro. Recolectándose los correspondientes espectros para huella peptídica (*peptide mass fingerprinting*, PMF).

Las calibraciones del instrumento se realizaron externamente usando una mezcla de calibración Pep4 (Laser Biolabs) e internamente con picos de la autólisis de tripsina (842 m/z, 1045 m/z y 2211 m/z). El rango de masas usado fue 800-3000 m/z. Data Explorer 4.4 (Applied Biosystem) se utilizó para la adquisición de datos y extracción de las masas monoisotópicas. El análisis MS/MS se determinó seleccionando 10 precursores con un mínimo de S7N ratio de 40. La fragmentación de los precursores seleccionados se realizó con la energía de colisión a 2 kV y atmósfera como colisión gaseosa. Un total de 1000 adquisiciones se acumularon para cada espectro de MS/MS combinado con MS y el espectro de MS/MS se usó para la búsqueda de candidatos de proteínas utilizando UniProKB/Swiss-Prot (Emisión 57.5) y NCBI-nr (versión April 2009) como base de datos de proteínas humanas con motor de búsqueda Mascot (<http://www.matrixscience.com>) a través del Global Protein Server v3.5 de Applied Biosystems. Los parámetros de búsqueda en Mascot fueron: (a) especie, *Rattus norvegicus*; (b) seguido de la pérdida de sitios de corte; (c) modificaciones fijadas, carbamidometil cisteína; (d) modificaciones variables, oxidación de metioninas y fosforilación de serinas/treoninas/tirosinas (STY); tolerancia peptídica, ± 50 –100 ppm; (f) MS/MS tolerancia, ± 0.3 Da; y (g) carga peptídica, +1.

V. Análisis estadístico.

Los cálculos de significación estadística se han realizado empleando el test de la t de Student para datos no apareados y el análisis de la variancia (ANOVA) con dos factores. Se consideran significativos los valores de $p < 0,05$. Para el análisis estadístico y la generación de las gráficas se ha empleado el programa SPSS 8.0 y SPSS 14.0 (spss, Chicago, IL) y Excell para Windows (Microsoft). Todos los datos se han presentados como el valor de la media \pm la desviación estándar.

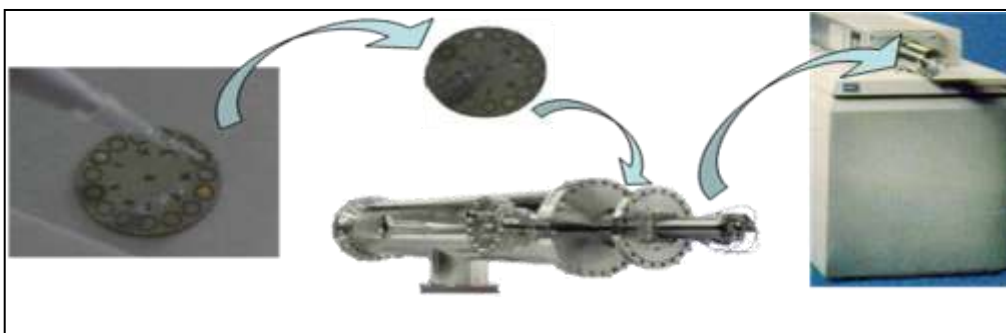


Figura-M&M13. Resumen ilustrativo desde la preparación de la matriz hasta la colocación de la placa en el MALDI-TOF.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se ha utilizado el modelo animal de EH en ratas con derivación portocava (ratas-*dpc*) (Jover, 2006; Numata, 1983). Es decir, se han utilizado animales a los que se les ha operado y practicado una derivación porto-cava (ratas-*dpc*), y animales operados a los que no se les ha realizado la derivación portocava o animales control (ratas-*sham*) (Figura-R&D1). Una vez realizada las operaciones y la derivación porto-cava en los casos correspondientes, los animales se han mantenido bajo condiciones normales de alimentación e higiene durante 6 semanas. A las seis semanas los animales se han sacrificado siguiendo las recomendaciones del Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla (<http://investigacion.us.es/area-investigacion/comite-etico>) y se han extraído, lo más rápidamente posible, los siguientes tejidos y órganos: sangre arterial, cerebro, hígado, riñón e intestino delgado, si bien, en el presente trabajo únicamente se han utilizado el cerebro y puntualmente la sangre arterial (plasma) de ratas-*dpc* y ratas-*sham*. Cada grupo ha estado formado inicialmente por diez animales, si bien en el presente estudio se han utilizado 6 animales en el grupo-*sham* y 7 en el grupo-*dpc*, utilizándose el resto de los animales para ensayos previos y confirmación del estado hiperamonémico, aunque en el grupo-*dpc* hubo además una muerte.

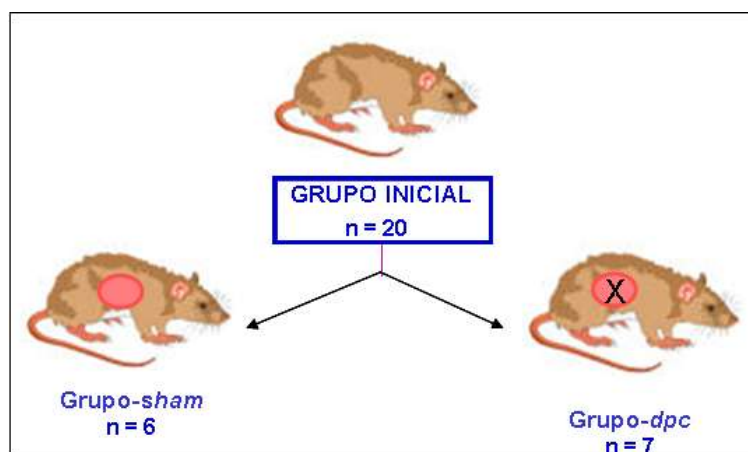


Figura-R&D1 Grupos de animales utilizados en el presente estudio.

I. Niveles de amonio en plasma y en tejido cerebral.

El estado hiperamonémico es una de las características e hipótesis más aceptada en la EH (**Prakash et al., 2010; Lemberg and Fernández, 2009; Faint, 2006**). Para comprobar que el modelo utilizado en el estudio era funcional, lo primero que se hizo fue medir los niveles de amonio en plasma y en el tejido cerebral de las ratas-*dpc* con respecto a las ratas-*sham* (control).

Tabla-R&D1 Niveles plasmáticos de amonio en ratas controles (ratas-*sham*) y con derivación porto-cava (ratas-*dpc*)

Ratas-<i>sham</i>	Amonio [μmoles/l]	Ratas-<i>dpc</i>	Amonio [μmoles/l]
C-1	101,32	DPC-2	320,43
C-3	94,28	DPC-4	306,17
C-4	85,39	DPC-5	308,98
C-7	106,24	DPC-7	314,05
C-9	89,54	DPC-8	280,87
C-10	108,21	DPC-9	306,16
		DPC-10	291,22

Tabla-R&D2 Niveles de amonio en homogenado* de cerebro de ratas controles (ratas-*sham*) y con derivación porto-cava (ratas-*dpc*)

Ratas-<i>sham</i>	Aminio [μmoles/g]	Ratas-<i>dpc</i>	Amonio [μmoles/g]
C-1	3,51	DPC-2	8,32
C-3	2,64	DPC-4	10,02
C-4	3,69	DPC-5	8,54
C-7	3,09	DPC-7	9,23
C-9	3,41	DPC-8	6,85
C-10	4,31	DPC-9	7,33
		DPC-10	8,43

* Relación peso húmedo de tejido/ml de tampón = 0,1 g/ml y expresado como μmoles de amonio por g de tejido (peso húmedo)

Del análisis de los datos expuestos en las **Tablas-R&D1** y **-R&D2**, y que se resumen en la **Tabla-R&D3** y **Figuras-R&D2** y **-R&D3**, se observa que los niveles de amonio, tanto en el plasma como en el cerebro, son

significativamente más elevados, aproximadamente tres veces más, en los animales con derivación porto-cava que en los animales controles (ratas-*sham*), lo que pone claramente de manifiesto que los animales con derivación porto-cava están sometidos a un estado de hiperamonemia. Esto lo hemos interpretado como una primera señal de EH, inducida por los altos niveles de amonio. Estos animales sometidos, previamente, al test del laberinto presentaban un comportamiento anómalo propio de animales con EH.

Tabla-R&D3: Niveles de amonio en el tejido cerebral y plasmático en ratas controles (ratas-*sham*) y ratas hiperamonémicas (ratas-*dpc*)

	Ratas- <i>sham</i> ($\mu\text{mol/l}$)* ($\mu\text{mol/g}$ **)	Ratas- <i>dpc</i> ($\mu\text{mol/l}$)* ($\mu\text{mol/g}$ **)	<i>P</i>
Amonio			
Plasma*	97,50 \pm 9,23	303,98 \pm 13,56	< 0,01
Cerebro**	3,44 \pm 0,56	8,39 \pm 1,07	< 0,01

Los datos se expresan como la media \pm DE de tres datos independientes

* Medido en homogenado (relación peso húmedo de tejido/ml de tampón = 1g/10 ml) y expresado como μmoles de amonio por g de tejido (peso húmedo).

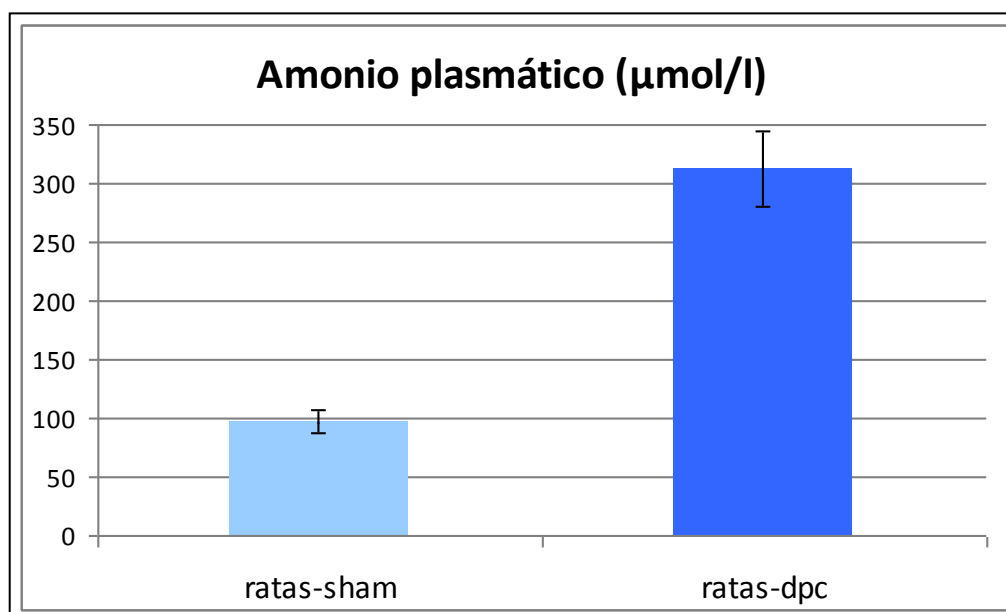


Figura-R&D2. Niveles de amonio plasmático en ratas-*sham* y ratas-*dpc*. Los datos se expresan como la media \pm DE de tres datos independientes ($p < 0.01$).

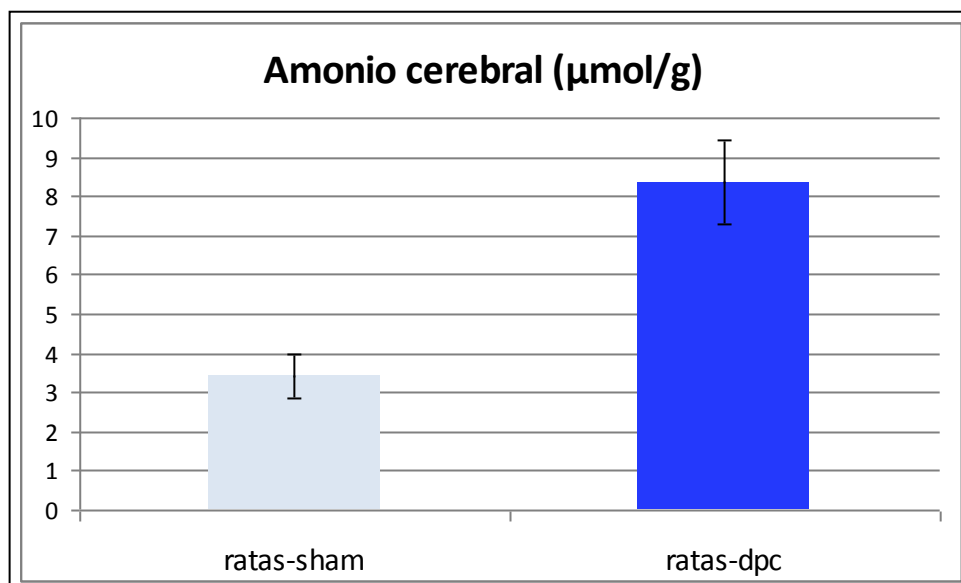


Figura-R&D3. Niveles de amonio en el tejido cerebral en ratas-*sham* y ratas-*dpc*. Los datos se expresan como la media \pm DE de tres datos independientes ($p < 0.01$)

En relación con los niveles de amonio en el cerebro, los datos expuestos corresponden a un valor global, ya que las determinaciones se han realizado sobre homogenados totales de cerebro, sin separación previa de centros cerebrales.

Con el fin de investigar si estos valores eran uniformes en las distintas áreas cerebrales o centros cerebrales, decidimos medir el nivel de amonio en corteza, hipocampo y cerebelo, centros principalmente implicados en las alteraciones psicomotoras observadas en la EH. En la **Figura-R&D4** se muestran los resultados obtenidos.

Como se puede observar de estos datos, la mayor concentración de amonio en el cerebro se localiza en la corteza cerebral, si bien en todos los centros estudiados el nivel de amonio siempre es mayor en los animales con derivación porto-cava en comparación con los animales controles (*sham*).

Resultados análogos han sido publicados por otros investigadores en modelos animales equivalentes (**Swamy et al., 2005**), lo que avala la validez del presente modelo.

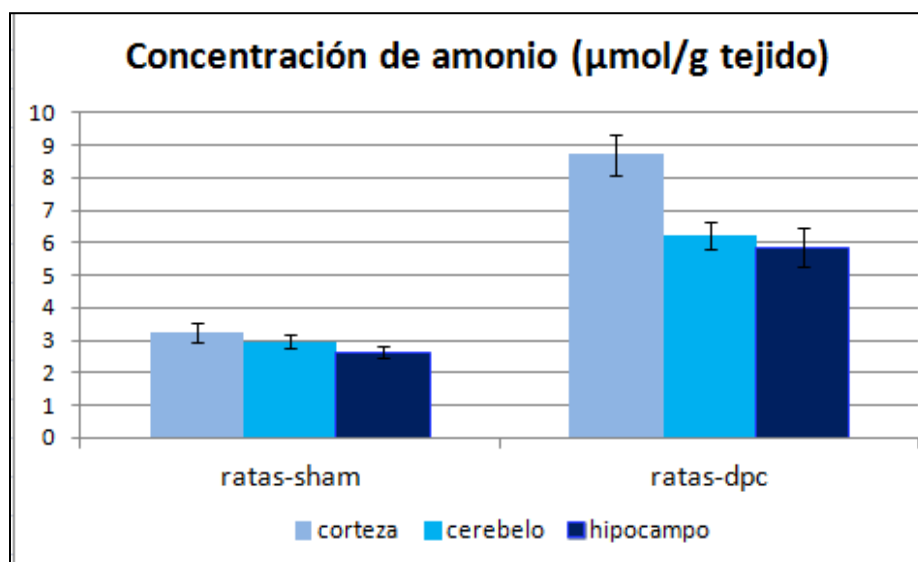


Figura-R&D4. Concentración de amonio en corteza cerebral, cerebelo e hipocampo de ratas-*sham* y -*dpc*. Los datos se expresan como la media \pm DE de tres datos independientes ($p < 0.01$).

II. Hiperamonemia y estrés oxidativo.

Establecido el hecho de que los animales eran hiperamonémicos y presentaban sintomatología propia de la EH, y teniendo en cuenta que concentraciones altas de amonio (hiperamonemia) podrían causar estrés oxidativo, fundamentalmente a nivel del cerebro, (**Monfort et al., 2009**; **Norenberg et al., 2004**) procedimos a investigar esta hipótesis en nuestro modelo. Inicialmente centramos nuestra atención en el estudio de marcadores de estrés oxidativo a nivel de oxidación lipídica y de proteínas.

En los siguientes apartados se muestran los resultados obtenidos al estudiar el “estado oxidativo” y el daño asociado en componentes celulares de naturaleza lipídica y proteica tanto en animales controles (ratas-*sham*) como en

animales sometidos a un estado de hiperamonemia (ratas-*dpc*). Para ello se ha medido la producción de agentes oxidantes (radicales libres, fundamentalmente) y el daño causado por estos agentes sobre lípidos y proteínas. Dado que en los estados de hiperamonemia se producen tanto ERO como ERN, nos referiremos, en principio, a ambos tipos de productos como “oxidantes activos”.

II.1.- Medida de “oxidantes activos” en el cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc*.

Con el fin de estudiar el “estado oxidativo” y el daño asociado sobre los componentes celulares de naturaleza lipídica y proteica tanto en animales controles (ratas-*sham*) como en animales sometidos a un estado de hiperamonemia (ratas-*dpc*) procedimos a determinar el nivel de “oxidantes activos” global. Para ello medimos la producción de agentes oxidantes (radicales libres fundamentalmente) y el daño causado por estos agentes sobre lípidos y proteínas mediante el método de la diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (**Wang and Joseph, 1999**).

La utilización de DCFH-DA es un método ampliamente establecido para medir el “estado oxidativo” de las células. Este método es especialmente útil para la detección de H_2O_2 , $ONOO^-$ e hidroperóxidos orgánicos (**Wang and Joseph, 1999**). La DCFH-DA es permeable a las células, una vez dentro de las células es hidrolizado a DCFH gracias a las esterasas celulares. La DCFH formada por la acción directa de los “oxidantes activos” es transformada en un compuesto fluorescente la DCF, el cual se utiliza como marcador citosólico de estrés oxidativo (**Sohn et al., 2005**).

Los datos obtenidos se muestran en la **Figura-R&D5** y corresponden a células de cerebro (tejido disociado: mezcla de neuronas adultas, células de glía y microgía) tratadas a 37°C con DCFH-DA 25 μ M. Como puede observarse, se aprecia un incremento claro de la presencia de “oxidantes activos” en las células correspondientes a las ratas-*dpc* con respecto al nivel

encontrado en los animales controles (ratas-*sham*). Según podemos ver en dicha figura el nivel de estrés oxidativo de las ratas-*dpc* es de 2,5 veces superior (247%) al que se registra en las ratas-*sham* (100%). De esta manera se contrarresta el efecto de la operación sobre la patología, quedándonos sólo con el porcentaje de “estado oxidativo” debido a la propia patología, hiperamonemia. Valores muy parecidos a los obtenidos en las ratas-*sham*, estadísticamente no significativos, se obtienen con ratas controles no-operadas (valores no mostrados).

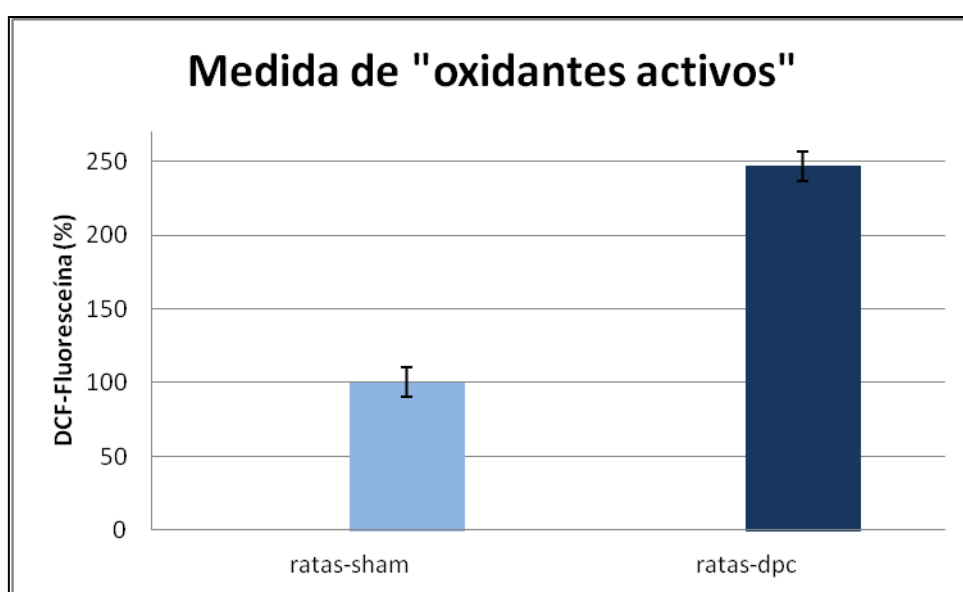


Figura-R&D5: Producción de “oxidantes reactivos” en el cerebro de ratas-*sham* y ratas con derivación porto-cava (*dpc*). Los valores se presentan como porcentajes (%), tomando como 100% el valor ROS obtenido para las ratas-*sham*. Los datos se expresan como la media \pm DE de tres experimentos de medida independientes ($p < 0,01$)

Teniendo en cuenta que el método utilizado para medir el nivel de “oxidantes activos” totales es un método que funciona con mayor especificidad para ERO y para células aisladas (cultivos) y que en nuestro caso se ha adaptado a tejido disociado, los resultados podrían estar afectados por algún tipo de artefacto experimental o de manipulación que pudiera cuestionarlos.

Para minimizar este posible problema, se ha procedido a medir la producción de NO y los posibles efectos causados por la presencia excesiva de este tipo de “especies oxidantes activas”, como son su efecto o daño sobre determinadas biomoléculas: ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, si bien este trabajo se centra en las dos últimas.

II.2.- Medida de niveles de NO en el cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc*.

Con el fin de obtener más información sobre las especies oxidantes activas inducidas por la hiperamonemia, se procedió a medir los niveles de producción de NO tanto en cerebro de ratas-*sham* (controles) como de ratas-*dpc* (hiperamónicas), utilizando para ello el método espectrofotométrico de Griess (**Schaus, 1956**). Como se puede observar en la **Tabla-R&D4** y **Figura-R&D6**, los niveles de NO son más elevados en condiciones de hiperamonemia ($21,80 \pm 1,57$ μ moles/mg proteína) que en condiciones normales (*sham*: $14,76 \pm 1,26$ μ moles/mg proteína).

Tabla-R&D4: Producción de NO en el cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc*

Ratas-<i>sham</i>	[NO] (μmoles/mg proteína)	Ratas-<i>dpc</i>	[NO] (μmoles*mg proteína)
C-1	13.6	DPC-2	20.8
C-3	14.7	DPC-4	24.3
C-4	15.2	DPC-5	21.2
C-7	16.9	DPC-7	19.6
C-9	13.4	DPC-8	23.1
C-10	14.8	DPC-9	21.2
		DPC-10	22.4
	14,76\pm1,26		21,80\pm1,57

Nuestros resultados podrían explicarse teniendo en cuenta que en el estado de hiperamonemia, la ruta glutamato-NO-GMPc está sobre-activada, desequilibrada, tanto en el cerebelo como en la corteza cerebral de ratas con

derivación porto-cava (**Rodrigo et al., 2007; Monfort et al., 2001**). La activación de la nNOS en respuesta a la activación de los receptores NMDA, genera un incremento de NO, que puede difundir a las células adyacentes y activar a las guanilato ciclasas, produciéndose un incremento de la concentración de GMPc.

La ruta glutamato-NO-GMPc juega un papel importante en la modulación de acciones intracelulares y en las comunicaciones intercelulares, incluyendo la potenciación a largo plazo, un proceso básico para muchas formas de aprendizaje y memoria (**Boulton et al., 1995**). El incremento de producción de NO se ha visto que puede deberse a la activación de la nNO, aunque existen estudios, donde en estado de hiperamonemia, no se encuentran valores elevados de expresión o de actividad de esta enzima, con lo que no podría explicarse estos incrementos de NO (**Montoliu et al., 2010**).

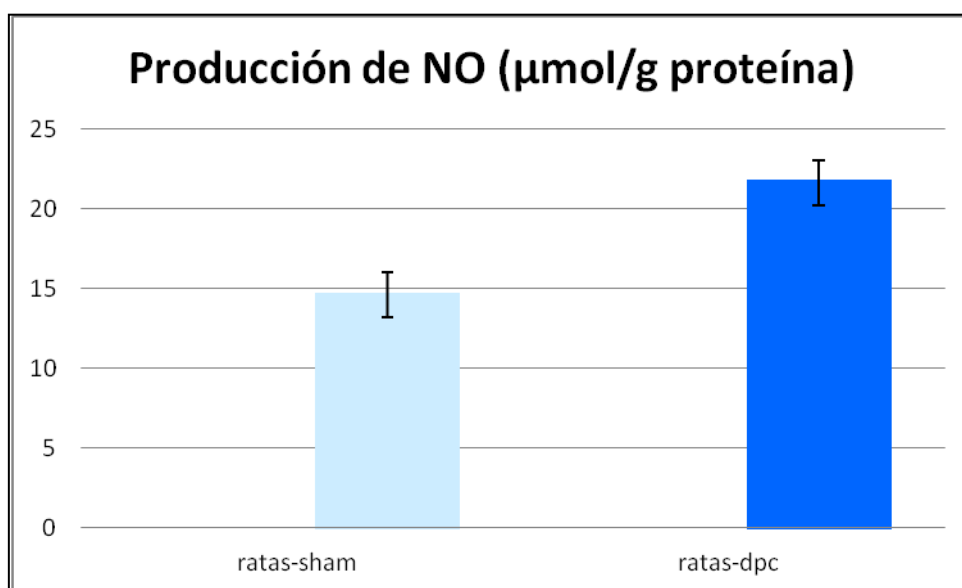


Figura-R&D6: Producción de NO en el cerebro de ratas-*sham* y ratas con derivación porto-cava (*dpc*). Los datos se expresan como la media \pm DE de tres experimentos de medida independientes ($p < 0,01$)

Por otra parte, el NO se genera, fundamentalmente, en la microglía gracias a la NO-sintetasa inducible (NOS-2_i), de forma que el incremento de NO observado en el tejido de las ratas-*dpc* podría interpretarse como el resultado de la inducción de esta enzima por el amonio, resultado coincidente con lo encontrado por otros autores (**Suarez et al., 2005**).

II.3.- Biomarcadores de daño celular

Una vez constatado el incremento de la producción de especies oxidantes, ERO y ERN, en el cerebro de las ratas-*dpc*, pasamos a medir los posibles daños causados por estas sustancias en los componentes lipídicos y proteicos.

II.3.1.- Peroxidación lipídica.

Con el fin de constatar el posible daño causado por las ERO y ERN sobre los componentes lipídicos celulares, se procedió a medir en el cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc* los niveles de sustancias ácido tiobarbitúrico reactivas (TBARS), malondialdehído (MDA) y de 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), principales biomarcadores de peroxidación lipídica celulares.

a) Niveles de TBARS en cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc*.

Los niveles de TBARS en el cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc* se ha determinado mediante el método de espectrofotométrico (colorimétrico) de (**Leal et al., 2005**). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla-R&D5** y **Figura-R&D7**

Como podemos ver de los resultados expuestos en la **Tabla-R&D5** y **Figura-R&D7** la diferencia de peroxidación lipídica, medida como niveles de TBARS, entre las ratas-*sham* con respecto a las ratas-*dpc* ($0,112 \pm 0,023$ nmoles/mg proteína frente a $0,180 \pm 0,020$ nmoles/mg proteína, respectivamente) no es tan pronunciada como cabría esperar del incremento

observado para las “sustancias oxidantes activas”. Si consideramos el valor de las ratas-*sham* como el 100%, la diferencia respecto a las ratas-*dpc* (161%) es de un incremento del 61% en la peroxidación lipídica, notablemente más baja que el incremento en la producción de “sustancias oxidantes activas”, que era un incremento del 147%, como más arriba hemos indicado. Lo cual podría ser indicativo de que las “sustancias oxidantes activas” no sólo actúan sobre los lípidos celulares, sino también sobre otras biomoléculas, proteínas y ácidos nucleicos fundamentalmente (**Floyd and Carney, 1992**), como más adelante discutiremos.

Tabla-R&D5: Niveles de TBARS en el cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc*.

Ratas- <i>sham</i>	[TBARS] (μ moles/mg proteína)	Ratas- <i>dpc</i>	[TBARS] (μ moles/mg proteína)
C-1	0,081	DPC-2	0.203
C-3	0,142	DPC-4	0.145
C-4	0,108	DPC-5	0.188
C-7	0,096	DPC-7	0.183
C-9	0,132	DPC-8	0.178
C-10	0,110	DPC-9	0.200
		DPC-10	0.165
	0,112 ± 0,023		0,180 ± 0,020

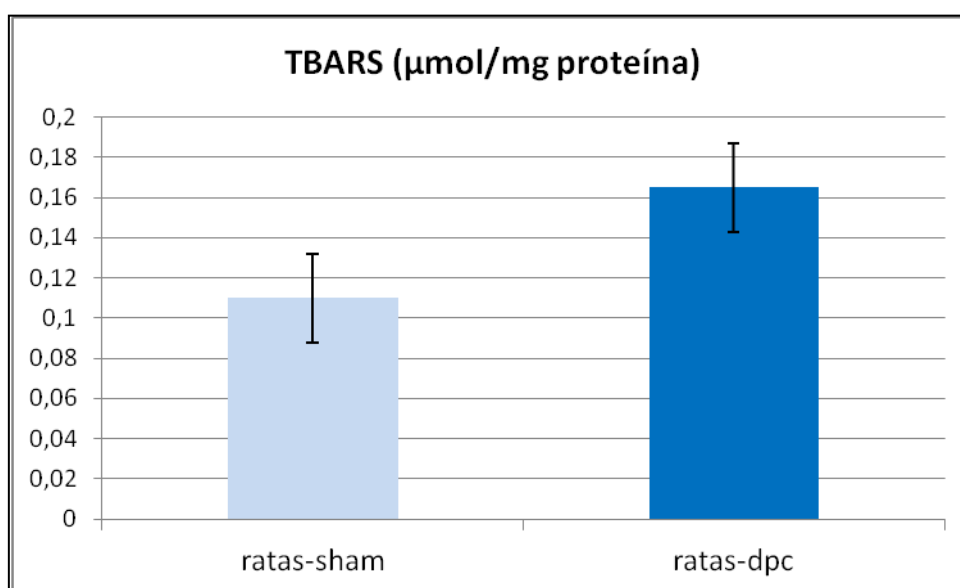


Figura-R&D7. Niveles de TBARS en el cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc*. Los datos se expresan como la media \pm DE de tres experimentos de medida independientes ($p < 0,01$).

b) Niveles de MDA en cerebro de ratas-sham y ratas-dpc.

Los niveles de MDA, en cerebro de ratas-sham y ratas-dpc, se han llevado a cabo mediante un método cromatográfico de HPLC en fase reversa (RP-HPLC) de acuerdo con los procedimientos descritos por (**Sommerburg et al., 1993; Wong et al., 1987**). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla-R&D6**.

Tabla-R&D6: Niveles de MDA en el cerebro de ratas-sham y ratas-dpc.

Ratas-sham	[MDA] (μmoles/mg proteína)	Ratas- dpc	[MDA] (μmoles/mg proteína)
C-1	0,021	DPC-2	0,072
C-3	0.019	DPC-4	0,065
C-4	0.016	DPC-5	0,057
C-7	0.024	DPC-7	0,061
C-9	0,028	DPC-8	0,062
C-10	0.018	DPC-9	0,054
		DPC-10	0,060
	0,021\pm0,004		0,062\pm0,006

Como podemos ver de los resultados expuestos en la **Tabla-R&D6** y **Figura-R&D8** el nivel de peroxidación lipídica, medida como concentración de MDA, en las ratas-sham y ratas-dpc (0,021 \pm 0,004 nmoles/mg proteína y 0,062 \pm 0,006 nmoles/mg proteína, respectivamente) no son tan elevados como en el caso de su evaluación como TBARS. Esto se puede explicar debido a que la estimación como MDA, mediante el método cromatográfico de HPLC-RP es específico para MDA, mientras que el método colorimétrico de las TBARS es un método inespecífico que mide tanto productos de peroxidación lipídica como otras sustancias inespecíficas (**Carbonero-Aguilar et al., 2011**)

Además, los datos anteriores se refieren a MDA libre, ya que el MDA unido o ligado no se puede determinar mediante el método cromatográfico anteriormente descrito, lo que podría explicar en parte los bajos niveles de MDA encontrados.

c) Niveles de HNE en cerebro de ratas-sham y ratas-dpc.

Los niveles de HNE, en cerebro de ratas-sham y ratas-dpc, se han llevado a cabo mediante un método de inmunoensayo de acuerdo con el procedimiento descritos por (Kurisaki and Hiraiwa, 2009). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla-R&D7** y **Figura-R&D9**.

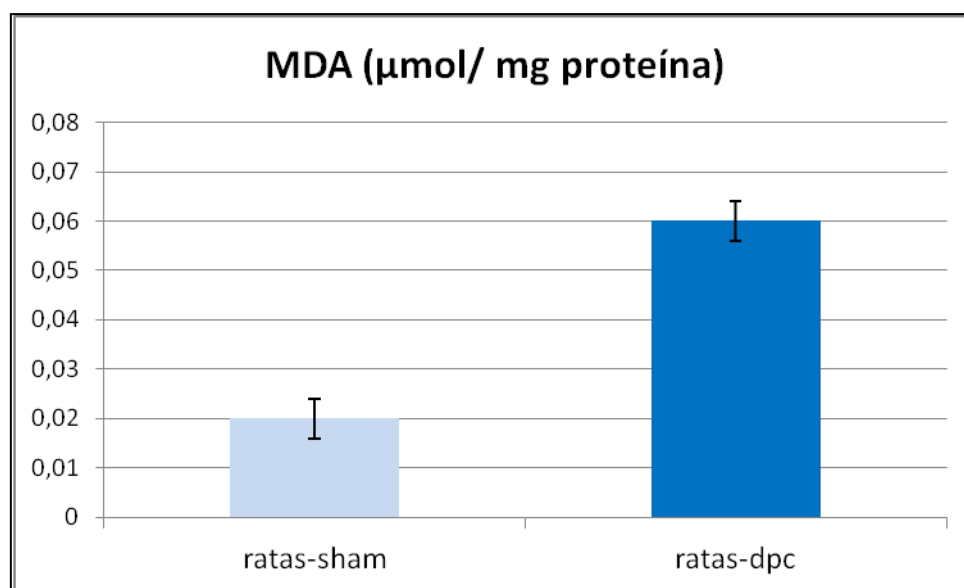


Figura-R&D8. Niveles de MDA en el cerebro de ratas-sham y ratas-dpc. Los datos se expresan como la media \pm DE de tres experimentos de medida independientes ($p < 0,01$).

Tabla-R&D7: Niveles de HNE en el cerebro de ratas-sham y ratas-dpc.

Ratas-sham	[HNE] (µmoles,mg proteína)	Ratas-dpc	[HNE] (µmoles,mg proteína)
C-1	0,010	DPC-2	0,018
C-3	0,007	DPC-4	0,017
C-4	0,011	DPC-5	0,022
C-7	0,008	DPC-7	0,016
C-9	0,005	DPC-8	0,014
C-10	0,009	DPC-9	0,020
		DPC-10	0,017
	0,008±0,002		0,018±0,003

Como podemos observar de los resultados expuestos en la **Tabla-R&D7** y **Figura-R&D9** el nivel de peroxidación lipídica, medida como concentración de HNE, en el cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc* ($0,008 \pm 0,002$ nmoles/mg proteína y $0,018 \pm 0,003$ nmoles/mg proteína, respectivamente), al igual que en el caso del MDA, no son tan elevados como en el caso de su evaluación como TBARS. Esto, en este caso también, se puede explicar debido a que la estimación de la peroxidación lipídica específicamente como HNE, se ha llevado a cabo mediante un método específico para este compuesto unido a proteína es decir HNE ligado; mientras que el método colorimétrico de los TBARS es un método inespecífico que mide tanto productos de peroxidación lipídica libres como ligados así como otras sustancias inespecíficas (**Carbonero-Aguilar et al., 2011**).

En la **Tabla-R&D8** se muestran los valores medios obtenidos para la peroxidación lipídica en el cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc*, mediante tres biomarcadores distintos. El análisis de estos datos muestra que mientras la peroxidación lipídica estimada como TBARS es 1,61 veces mayor en el cerebro de ratas-*dpc* que en el de ratas-*sham*, la estimación específica como MDA y HNE es de 2,95 y 2,25 veces mayor en el cerebro de ratas-*dpc* que en el de ratas-*sham*. Lo cual podría explicarse por la mayor especificidad y selectividad de los dos últimos biomarcadores, que minimizarían grandemente la respuesta debida a valores inespecíficos.

Tabla-R&D8: Medida de la peroxidación lipídica mediante distintos biomarcadores: TBARS, MDA y HNE, en ratas controles (ratas-*sham*) y ratas hiperamonémicas (ratas-*dpc*). .

	Ratas-<i>sham</i> ($\mu\text{mol/mg}$ proteína)	Ratas-<i>dpc</i> ($\mu\text{mol/mg}$ proteína)	P
TBARS	$0,112 \pm 0,023$	$0,180 \pm 0,020$	< 0,05
MDA	$0,021 \pm 0,004$	$0,062 \pm 0,006$	< 0,01
HNE	$0,008 \pm 0,002$	$0,018 \pm 0,003$	< 0,01

TBARS: sustancias ácido tiobarbiturico reactivas; MDA: malondialdehído; HNE: 4-hidroxi-2-nonemal. Los datos se expresan como la media \pm DE de tres experimentos independientes.

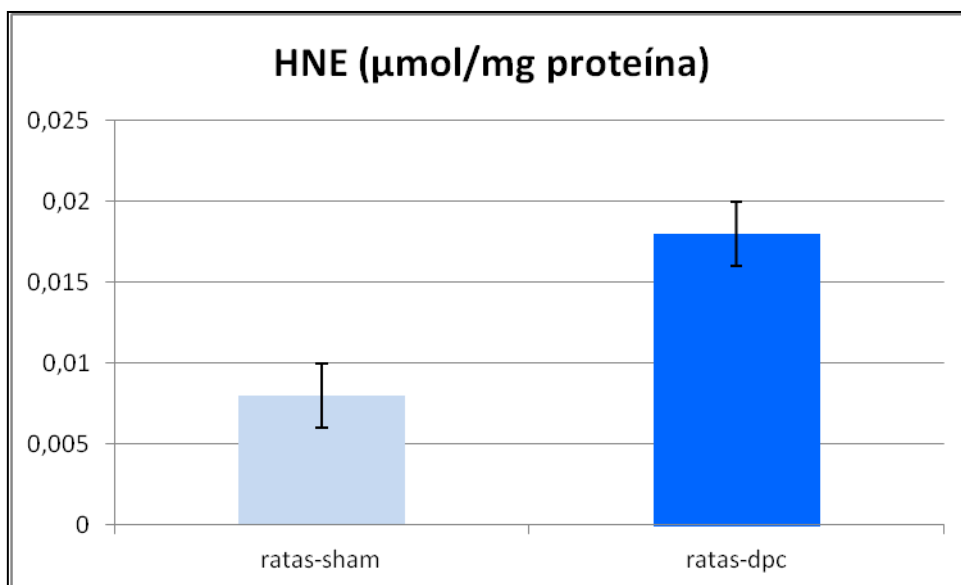


Figura-R&D9. Niveles de HNE en el cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc*. Los datos se expresan como la media \pm DE de tres experimentos de medida independientes ($p < 0,01$).

II.3.2.- Oxidación de proteínas.

El otro grupo de biomoléculas altamente sensible al daño causado por los “oxidantes activos”, fundamentalmente por las ERO, además de los ácidos nucleicos, son las proteínas (**Stadtman, 2006**), que debido a su alta concentración celular constituyen dianas preferentes.

La cuantificación del daño oxidativo proteico se ha llevado a cabo mediante la cuantificación de grupos carbonilos por el método de la DNPH de acuerdo con el método descrito por el grupo de Stadtman (**Evans et al., 1999; Levine et al., 1994; 1990**). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla-R&D9** en la **Figura-R&D10**.

Como indican los datos presentados en la **Tabla-R&D9** y en la **Figura-R&D10**, el contenido en grupos carbonilo y por tanto el grado de oxidación

proteico es mayor ($4,70 \pm 0,57$ nmol/mg proteína) en ratas-*dpc* (hiperamonémicas) que en las ratas-*sham* ($2,72 \pm 0,24$ nmol/ mg proteína).

Tabla-R&D9: Contenido de grupos carbonilos en las proteínas del cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc*.

Ratas- <i>sham</i>	[Grupos carbonilo] (nmoles/mg proteína)	Ratas- <i>dpc</i>	[Grupos carbonilo] (nmoles·mg proteína)
C-1	2,73	DPC-2	5,07
C-3	2,98	DPC-4	4,82
C-4	2,51	DPC-5	5,14
C-7	2,43	DPC-7	3,97
C-9	3,01	DPC-8	3,81
C-10	2,65	DPC-9	4,94
		DPC-10	5,21
	$2,72 \pm 0,24$		$4,70 \pm 0,57$

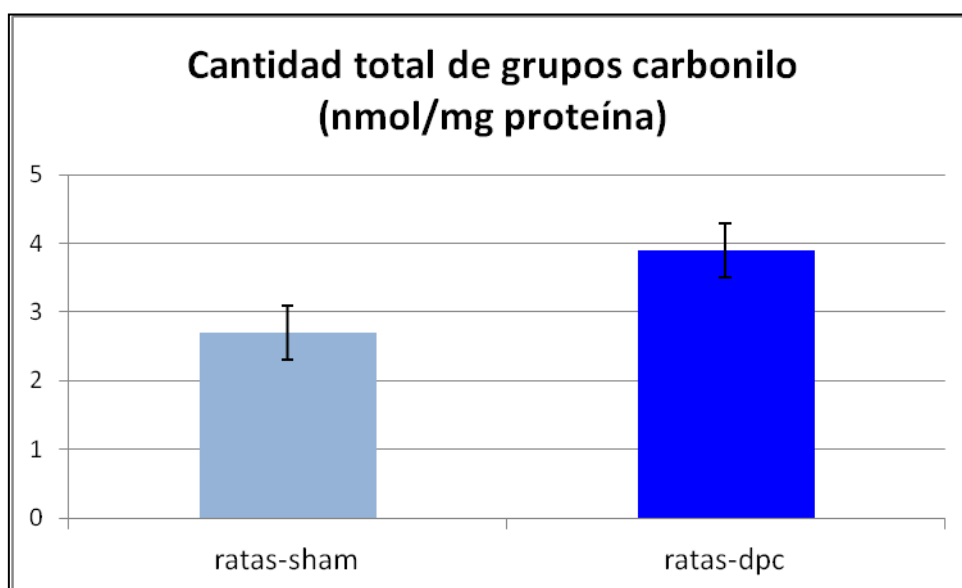


Figura-R&D10: Concentración de grupos carbonilos en las proteínas del cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc*. Los datos corresponden al valor medio \pm DE de tres experimentos independientes ($p < 0,01$)

Como estos resultados indican, se observa una importante elevación del contenido en grupos carbonilos en las muestras de cerebro de ratas-*dpc* en

comparación con las muestras de cerebro de ratas-*sham*, es decir, un incremento del orden del 73%, o de 1,73 veces.

El análisis conjunto de los datos de peroxidación lipídica y de oxidación proteica como carbonilación (formación de grupos carbonilos) podríamos interpretarlo como que el incremento de la peroxidación lipídica en las ratas-*dpc* es más pronunciado (1,61 como TBARS, 2,95 como MDA y 2,25 como HNE) que el observado para el daño oxidativo (carbonilos) sobre las proteínas (1,73).

Estos resultados apuntan claramente hacia una participación directa del estrés oxidativo en las ratas-*dpc*. El que esto es así se ha comprobado por otros miembros del grupo (**Casco-Lorente, 2008; Collantes de Terán & Bautista, resultados no publicados**), alimentando un grupo de ratas-*dpc* con una dieta normal y otro grupo con una dieta enriquecida en antioxidantes y AARs.

Estos resultados confirman la participación del estrés oxidativo en la EH desarrollada por las ratas-*dpc* pero no nos dice nada sobre los mecanismos y proteínas/enzimas implicados en el desarrollo fisiopatológico de la EH.

El efecto parcialmente protector observado en los anteriores estudios, a nivel del daño sobre lípidos y proteínas, parece indicar que o bien el antioxidante (ergotioneína) administrado en la dieta o bien la estimulación de los sistemas antioxidantes celulares, podrían ser los responsables del efecto beneficioso observado en el grupo de ratas-*dpc* alimentadas con una dieta enriquecida en ergotioneína, selenio orgánico y aminoácidos ramificados.

Con el fin de investigar qué proteínas/enzimas podrían estar implicadas en la fisiopatología observada en las ratas-*dpc* procedimos a estudiar la expresión diferencial de proteínas en las ratas-*sham* y ratas-*dpc*, ya que una expresión diferencial de proteínas/enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno, sistemas antioxidantes celulares y/o relacionadas con el

hinchamiento de los astrocitos, podrían explicar las diferencias observadas. Aunque, desde un principio también se tuvo en cuenta que estas diferencias podrían ser debidas a modificaciones post-traduccionales, fundamentalmente oxidativas (**Bautista et al., 2000**).

En base a esta hipótesis, seguidamente procedimos a estudiar la expresión diferencial de proteínas y sus posibles modificaciones post-traduccionales (oxidativas) en el cerebro de ratas-*sham* y rats-*dpc*.

Una vez comprobado, midiendo diferentes marcadores (estado oxidativo global, contenido en NO, peroxidación lipídica, oxidación de proteínas (grupos carbonilos totales, etc) y que no todas las proteínas se oxidan por igual (como más adelante discutiremos), que en condiciones de hiperamonemia se produce un estado de estrés oxidativo y que nuestros resultados eran análogos a los encontrados por otros autores en otros modelos (**Bemeur et al., 2010**); nos planteamos la siguiente pregunta: ¿cómo afecta esta desregulación/desequilibrio a los sistemas antioxidantes de las ratas-*dpc* en el contexto de la EH? Inicialmente podríamos pensar dos situaciones:

i) Alteraciones en el patrón de expresión de proteínas.

En este caso, la célula, en un principio, podría necesitar más enzimas antioxidantes o moléculas que actúan como aceptores de esos radicales libres que se han producido (glutación peroxidasa, glutación reductasa, superóxido dismutasa, catalasa, ...), además esta acumulación de radicales libres podría llegar a alterar el funcionamiento de la maquinaria celular, afectando al sistema de transcripción de genes, sintetizándose proteínas, que en el estado normal de la célula no se encuentran o que lo hacen en menor proporción.

ii) Alteraciones o modificaciones post-traduccionales.

Por otro lado, ese estado de “estrés” generado, produciría radicales libres, ERO y ERN que podrían modificar a las propias biomoléculas, y en concreto a las proteínas, generando aductos, modificando su estructura, adicionándole grupos, en definitiva modificando sus funciones.

La siguiente pregunta que podría plantearse es: ¿cómo estudiar cada una de las aproximaciones? Para ello en cada caso podemos utilizar los siguientes abordajes:

1) Estudio de las alteraciones del patrón de expresión proteico:

Este estudio puede abordarse mediante procedimientos proteómicos, bien, basados en la cromatografía líquida y la espectrometría de masas, ICAT o iTRAQ, fundamentalmente (**Collantes de Terán, 2006; Gigy, 1999**), o basados en la electroforesis bidimensional (2D) y la espectrometría de masas (**Görg et al., 2004; Gygi et al., 2000**). En este estudio nos hemos decidido por el procedimiento basado en la 2D y la espectrometría de masas, concretamente por el procedimiento denominado *Differential In Gel Electrophoresis* (DIGE) (**Unlu et al., 1997**), que como más adelante discutiremos ofrece grandes ventajas sobre los métodos clásicos.

2) Estudio de las alteraciones o modificaciones post-traduccionales:

Las alteraciones observadas en la EH no sólo podrían explicarse por una alteración de la expresión génica sino también por la modificación de las cadenas proteicas una vez sintetizadas o por modificaciones post-traduccionales, que pueden modificar o desactivar las proteínas/enzimas.

III. Estudio de la expresión diferencial de proteínas en el cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc* mediante DIGE.

El uso de la 2D, nos permite tener una visión global del estado del proteoma en un estado fisiológico o patológico concreto de la célula o de un tejido, pudiéndose comparar el patrón de *spots* de diferentes muestras y cuantificar si existen cambios individuales de las proteínas. Este estudio se ha venido haciendo durante muchos años utilizando la 2D como herramienta de trabajo, y numerosos trabajos se han publicado utilizando esta técnica. (**Di**

Carli et al., 2011; Kim et al., 2008; Hamdan and Righetti, 2002). Ahora bien este procedimiento presenta varios inconvenientes o limitaciones técnicas: **i)** alta variabilidad entre geles, porque se comparan geles independientes, donde la migración, intensidad y condiciones de cada gel puede variar, resultando difícil determinar si esas variaciones se deben a variaciones biológicas o experimentales; **ii)** dificultad en el macheo o comparación entre geles; **iii)** un menor grado de sensibilidad por poseer un rango dinámico más limitado al compararse con métodos que utilizan la fluorescencia para detectar las muestras (**Gharbi et al., 2002; Unlu et al., 1997**). Sin embargo, el desarrollo de una nueva técnica de 2D, denominada DIGE, minimiza estos inconvenientes y nos permite comparar de forma reproducible el nivel de expresión de dos muestras de proteínas, simultáneamente, en un mismo gel, pudiendo separar miles de proteínas a partir de unos pocos miligramos de muestra. Además, teníamos la posibilidad de colaborar con el grupo del Dr. Georg J. Arnold del *Laboratory for Functional Analysis (LAFUGA) del Gene Center, Maximilian Universität München*, (Alemania), uno de los principales laboratorios implicados en el desarrollo y aplicación del DIGE (**Blutke et al., 2011**).

De acuerdo con diferentes estudios en pacientes con hiperamonemia y EH aguda, transplantados hepáticos (**Ross et al., 1996**) o bien tratados con antibióticos (neomicina, rifaximina), con aminoácidos de cadenas ramificadas (BCAA) o con dietas basadas en proteínas vegetales (**Prakash et al., 2010**), se ha observado una mejoría en los síntomas propios de la EH, lo que conlleva a una mejoría del paciente, especialmente en lo relacionado con su comportamiento psicomotor (**Les et al., 2011; Iwasa et al., 2003**) además de poder conllevar una reducción de la estancia hospitalaria. Esto nos llevó a pensar que las modificaciones que ocurren en estos pacientes no deberían ser, en gran parte, de naturaleza irreversibles, y que además no deberían ser muy pronunciadas. Por lo que una diferencia en la expresión de proteínas podría explicar la mayor parte de los síntomas observados en la hiperamonemia y por ende en la EH.

Por ello, pasamos a estudiar la expresión diferencial de proteínas/enzimas en el cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc* mediante la técnica del DIGE. Para afinar en los resultados, y teniendo en cuenta que la hiperamonemia, y en la EH, no se afecta por igual a todo el tejido cerebral, habiendo centros más sensibles que otros, centramos nuestro estudio en dos centros, corteza cerebral y cerebelo, más que en el cerebro completo. De esta manera se podría concretar más la localización de estas proteínas/enzimas y evitar efectos de enmascaramiento de proteínas que en unos centros se podrían expresar en mayor o menor cantidad.

La realización del estudio se llevó a cabo de la siguiente manera. En cada gel, se corrieron tres muestras (ratas-*sham*, ratas-*dpc* y patrón interno), según el diseño experimental (ver M&M, página 84). Resultando de este modo un total de 6 muestras a analizar, es decir, tres geles diferentes por duplicado. La razón por la cual se ha usado este número mínimo de análisis es porque, esta técnica, entre otras, presenta la ventaja de que al introducir el estándar interno (mezcla de las muestras), hace que se reduzca el número de réplicas que son necesarias para que los datos analizados sean estadísticamente significativos (**Gharbi et al. 2002**). Este planteamiento analítico se ha utilizado tanto en el caso del estudio de la expresión diferencial de proteínas en la corteza cerebra como en el cerebelo.

Una vez resuelto los geles, éstos se han analizado mediante el programa bioinformático DeCyder 7.0. Seguidamente se “machearon”/compararon los *spots* y los datos se filtraron para retener *spots* con un valor de p (ANOVA) igual o inferior a 0,05, además de tener sólo en cuenta los *spots* presentes en todos los geles (18 mapas de *spots*: 3 mapas de *spots* x 3 geles x 2 repeticiones). En las **Figuras-R&D11** y **-R&D12** se muestran los geles de DIGE obtenidos para el análisis de la expresión de proteínas en la corteza cerebral y cerebelo, de ratas-*sham* y ratas-*dpc*, respectivamente.

El análisis de estos geles, mediante el software DeCyder 7.0, ha puesto de manifiesto, que al menos con nuestros parámetros de exclusión o filtros, tanto en el caso de la corteza cerebral como del cerebelo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la expresión diferencial de proteínas entre ratas-*sham* y ratas-*dpc*. A esta conclusión se llegó, como hemos indicado, tras el estudio de parámetros como la abundancia relativa de cada uno de los *spots*, cociente de volumen, cociente de área, y valor de p.

Lo que si observamos fue que si analizábamos individualmente las muestras, para determinados *spots* se podía observar diferente color en la imagen formada por la superposición de las tres imágenes correspondientes a los tres fluoróforos. Además, si nos fijábamos en su abundancia relativa, se podían ver diferencias entre la muestra de rata-*dpc* con respecto a la muestra de rata-*sham* (**Figura-R&D13**), aunque estos valores no eran estadísticamente significativos, si los veíamos sistemáticamente en todos los geles. La explicación a la aparición de *spots* que, individualmente, presentaban diferencias podría deberse a dos causas, al menos:

i) A que el nivel de expresión no es completamente idéntico en todos los individuos, pudiendo existir diferencias apreciables.

Al estudiar cualquier parámetro no hay que olvidar la variabilidad intraespecífica, es decir, cada individuo responde de una forma concreta y diferente a otro individuo. Así, en el estado de hiperamonemia, sólo en un 20-30% de la población se presenta una expresión diferencial de proteínas totalmente coincidente (**Blutke et al., 2011**). Aunque para concluir un dato de manera estadísticamente significativa, éste debe de producirse de forma repetitiva en al menos la mitad o más de la población analizada, si no, no es estadísticamente significativo y por tanto, no es concluyente, sin embargo en un número apreciable de individuos se observan diferencias claras.

ii) A artefactos del proceso de marcaje, extracción y preparación de la muestra. Los efectos debido a la manipulación de la muestra pueden afectar a los resultados, haciéndonos pensar en falsos positivos o falsos negativos.

Para comprobar a cuál de estas causas se podrían deber estos resultados, se analizaron los geles donde se observaban los *spots* de diferente color (**Figura-R&D14 (A)**) mediante *Differential In-gel Analysis* (DIA). Para ello, primero se seleccionaron los *spots* que fuesen puntos de interés (POI), aplicándole los siguientes parámetros: número de *spots* = 5000; umbral de modo = 1,5; pendiente = 1,1, área < 100; altura máxima <80 y >65000; cociente de volumen $\geq 1,41545$ o $\leq -1,41545$, volumen máximo $\geq 10^5$ y $\leq 10^8$ (**Figura-R&D14 (B)**). Luego se comprobó la presencia de estos POI en los tres pares de geles (**Figura-R&D14 (C)**) y se comprobó si la tendencia en la gráfica mediante el *Biological Variation Analysis* (BVA) (**Figura-R&D13 (C)**) era la misma, es decir, si por ejemplo en todas las ratas-*sham* aumentaba y en todas las ratas-*dpc* disminuía. Sólo 4 *spots* cumplían todos los requisitos mencionados: los *spots* A, E, F y G en el par de muestras DPC8 (rata-*dpc*), C9 (rata-*sham*). Estos resultados corresponden a cerebelo, si bien, resultados análogos se obtienen en corteza. Por lo que sólo se volvieron a repetir las dos réplicas de los geles de ese par de muestras, incluyendo el estándar interno por si se necesitaba comparar en el BVA o bien para evitar artefactos y asegurar las mismas condiciones en los geles (3 marcajes con fluoróforos) y en el escaneado de los mismos. Si no se volviera a observar la aparición de estos *spots* con diferente color e igual comportamiento se debería a un artefacto en el proceso.

Tras este análisis, se vio que el *spot* A no aparecía en los dos nuevos geles (DPC8, C9), así que probablemente se debiera a un artefacto durante el proceso de marcaje con los fluoróforos, en la extracción o preparación de las muestras (**Figura-R&D15**).

Mientras que los *spots* E, F y G aparecían en ambos geles, de nuevo. La abundancia de estos *spots* estaba incrementada en la muestra rata-*dpc* (DPC8) de todos los geles analizados (las dos réplicas anteriores y las nuevas), pudiéndose apreciar que este incremento en la abundancia no era del todo muy elevado (midiéndose el incremento como valor del volumen y altura máxima) (**Tabla-R&D10**), con lo que en principio esto hacía pensar que podrían ser

proteínas que en esos individuos se expresaran de forma diferencial. Para concluir, seguidamente se realizó un gel preparativo (**Figura-R&D14 (D)**), con una cantidad de muestra mayor (250 µg) que mejora la resolución del gel a la hora de visualizar (tinción con Coomassie compatible con masas) y recortar, picar los *spots* para posteriormente someterlos a digestión con tripsina e identificación mediante espectrometría de masas.

En la **Tabla-R&D11** se recoge la identificación para cada *spot*. En todos los casos, el *protein score* mayor, es decir, el índice que nos indica el grado de fiabilidad del resultado, es para identificarlos como albúmina sérica. Puede decirse que al estar situados a un mismo peso molecular (± 7000 Da) y tener una mínima variación en el punto isoeléctrico (ya que los tres *spots* se encuentran a la misma altura y con una leve variación en la posición con respecto al pI), son distintas isoformas de albúmina. En un principio, puede atribuirse a que como las muestras, una vez extraídas se homogenizan en lisis buffer, sin ser tratadas para eliminar restos de sangre, se debería a una contaminación de sangre en las muestras. Otra posibilidad sería que en el gel preparativo, la albúmina y otras proteínas de interés como la *Dihydropyrimidinase-related protein 2*, no se hubiesen separado de manera tan eficiente como en los geles analíticos (los geles DIGE).

De este estudio, podemos concluir que tras analizar, tanto en corteza cerebral como en cerebelo, la expresión diferencial de proteínas en ratas-*dpc* frente a ratas-*sham* de 6 semanas, no se observa ninguna diferencia estadísticamente significativa en la expresión de proteínas. Si bien, aunque se ha realizado la comprobación, a nivel individual, se han seguido utilizando parámetros bastante restrictivos (*threshold*: 1.5, principalmente). Lo cual podría interpretarse que en este estudio no ocurren cambios drásticos de expresión de proteínas sino que podrían ser cambios más sutiles, por ello se observaban diferencias de expresión a nivel individual en ciertas muestras, de manera sistemática.

Así pues, podría decirse que el estado de hiperamonemia y el estado oxidativo generado, no altera de manera clara el patrón de expresión de

proteínas en ambos centros estudiados. Por lo que los cambios que se observan podríamos atribuirlos a cambios o modificaciones generadas una vez se han sintetizado las proteínas, es decir, a cambios post-traduccionales. Esto reforzaría el hecho, comentado con anterioridad, por el que se observa que los pacientes con EH, cuando se elimina el agente causante (generalmente altas concentraciones de amonio) desaparecen la mayoría de los síntomas (**Antoni, 2006**). Lo que podría llevarnos a pensar que los cambios que se producen en este síndrome no serían cambios a nivel génico ni/o a cambios irreversibles, sino más bien a cambios reversibles o a cambios irreversible inicialmente silentes por debajo del umbral de daño (carbonilación p. ej.).

Cómo se dijo anteriormente, el estudio del efecto causado por la hiperamonemia en el desbalance del sistema antioxidante celular y por tanto, en el estrés oxidativo generado, se ha visto que no produce cambios estadísticamente significativos a nivel del patrón de expresión de proteínas. Por lo que a continuación centramos nuestro estudio en el efecto del estrés oxidativo generado por el estado hiperamonémico sobre las modificaciones post-traduccionales en las proteínas, que era el otro abordaje que se había planteado. Para ello, a pesar de ser una modificación irreversible, nos hemos centrado en el estudio de los grupos carbonilo, que detallaremos en el siguiente apartado.

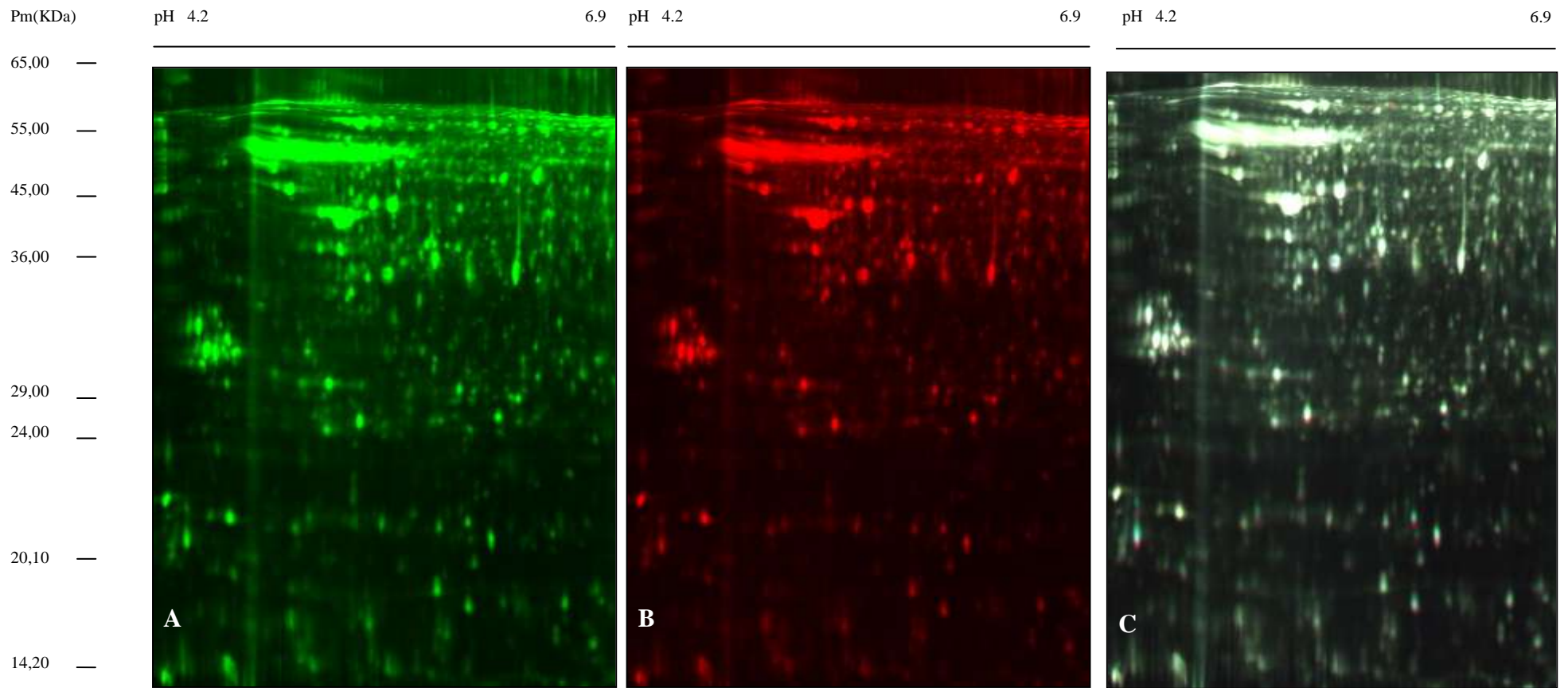


Figura-R&D11. Imágenes DIGE de la corteza cerebral de rata marcado con fluoróforos (marcaje mínimo). **(A)** Muestra de rata-*sham* marcada con Cy3; **(B)**. Muestra de rata-*dpc* marcada con Cy5; **(C)**. Superposición de las imágenes (A) and (B).

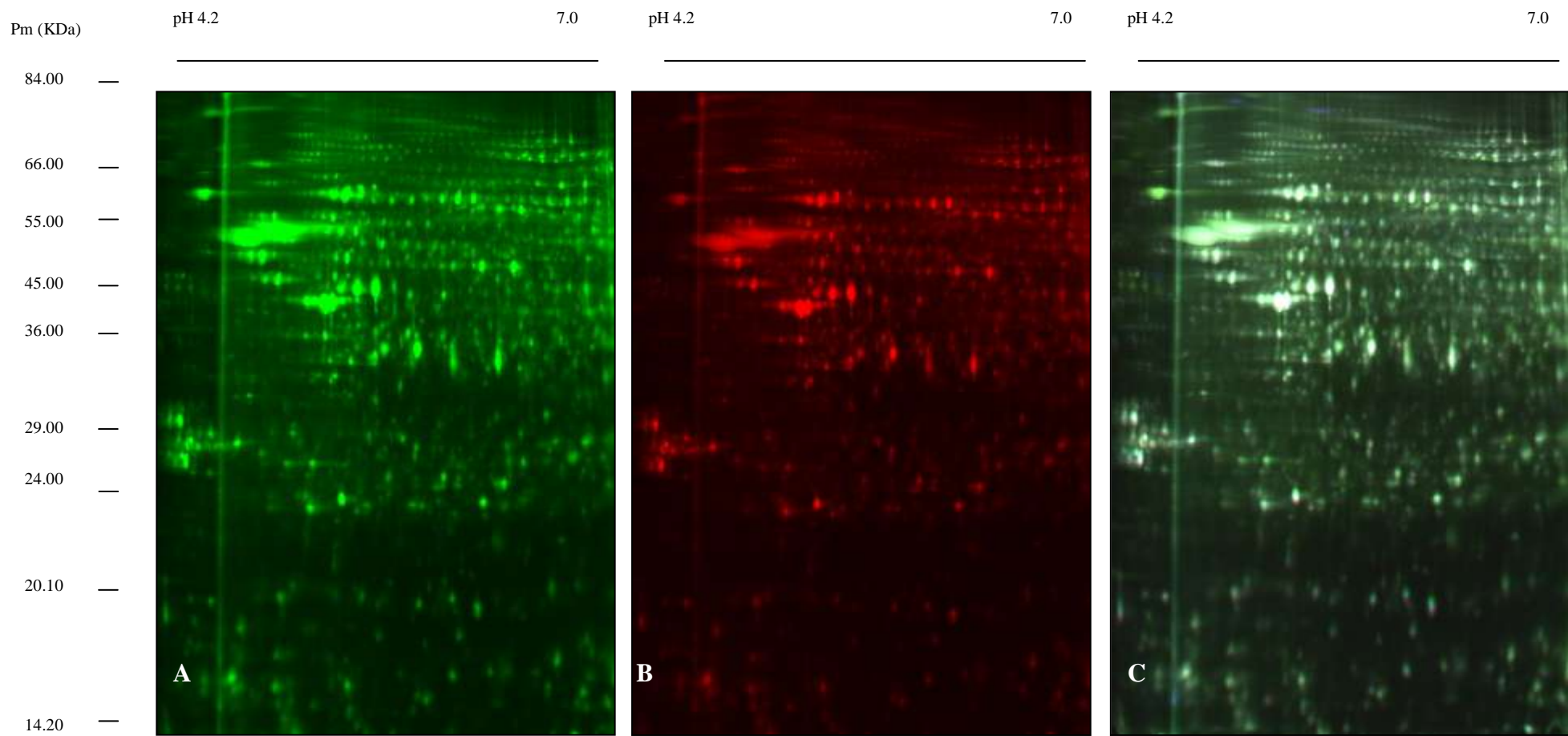
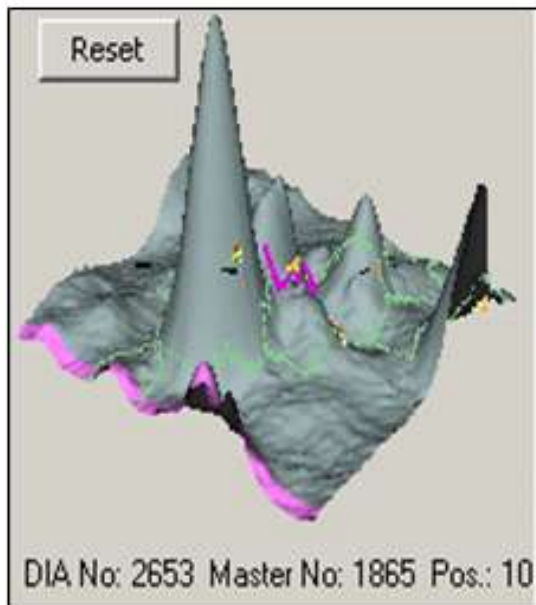
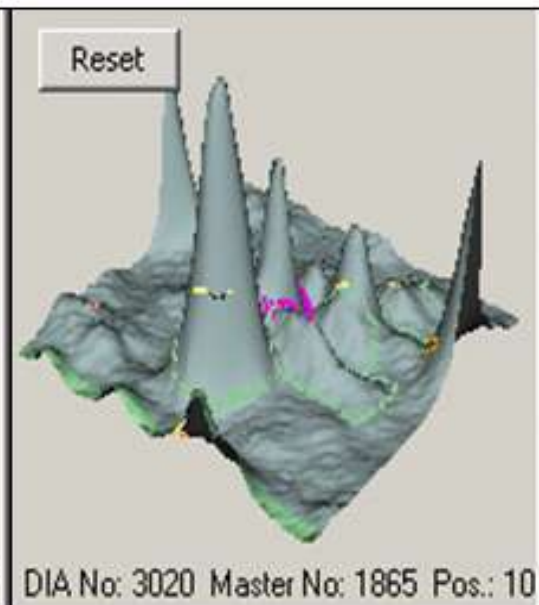


Figura-R&D12. Imágenes DIGE del cerebelo de rata marcado con fluoróforos (marcaje mínimo). **(A)** Muestra de rata-*sham* marcada con Cy3; **(B)**. Muestra de rata-*dpc* marcada con Cy5; **(C)**. Superposición de las imágenes (A) and (B).

A



B



C

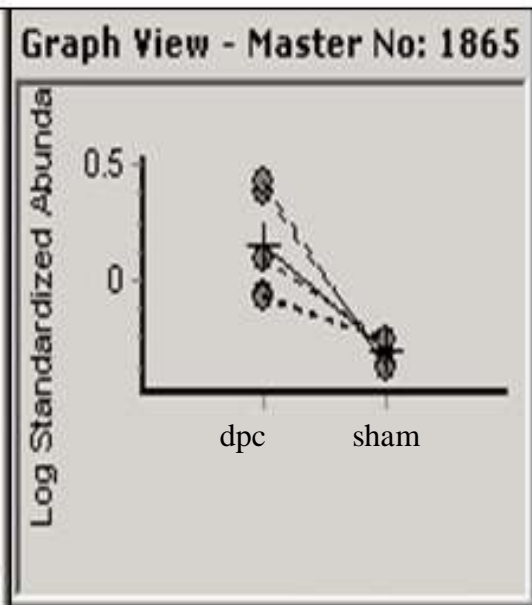


Figura-R&D13. Resultados DeCyder BVA muestran ciertas diferencias en determinados *spots*. **(A)** Visualización en 3-D del volumen un *spot* en rata-*dpc* **(B)** Visualización en 3-D del volumen del mismo *spot* en rata-*sham*. **(C)** Representación gráfica del logaritmo de la abundancia de ese *spot* entre ratas-*dpc* y ratas-*sham*.

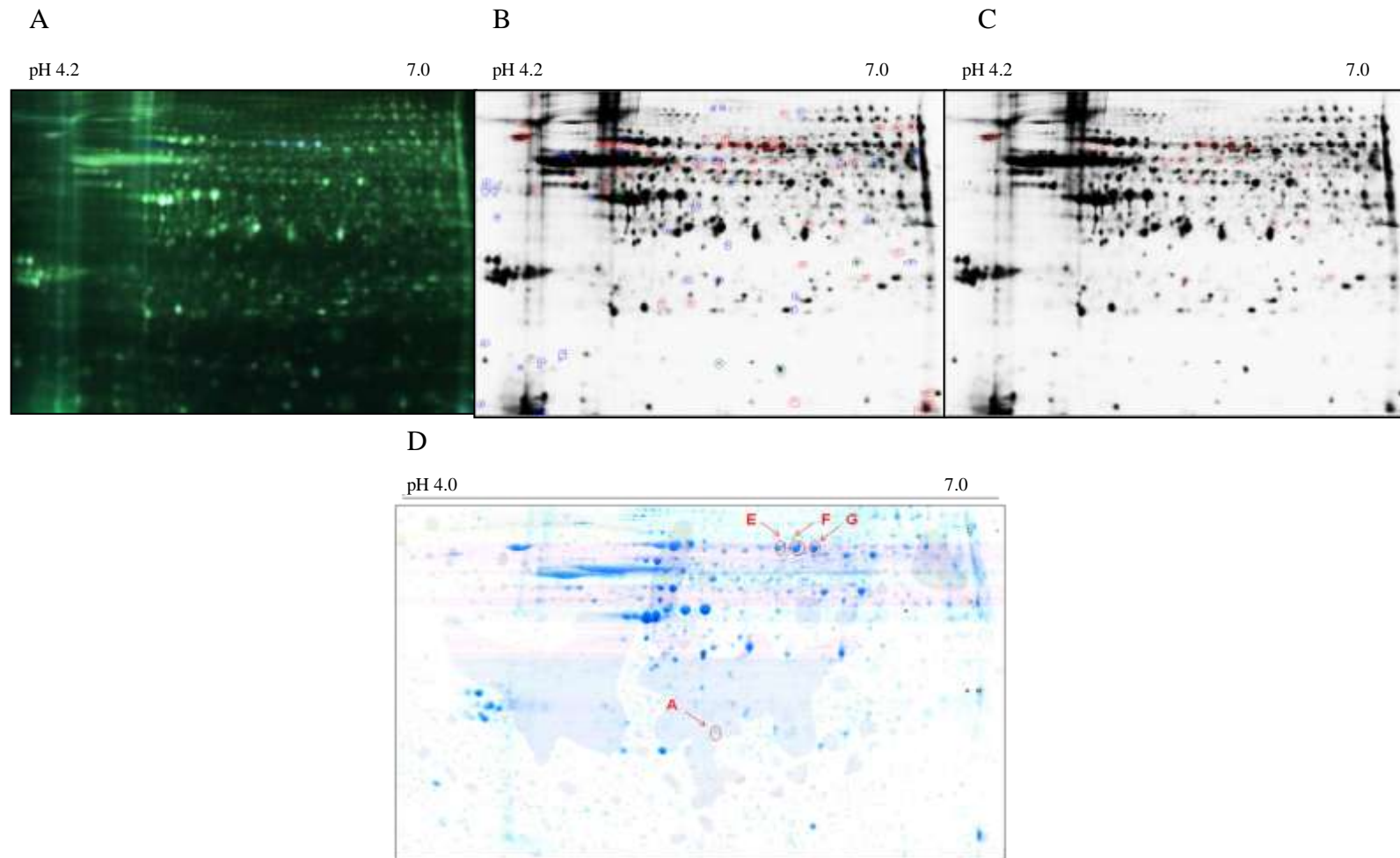


Figura-R&D14. Estudio de los *spots* con diferencias individuales. (A) Super-posición de los tres fluoróforos. Pueden apreciarse los *spots* con diferente color (azulado); (B) Mapa inicial de *spots* que presentan un incremento (azul) o una disminución (rojo) en rata-*dpc* respecto a ratas-*sham*; (C) Mapa de *spots* filtrado. Sólo aparecen en rojo los *spots* que se han comprobado que son *spots* presentes en cada par de muestras; (D) *Spots* picados en el gel preparativo (12% acrilamida) para su posterior identificación mediante espectrometría de masas.

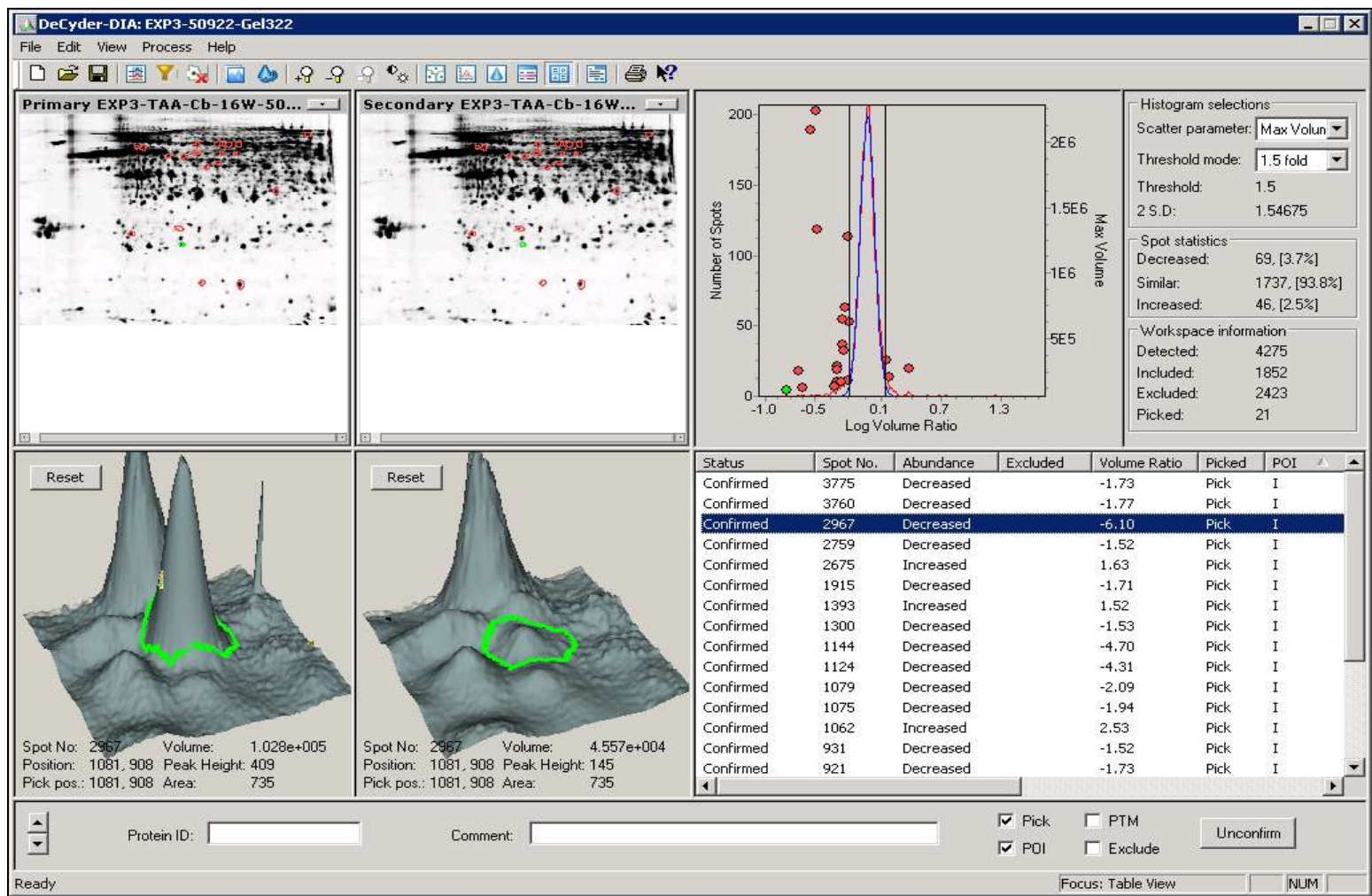


Figura-R&D15. Valores de los parámetros del spot A en DIA.

Tabla-R&D10: Abundancia relativa de los *spots* E, F y G en cada uno de los geles. (UA)

Gel 1					Gel 2			
Spot	Volumen		Máx. altura		Volumen		Máx.altura	
	C19	T28	C19	T28	C19	T28	C19	T28
E	1513000	1564000	3483	351 1	1185000	1333000	2662	3179
F	2441000	2522000	5033	515 7	1892000	2238000	3669	4354
G	2013000	2480000	5062	584 5	1605000	2089000	3624	4736

Gel 3					Gel 4			
Spot	Volumen		Máx. altura		Volumen		Máx.altura	
	C19	T28	C19	T28	C19	T28	C19	T28
E	1008000	1041000	2671	2844	1043000	1146000	2319	2616
F	1936000	2085000	3148	3635	588500	676966	2331	2981
G	1737000	2110000	3561	4335	1094000	1325000	2867	3683

Tabla-R&D11: Proteínas identificadas en las muestras DPC-8 (rata-*dpc*) y C-9 (rata-*sham*).

SPOT	Nº de acceso	Proteína identificada	Protein score	Peso molecular (Da)
E	IPI00191737	Alb Serum albumin	4846	70682
	IPI00870112	Dpysl2 Dihydropyrimidinase-related protein 2	1316	62638
F	IPI00191737	Alb Serum albumin	8820	70682
	IPI00870112	Dpysl2 Dihydropyrimidinase-related protein 2	790	62638
G	IPI00191737	Alb Serum albumin	7445	70682
	IPI00870112	Dpysl2 Dihydropyrimidinase-related protein 2	1091	62638

IV. Modificaciones post-traduccionales en el cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc*.

Los síntomas asociados a la hiperamonemia y por extensión a la EH podrían explicarse, también, por modificaciones post-traduccionales de las proteínas expresadas y sometidas a un estado de estrés oxidativo inducido por las altas concentraciones de amonio observadas en la ratas-*dpc*. Este estado de estrés oxidativo podría dar lugar a diversas modificaciones post-traduccionales oxidativas, tales como oxidación de grupos sulfhidrilos (**Bonetto and Ghezzi, 2006**), nitración de tirosinas (**Thomas et al., 2006**), y formación de grupos carbonilos (**Levine and Stadtman, 2006**). Mientras que las dos primeras son de naturaleza reversible, la última es de naturaleza irreversible y generalmente va acompañada de una pérdida de actividad de mayor o menor grado (**Stadtman, 2006; Bautista et al., 2000**). Ambos tipos podrían explicar parte de los síntomas observados en las ratas-*dpc* o con EH. Nosotros en este trabajo nos hemos centrado en el estudio de la modificación post-traduccionales oxidativa por formación de grupos carbonilos (carbonilación) dado que hasta la fecha han sido menos estudiadas que las modificaciones reversibles, además de ser actualmente abordada, en nuestro grupo, por otros compañeros(as).

Entre los diferentes métodos disponibles para estudiar la formación de grupos carbonilos (carbonilación) en las proteínas el método de la DNPH es el más sensible y preciso (**Sultana and Butterfield, 2011; Linares et al., 2010; Levine et al., 1999**), por ello este método ha sido el elegido para llevar a cabo nuestro estudio.

IV.1.- Cinética de marcaje con dinitrofenil-hidracina (DNPH).

Para establecer el tiempo más adecuado de incubación y/o marcaje de los grupos carbonilo con la DNPH, e intentar minimizar las reacciones colaterales y la saturación de las muestras, se ha realizado un estudio cinético previo. El tiempo de marcaje es importante, ya que si nos excedemos, se

marcarían todos los grupos carbonilo (aldehídos y cetonas), ya sean procedentes de la oxidación proteica, propios de las estructuras de las proteínas, como procedentes de otras moléculas celulares (ácidos nucleicos, aldehídos de bajo peso molecular), dándonos una señal intensa y saturada. Generalmente, los grupos carbonilo generados por oxidación proteica suelen determinarse en tiempos no demasiado largos de exposición al marcador, ya que al formarse post-traduccionamente están localizados sobre la superficie de la molécula, por lo que son rápidamente accesible (**Bautista et al., 2000**).

Como se aprecia en las **Figuras-R&D16**, **-R&D17** y **Tabla-R&D12**, un tiempo de incubación de unos ~5 minutos es suficiente para marcar aquellos grupos carbonilo resultantes de la oxidación. Un tiempo más prolongado, como se ha comentado con anterioridad, llevaría a la obtención de unos resultados erróneos por saturación de la señal. Por lo que hemos fijado el tiempo de incubación, inicialmente, para el marcaje en 5 min.

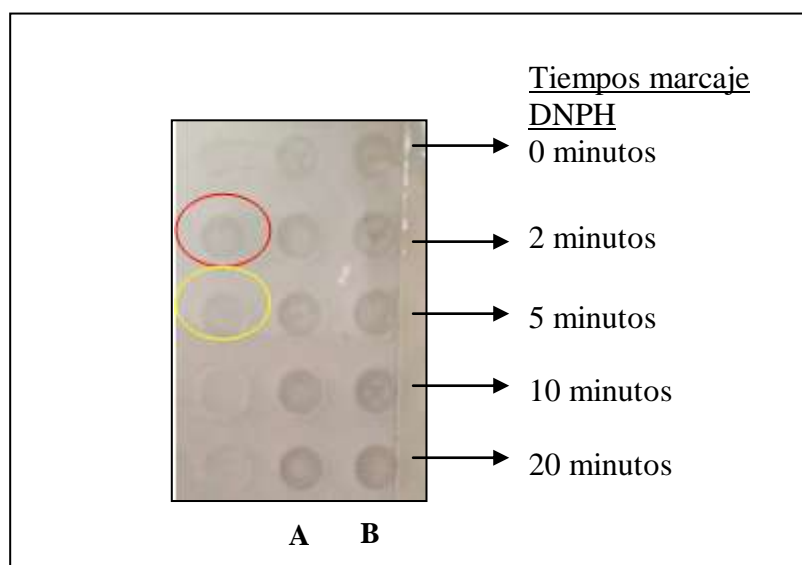


Figura-R&D16: *Inmunoblotting* con proteínas citoplasmáticas (S2) de la corteza cerebral (3µg /muestra). **A)** Ratas-*sham* (controles); **B)** Ratas-*dpc* (hiperamónémicas). Los distintos tiempos de marcaje con DNPH se indican con flechas. Los pocillos rodeados con círculos son controles negativos (sin tratar con DNPH) tanto de ratas-*sham* (círculo rojo) como de ratas-*dpc* (círculo amarillo).

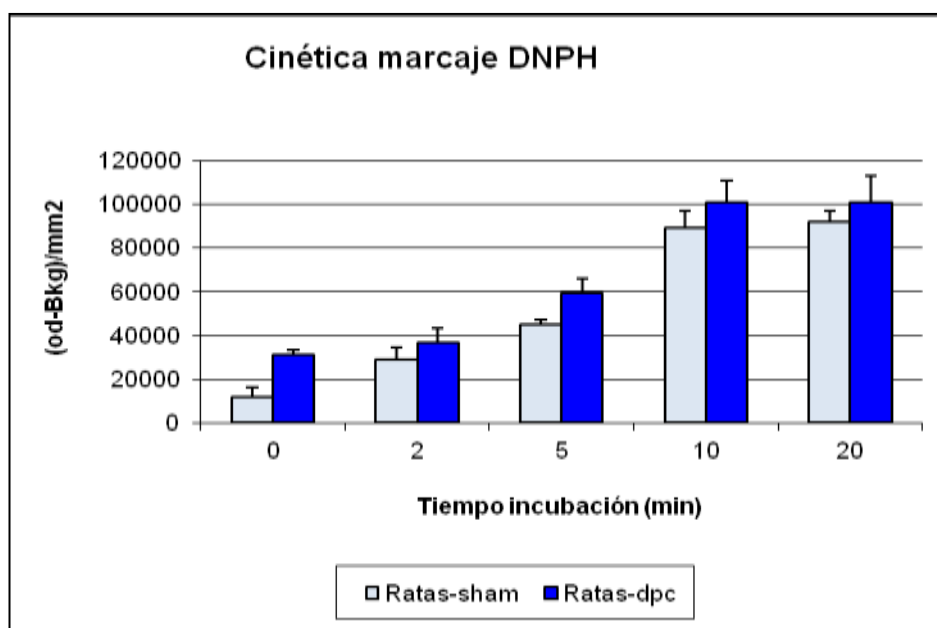


Figura-R&D17. Niveles de grupos carbonilo tanto en ratas-*sham* como en ratas-*dpc* marcados a distintos tiempos de incubación con DNP. Los datos corresponden al valor medio \pm DE de tres experimentos independientes ($p < 0,05$).

Tabla-R&D12: Valores de la cinética de marcaje con DNP a distintos tiempos.

Tiempo incubación DNP (min)	Ratas- <i>sham</i> (OD-Bkg)/mm ²	Ratas- <i>dpc</i> (OD-Bkg)/mm ²
0	12062,88	36536,61
2	29233,81	59280,66
5	44920,9	31325,45
10	89370,46	100794,06
20	92171,36	110935,52
SIN MARCAR	0,00	0,00
SIN MARCAR	0,00	0,00

Con el fin de estudiar la sensibilidad a la oxidación de las diferentes proteínas presentes en las muestras, pasamos a la separación de las diferentes proteínas mediante PAGE-SDS y a la cuantificación del contenido proteico (tinción con Coomassie) y de grupos carbonilos (marcaje con DNP).

IV.2.- Estudio previo de proteínas oxidadas: Aproximación 1D (PAGE-SDS).

Una vez establecido el tiempo de incubación para marcar los grupos carbonilos de las muestras, se procedió, como estudio previo, a analizar las distintas proteínas mediante PAGE-SDS, transferencia a membranas de nitrocelulosas y revelado de bandas de proteínas oxidadas y posterior determinación del coeficiente f_{ox} , por densitometría (**Sultana and Butterfield, 2011; Bautista et al., 2000**) en muestras de cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc*, respectivamente.

Para abordar con mayor precisión este estudio, fue necesario la realización de tres réplicas de SDS-PAGE por cada muestra: de forma que una se destinó para la tinción con azul de Coomassie compatible con el posterior análisis por MS; otra para la tinción con azul de Coomassie no-compatible (que nos proporciona idea de la cantidad de proteína debido a su mayor sensibilidad y en consecuencia, servirnos de guía para recortar las bandas en el gel citado anteriormente); y otro gel para transferirlo a la membrana de nitrocelulosa y tras su revelado seleccionar aquellas bandas con una mayor oxidación (coeficiente f_{ox}), como se muestra en la **Figura-R&D18**.

En un principio podríamos haber elegido las bandas de acuerdo a la mayor intensidad oxidativa. Sin embargo, este incremento de intensidad podría deberse a un mayor grado de oxidación de las respectivas proteínas o a una mayor expresión (mayor cantidad) de las proteínas. Por ello, para poder discriminar entre ambos casos, hemos analizado las bandas de proteína por densitometría, tanto en los geles teñidos con azul de Coomassie (medida de cantidad de proteína) como en los geles transferidos a membranas de nitrocelulosa y marcados con DNPH (medida de oxidación), definiendo el cociente, f_{ox} , para una determinada banda, como la fracción entre el valor de la intensidad (unidades DO) de una determinada banda revelada por su contenido en grupos carbonilos (DNPH) y el valor de la intensidad (unidades DO) de la

misma banda teñida por azul de Coomassie (cantidad de proteína) (f_{ox} = intensidad de grupos carbonilos/intensidad de proteínas). Este índice es una medida de la sensibilidad de la proteína a la oxidación, siendo esta mayor cuanto mayor es el factor f_{ox} (**Sultana and Butterfield, 2011; Bautista et al, 2000**).

Como se puede observar en la **Figura-R&D18**, de acuerdo con este criterio, se han encontrado al menos 6 bandas (proteínas) correspondientes a las bandas de 170, 120, 87, 54, 47 y 38 kDa, respectivamente, que muestran un índice f_{ox} claramente mayor en las muestras de ratas-*dpc*. Una vez seleccionadas las bandas por el factor f_{ox} , podría haberse procedido a su identificación por MS. Pero teniendo en cuenta que en una banda de electroforesis 1D puede haber hasta más de 700 proteínas (**Frölich et al., 2009**) decidimos dejar el proceso de identificación para más adelante, tras la realización de la separación de muestras por electroforesis 2D, mucho más potente y resolutive que la 1D, como seguidamente discutiremos.

El mayor índice de oxidación (f_{ox}) de determinadas bandas en las muestras de cerebro de ratas-*dpc* podría explicarse debido a que las altas concentraciones de amonio inducen la generación de ERO/ERN que producen la carbonilación de, al menos, 6 proteínas específicas (**Carbonero-Aguilar et al., 2011**), junto con un incremento de la peroxidación lipídica en el cerebro. El amonio podría ejercer su acción a través de diferentes rutas, tales como la activación de neutrófilos que desencadenaría la respuesta oxidativa (**Hawcross et al., 2010**), la inflamación de astrocitos (**Haussinger et al., 2000**) o la liberación de iones Ca^{2+} intracelularmente (**Rose, 2006; Rose et al, 2005**). Todas estas rutas podrían incrementar la producción de ERO fundamentalmente, y de ERN, pudiendo estar implicado este estrés oxidativo en la fisiopatología de la EH. (**Norenberg et al., 2004; Kosenko et al., 2003**).

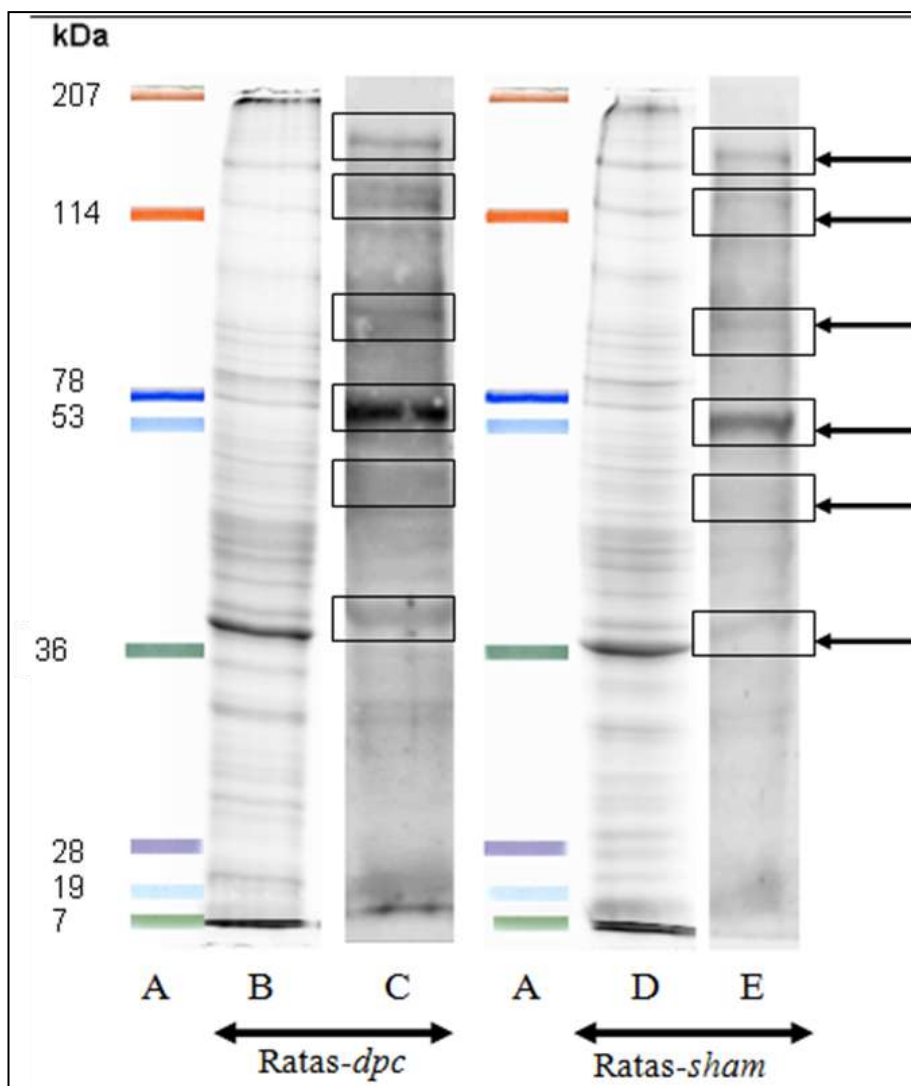


Figura-R&D18. Proteínas de cerebro de homogenado total (SDS-PAGE T12%, C3,5%) y proteínas oxidadas (5 min de marcaje con DNPH) de ratas-*dpc* y ratas-*sham*. **A)** Marcadores de peso molecular: miosina (207.3 kDa), β -galactosidasa (114.4 kDa), seroalbúmina bovina (78.4 kDa), ovoalbúmina (53.1 Da), anhidrasa carbónica (35.7 kDa), inhibidor de la tripsina de soja (28.3 kDa), lisozima (19.3 kDa), aprotinina (7 kDa); **B, C)** Proteínas de ratas-*dpc* separadas por electroforesis (12%) y teñidas con azul de Coomassie e inmunodetección de grupos carbonilo, respectivamente; **D, E)** proteínas de ratas-*sham* separadas por electroforesis y teñidas con azul de Coomassie e inmunodetección de grupos carbonilo, respectivamente.

Como ya hemos indicado anteriormente, las ratas-*dpc* tienen incrementada la concentración arterial de amonio hasta tres veces más que en el caso de las ratas-*sham*, lo que induciría un estado de estrés oxidativo. Los datos aportados de un incremento del estrés oxidativo producido por la condición de hiperamonemia incluyen (i) una producción de oxidantes activos totales, medidos como incremento en la fluorescencia del DCF en ratas-*dpc*, 2,5 veces mayor, (ii) y un incremento en la formación de biomarcadores del estrés oxidativo (peroxidación lipídica y oxidación de proteínas).

Tanto los datos encontrados para la peroxidación lipídica como los encontrados para la oxidación de proteínas están en concordancia con datos encontrados por otros autores previamente (**Widmer, 2007; Grune et al., 2003**) donde se usaron modelos experimentales similares y cultivo primario de astrocitos de rata. Sin embargo, no concuerdan con los publicados por otros investigadores recientemente y utilizando el mismo modelo que nosotros (**Yang et al., 2010**). Esta discrepancia podría explicarse o atribuirse a varios factores: i) la longitud del periodo de mantenimiento de las ratas-*dpc* (4 semanas, frente a las 6 semanas utilizadas por nosotros), ii) al uso de una cepa de rata diferente (Sprague-Dawleys frente a Wistar) y iii) al uso de tejido fresco para los análisis frente a tejidos congelados a -80°C y descongelados utilizado por ellos (**Carbonero-Aguilar, et al., 2011; Yang et al., 2010**). Además de estos factores cabe resaltar otros metodológicos, bajo nuestro punto de vista más importante, iv) la cuantificación de grupos carbonilo totales de manera espectrofotométrica respecto de la inmunológica utilizada por ellos, así como, v) a la realización del marcaje de las proteínas con DNPH en un corto período de 5 min frente a los 15 min empleados por ellos, y por último, vi) al uso del índice f_{ox} para valorar cada banda electroforética y no sólo la señal densitométrica (**Carbonero-Aguilar, et al., 2011**).

En este trabajo se muestra que el estrés oxidativo es inducido en el cerebro de ratas-*dpc* por altas concentraciones de amonio y, que como consecuencia de ello tiene lugar la carbonilación de proteínas. En relación a la

carbonilación de proteínas, en nuestro laboratorio, en trabajos anteriores (**Bautista et al., 2000**) se ha demostrado que el daño oxidativo por carbonilación en estados tempranos no necesariamente promueve la pérdida de actividad o de función en las proteínas, en contraste con otros mecanismos oxidativos tales como la oxidación de grupos sulfhidrilo o la nitración de restos de tirosina (**Norenberg, 2003**). Sólo cuando el daño oxidativo alcanza o sobrepasa un valor umbral de daño, ocurre la pérdida de función o inactivación de la proteína (**Bautista, et al., 2000; Stadtman 1992**). Lo cual no quiere decir que las modificaciones oxidativas por carbonilación no tengan lugar tempranamente, sino que lo que ocurre es que debido al valor umbral necesario no se manifiestan y por tanto pasan inadvertidas o de manera “silenciosa”. Solo cuando se alcanza el valor umbral se manifiestan, lo que a veces es una señal irreversible e irreparable, como ocurre en el caso del Parkinson y el Alzheimer (**Butterfield, 2003**). Por lo que su detección temprana puede ser un biomarcador importante para iniciar los tratamientos preventivos, fundamentalmente con antioxidantes o potenciando los sistemas antioxidantes celulares (**Bautista et al., 2000**). Esta falta de manifestación temprana de pérdida de actividad o funcionalidad podría ser la razón por la que la oxidación de proteínas por carbonilación en la HE ha sido menos estudiada que otras modificaciones post-traduccionales.

IV.3. Abordaje oxi-proteómico de la modificación post-traduccionales oxidativa (carbonilación) en cerebro de ratas-*sham* y ratas-*dpc*.

La carbonilación de proteínas se ha considerado como un biomarcador de carácter global de la oxidación de proteínas (**Dalle-Donne et al., 2003; Stadtman and Levine, 2003; Berlett and Stadtman, 1997**). La aparición de los grupos carbonilos en las proteínas puede ser debido a varias causas: **i)** la fragmentación del esqueleto peptídico, **ii)** a la abstracción de átomos de hidrógeno y carbonos α , y/o **iii)** por ataques oxidativos sobre varias cadenas de aminoácidos (lisinas, argininas, prolinas, treoninas, etc., fundamentalmente), **iv)** por la formación de aductos formados por adiciones del tipo de Michael entre

restos de histidinas, lisinas y cisteínas y alquenos reactivos (por ejemplo, HNE) o por glicación/ glicoxilación de grupos amino de lisinas (**Dalle-Donne *et al.*, 2003**).

Tradicionalmente, existen dos métodos para detectar la carbonilación de proteínas: i) por la formación de una base de Schiff con biotina-hidrácida, seguido de la detección de la unión de la imina formada a la proteína con avidina o estreptavidina unida a un fluoróforo o a una enzima; o ii) por derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina, seguido de detección inmunológica utilizando un anticuerpo primario anti-hidrazona (**Sultana and Butterfield, 2011**) (**Figura-R&D19**), que es la elegida en el presente trabajo.

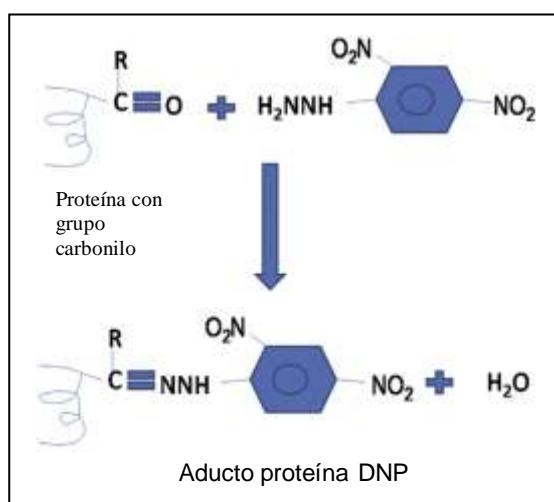


Figura-R&D19. Derivatización de una proteína con un grupo carbonilo por la 2,4- dinitrofenilhidracina para formar una base de Schiff, la 2,4-dinitrofenilhidrazona.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en corteza cerebral y en cerebelo de ratas-*dpc* tras 6 semanas, en comparación con las correspondientes ratas controles (ratas-*sham*).

IV.4. Estudio de las alteraciones o modificaciones post-traduccionales.

IV.4.1 Estudio 2D-Oxy-blot, e identificación de proteínas oxidadas en corteza cerebral de ratas-*sham* y ratas-*dpc*.

Para investigar/analizar el daño causado a las proteínas por los radicales libres y cual o cuales proteínas eran más vulnerables al estrés oxidativo generado por el estado de hiperamonemia en la corteza cerebral de ratas -*dpc* tras 6 semanas, se ha estudiado la detección y cuantificación de grupos carbonilos (carbonilación) en las proteínas mediante inmunodetección, previa separación en electroforesis bi-dimENSIONAL (2D), transferencia a membrana (*Wester-blotting*) y post-derivatización con DNPH.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura-**R&D20** y se resumen en la **Tabla-R&D13**. Como más abajo discutiremos estas proteínas, en la corteza, pueden agruparse en diferentes grupos: proteínas relacionadas con el metabolismo (27%), proteínas de unión (13%), proteínas relacionadas con el transporte de vesículas (7%), proteínas relacionadas con el citoesqueleto (33%), proteínas implicadas en la regulación génica (13%), proteínas implicadas en el recambio (degradación; 7%) (**Figura-R&D21**).

Tabla-R&D13. Proteínas oxidadas diferencialmente en la corteza cerebral de ratas-*dpc* a las 6 semanas.

Nº SPOT	Nº de acceso	Proteína identificada	Protein score	Punto isoeléctrico (pI)	Peso molecular (Da)
3	gi 149032469	guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	453	5.18	40613.1
29	gi 62078893	ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	252	5.36	118910.4
37	gi 1000439	grp75	706	5.87	73983.9
31	gi 149054035	aminopeptidase puromycin sensitive	265	5.24	93358.2
38	gi 78365255	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	249	8.76	67636.6
45	gi 45737866	mitochondrial aldehyde dehydrogenase precursor	410	6.69	56079.4
30	gi 209862801	alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	521	5.41	107521.5
48	gi 157820845	elongation factor Tu, mitochondrial precursor	669	7.23	49890.1
49	gi 38181948	Glul protein	454	6.47	42982.6
39	gi 13489067	vesicle-fusing ATPase	352	6.55	83170.2
40	gi 9506811	alpha-internexin	804	5.2	56252.7
41	gi 9506811	alpha-internexin	886	5.2	56252.7
55	gi 149017236	rCG49429	450	5.33	25374.7
54	gi 149065791	septin 3, isoform CRA_a	152	6.04	34509.5
56	gi 19909845	CDCrel-1AI	291	6.21	42486.6
47	gi 149060015	rCG53214, isoform CRA_a	340	6.23	49441.1

Protein ScoreCI%=100. Especie *Rattus norvegicus*

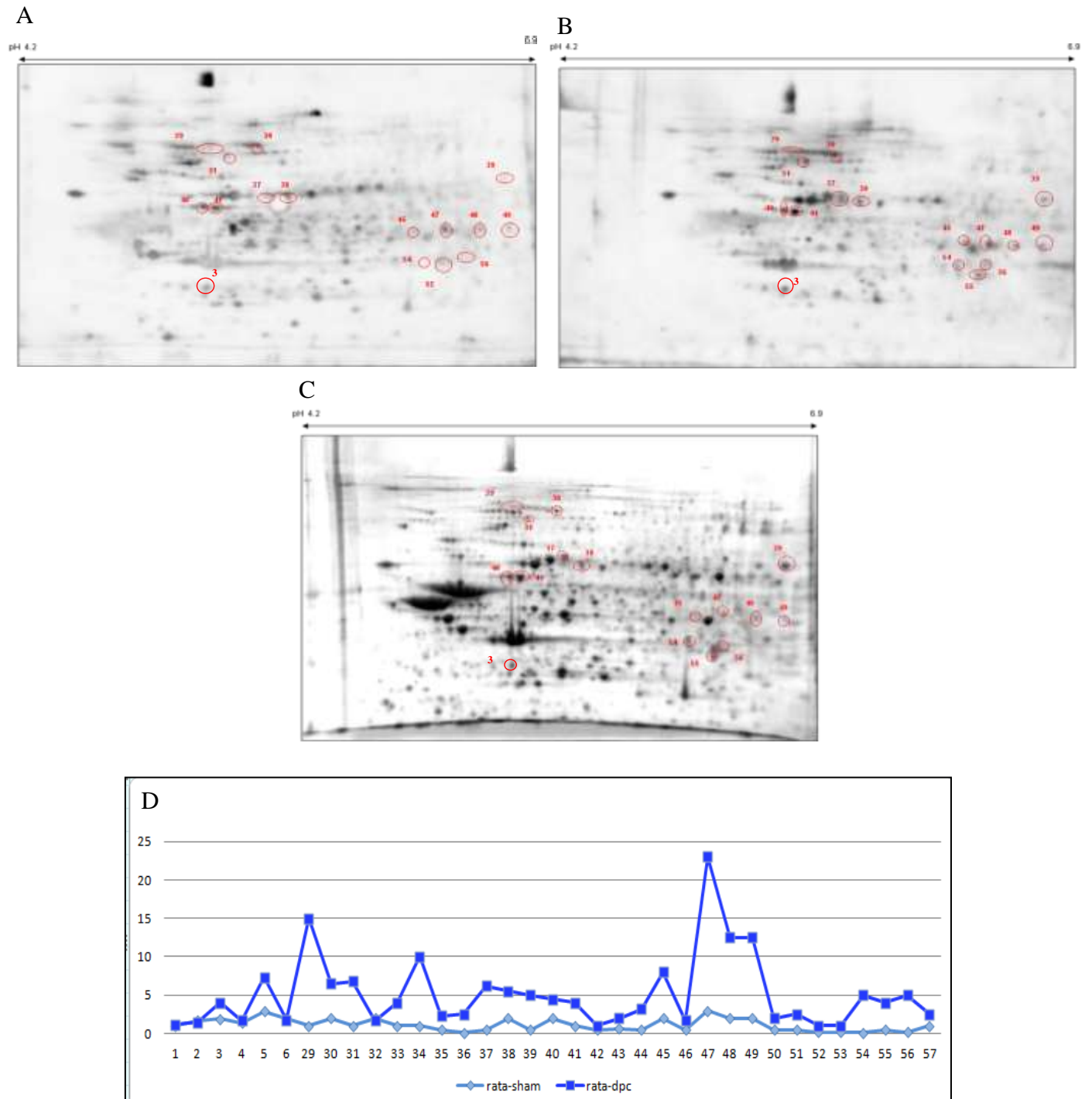


Figura-R&D20. Análisis representativo de 2D-Oxyblot de proteínas de corteza cerebral de ratas-*dpc* de 6 semanas. **(A)** Oxiblot de ratas-*sham* de 6 semanas; **(B)** Oxiblot de ratas-*dpc* de 6 semanas; **(C)** 2D-Electroforesis de ratas-*sham* de 6 semanas (150 µg; teñidos con Sypro-Ruby); **(D)** Cociente de oxidación f_{ox} de 16 *spots* oxidados en corteza. Los círculos en rojo indican los *spots* con diferencias en el cociente f_{ox} estadísticamente significativos (cociente > 1,5) entre las muestras de ratas-*sham* y ratas-*dpc*. Para el análisis se utilizaron tiras de isoelectroenfoco de 13 cm y pH 4-7.

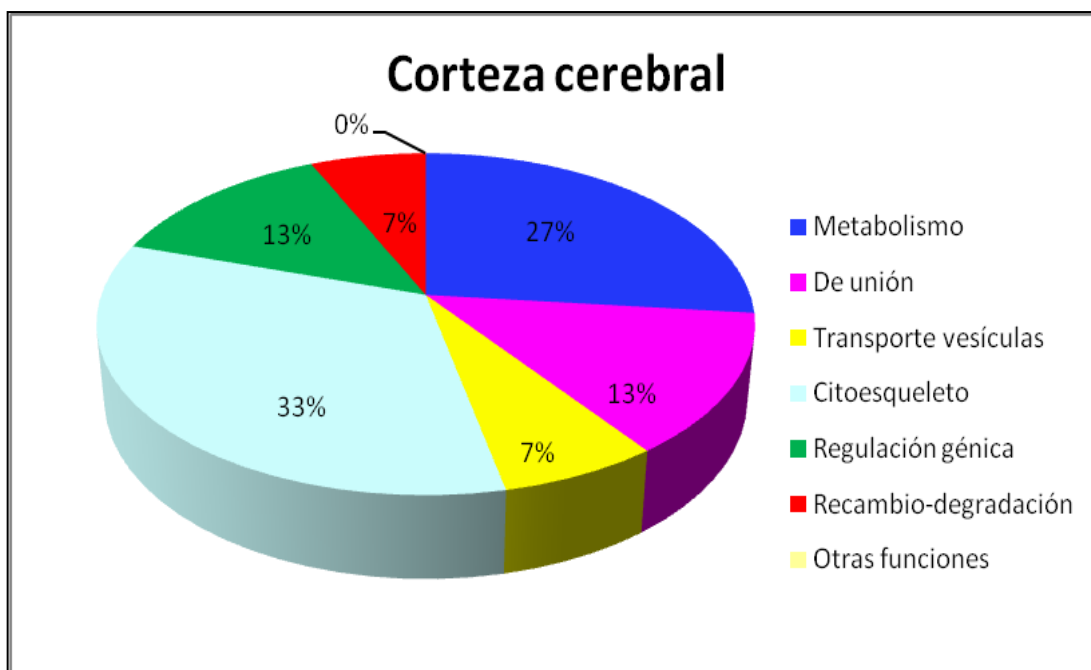


Figura-R&D21. Clasificación de las proteínas identificadas en corteza cerebral de ratas-*dpc* según su relación con diferentes funciones celulares.

Seguidamente discutiremos el papel o función de cada una de estas proteínas, haciendo especial hincapié en su posible relación con la fisiopatología de la EH asociada a hiperamonemia.

- Subunidad α (o G_0) de la proteína G

La **subunidad α (o G_0) de la proteína G** (*guanine nucleotide-binding protein Go subunit alpha*) forma parte de la proteína G. La proteína G está implicada en la ruta de señalización intracelular como segundo mensajero. La proteína G está formada por tres subunidades: α , β y γ . La subunidad α o G_0 está implicada/relacionada con la unión a proteínas y es por donde la proteína G se une a los nucleótidos de guanina. En su estado inactivo tiene unido guanosina di-fosfato (GDP). Cuando una señal llega a través de receptores de proteína G, se induce un cambio conformacional en el receptor que hace que la proteína G que estaba unida por el dominio intracelular del receptor, intercambie el GDP por guanosina trifosfato (GTP). Ahora, en su estado activo,

la subunidad α se suelta para activar a una diana, generalmente la guanilato ciclasa. Para volver a su estado inactivo, el GTP se hidroliza a GDP ya sea por la propia subunidad α o bien por otras proteínas reguladoras de proteína G o a veces por la propia diana que activan.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D22**.

1	MKIIHEDGFS	GEDVKQYKPV	VYSNTIQSLA	AIVRAMDTLG	VEYGDKERKA
51	DSKMVCDVVS	RMEDTEPFS	ELLSAMRLW	GDSGIQECFN	RSREYQLNDS
101	AKYYLDSLDR	IGAADYQTE	QDILRTRVKT	TGIVETHFTF	KNLHFRFLDV
151	GGQRSEKRW	IHCFEDVTAI	IFCVALSQYD	QVLHEDETTN	RMHESLMLFD
201	SICNKKFFID	TSIILFLNKK	DLFGEKIKKS	PLTICFPEYP	GSNTYEDAAA
251	YIQTFESKN	RSPNKEIYCH	MTCATDTNNI	QVWFDAVTDI	IIANNLRGCG
301	LY				

Figura-R&D22. Secuencia peptídica de la subunidad G_0 de la proteína G. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del *spot* nº3 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 48% (144 de 302 aminoácidos).

La proteína G regula enzimas metabólicos, canales iónicos, transportadores, participa en el control de la transcripción, motilidad, contractilidad y secreción, lo cual la hace partícipe de funciones tales como desarrollo embrionario, aprendizaje y memoria u homeostasis.

La relación de esta proteína con el estado de hiperamonemia, y por tanto con la EH puede ser diversa ya que participa a nivel de muchas rutas de señalización celular:

i) En el Sistema GABA/Benzodiazepina/Glutamato.

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central. Las benzodiazepinas comparten el mismo receptor (receptor periférico de benzodiazepinas) en el cerebro que GABA, el cual media su acción a través de proteína G (**Figura-R&D23**). Los niveles de éste receptor se encuentran elevados en enfermos con EH (**Faint, 2009**). Este incremento genera un aumento en la síntesis de neuroesteroides, que a su vez, son potentes

moduladores de la actividad de los receptores GABA_A. Todo ello podría explicar el incremento en el tono gabaérgico encontrado en la EH.

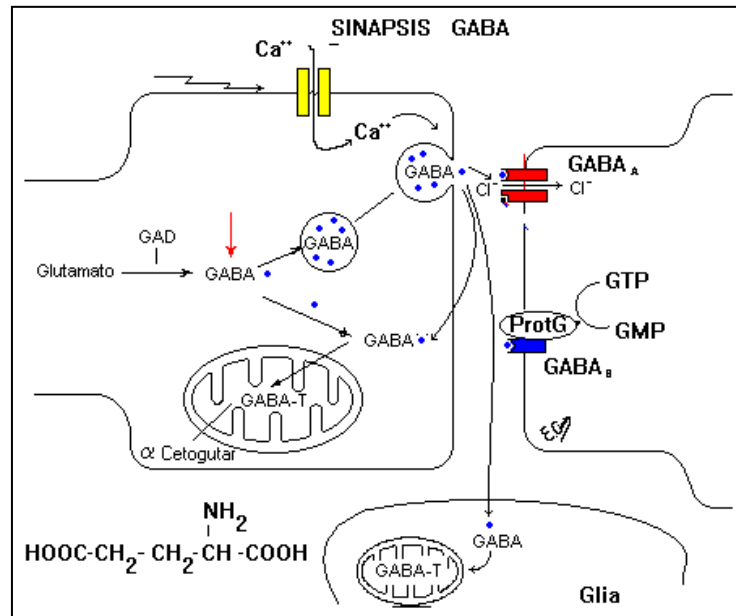


Figura-R&D23. Esquema de los receptores metabotrópicos e ionotrópicos de GABA. Ca₂⁺: ión calcio; GAD: glutamato descarboxilasa; GABA: ácido γ-aminobutírico; Cl⁻: ión cloruro; GTP. guanósín trifosfato; GMP: guanósín monofosfato.

El glutamato, es un neurotransmisor excitador. Cuando es liberado, en un proceso dependiente de calcio, por la neurona pre-sináptica, activa a los receptores NMDA y no-NMDA (ambos canales de iones), los cuales permiten que entre Na⁺ y Ca²⁺ y la activación de receptores acoplados a proteína G. El glutamato es recaptado del ambiente extracelular por transportadores localizados en los astrocitos y en las neuronas, donde se transforman a glutamina mediante la glutamina sintetasa. El transporte de glutamato está acoplado al transporte de Na⁺/K⁺. Existen cuatro transportadores de alta afinidad en el sistema nervioso central (SNC): EAAT1 (GLAST) y EAAT2 (GLT-1), específicos de astrocitos; EAAT3 y EAAT4, específicos de neuronas. En pacientes con EH los niveles intracelulares son decrecientes, pero los niveles extracelulares son crecientes, lo que sugiere que la recaptación del glutamato está inhibida. Esto se traduce en una alteración en el sistema glutamina/

glutamato. Además, la hiperamonemia se ha sugerido que participa en el edema (*swelling* o hinchazón) de los astrocitos, (principales centros de síntesis de glutamina a partir de amonio y glutamato), los cuales juegan un papel importante en la neurotransmisión de señales. Si existe edema en los astrocitos, se desencadenan una serie de procesos como: **a)** disminución de la concentración de osmolitos (como el mio-inositol), **b)** incrementos en la expresión de canales acuosos (aquaporina IV), **c)** acumulación de glutamina (aumento del cociente glutamina/glutamato), **d)** incremento del pH en vesículas endosomales y **e)** sobre-regulación de los receptores periféricos de benzodiazepinas, entre otros, que incrementa la producción del sistema gabaérgico (**Häussinger et al., 2000**)

ii) En el edema (*swelling*) de los astrocitos.

Este proceso está mediado por proteínas de la familia de las MAPs kinasas (de la familia Erks; *Mitogen-activated protein kinases*) en una ruta dependiente de fosfatidil-inositol cuya cadena de señalización celular está mediada por proteína G. Cuando ocurre edema en los astrocitos una consecuencia clínica es el incremento de la presión intracraneal. Además, a nivel celular, la cadena de señalización activada produce cambios como el aumento de la concentración del Ca^{2+} intracelular, se incrementa la expresión de los receptores periféricos de benzodiazepinas, afectándose múltiples canales de iones y transportadores de aminoácidos, y se detecta un incremento en la síntesis de neuroesteroides, que son potentes moduladores de la actividad de los receptores $GABA_A$, lo que podría explicar o sería una de las causas por las que el tono gabaérgico se encuentra incrementado en la EH. Todo ello llevaría a las alteraciones en la comunicación neurona-astrocito/glia-neurona. Dado el importante papel de un pH bajo (ácido) endosomal para el transporte de ligandos mediado por receptores, la significativa alcalinización que tiene lugar como respuesta al hinchamiento de los astrocítico cabría esperar que afectara a la distribución (densidad) de los receptores y al procesamiento de los neurotransmisores (**Häussinger et al., 2002**). La alcalinización ó subida de pH citosólico conduce al incremento de liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático, lo que resulta en una mayor tasa de liberación de los neurotransmisores como el glutamato y de aquellas moléculas como receptores

que viajen en el interior vesicular, afectándose la comunicación del sistema nervioso central (**Rosse et al., 2005**).

- Enzima activadora de la ubiquitina (E1).

La enzima activadora de la ubiquitina (E1) forma parte de sistema de degradación proteica ubiquitina dependiente o sistema del proteasoma (**Lee and Schindelin, 2008; Scheffner et al., 1995**). Las proteínas para ser degradadas por el sistema del proteosoma o bien deben estar marcadas con 4 residuos de ubiquitina en cadena, con la ayuda de tres enzimas: E1, E2 y E3, o bien el proteasoma reconoce ciertos motivos (secuencias) en la estructura de las proteínas que van a ser degradadas. La E1 se encarga de hidrolizar el ATP y adenilar una molécula de ubiquitina para luego transferirse al centro activo de E1 donde existe una cisteína, coincidiendo con la adenilación de la segunda ubiquitina La primera ubiquitina adenilada se transfiere a una cisteína de la E2 (enzima conjugadora de la ubiquitina) y, por último, E3 (ligasa de ubiquitina) reconoce la proteína específica a ser ubiquitinizada y cataliza la transferencia de la ubiquitina de E2 a la proteína específica.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D24**.

En presencia de niveles moderados de amonio, la actividad proteolítica de los lisosomas está inhibida y la actividad del proteasoma va a depender del grado o balance entre un umbral de daño-degradación. Esta podría ser la causa de la acumulación de los pigmentos de lipofusina en los astrocitos, otra característica presente en los astrocitos (**Grune et al., 2004**), ya que estos son compuestos oxidados que se acumulan y el proteasoma no actúa sobre ellos, salvo que se sobrepase el citado umbral.

```

1  MSSSPLSKKR  RVSGPDKPG  SNCSSAQSVL  SEVSSVPTNG  MAKNGSEADI
51  DESLYSRQLY  VLGHEAMKML  QTSSVLVSGL  RGLGVEIAKN  IILGGVKAFT
101 LHDQGTQWA  DLSSQFYLR  EDIGKNRAEV  SQPRLAELNS  YVPVTAYTGP
151 LVEDFLSGFQ  VVVLTNSPLE  EQLRVGEFCH  SRGIKLVVAD  TRGLFGQLFC
201 DFGEEMVLTD  SNGEQPLSAM  VSMVTKDNPG  VVTCLEARH  GFETGDFVSF
251 SEVQGMVQLN  GCQPIEIKVL  GPYTFSICDT  SNFSDYIRGG  IVSQVKVPPK
301 ISFKSLPASL  AEPDFVMTDF  AKYSRPAQLH  IGFQALHQFC  AQHNRPPRPR
351 NEEDATELVT  LAQAVNARSP  PAVQQDNVDE  DLIRKLAYVA  AGDLAPINAF
401 IGGLAAQEVN  KACSGKFMPI  MQWLYFDAL  CLPEDKEALT  EDKCLPRQNR
451 YDQVAVVFGS  DLQEKLGKQK  YFLVGAGAIG  CELLKNFAMI  GLGCGEGGEV
501 VVTDMDTIEK  SNLNRQFLFR  PWDVTKLKSD  TAAAAVRQMN  PYIQVTSHQN
551 RVGPDTERIY  DDDFQQLDG  VANALDNVDA  RMYMDRRCVY  YRKPLLESST
601 LGTKGNVQVV  IPFLTESYSS  SQDPPEKSIP  ICTLKNFPNA  IEHTLQWARD
651 EFEGFLKQPA  ENVNQYLTD  KFVERTLRLA  GTQPLEVLEA  VQRSLVLQRP
701 QTWGDCVTWA  CHHWHTQYCN  NIRQLLHNFP  PDQLTSSGAP  FWSGPKRCPH
751 PLTFDVNNTL  HLDYVMAAAN  LFAQTYGLTG  SQDRAAVASL  LQSVQVPEFT
801 PKSGVKIHVS  DQELQSANAS  VDDSRLEELK  ATLSPDKLP  GFKMYPIDFE
851 KDDDSNFHMD  FIVAASNLR  ENYDISPADR  HSKSLIAGKI  IPAIATTTAA
901 VVGLVCLELY  KVVQGHQQLD  SYKNGFLNLA  LPFFGFSEPL  AAPRHQYINQ
951 EWTLWDRFEV  QGLQPNGEEM  TLKQFLDYFK  TEHKLEITML  SQGVSMLYSF
1001 FMPAAKLKER  LDQPMTEIVS  RVSKRKLGRH  VRALVLELCC  NDESGEDVEV
1051 PYVRYTIR

```

Figura-R&D24. Secuencia peptídica de la enzima activadora de la ubiquitina(E1). Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del *spot* nº29 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 23% (243 de 1058 aminoácidos).

- Grp75 (proteína regulada por glucosa).

La Grp es una proteína mitocondrial de estrés de choque térmico (*heat shock protein*, hsp) perteneciente a la familia de hsp70. Participa en el plegamiento y ensamblaje de proteínas en el interior mitocondrial (**Mizzen et al., 1991**). En condiciones normales en la célula, las proteínas hsp se producen frente a situaciones de estrés, en presencia de tóxicos o bajo cualquier circunstancia o agente que pueda alterar el ensamblaje y el plegamiento de las proteínas en la célula. La familia de proteínas hsp70 participa en el proceso de maduración de las proteínas (síntesis, ensamblaje y transporte post-traduccionales), es lo que se conoce como proteína chaperona, cuyo buen funcionamiento es clave para la correcta funcionalidad de la proteína sintetizada. Todas ellas tienen la capacidad de unión al ATP.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D25**.

```

1  MISASRAAAA RLVGTTASRS PAAARHQDGW NGLSHEAFRF VSRRDYASEA
51  IKGAVVGIDL GTNSCVAVM EGKQAKVLEN AEGARTTPSV VAFTPDGERL
101 VGMPAKRQAV TNPNTFYAT KRLIGRRYDD PEVQKDTKNV PFKIVRASNG
151 DAWVEAHGKL YSPSQIGAFV LMKMKETAEN YLGHTAKNAV ITVPAYFNDS
201 QRQATKDAGQ ISGLNVL RVI NEPTAAALAY GLDKSEDKVI AVYDLGGGTF
251 DISILEIQKG VFEVKSTNGD TFLGGEDFDQ ALLRHIVKEF KRETGVDLTK
301 DNMALQRVRE AAEKAKCELS SSVQTDINLP YLTMDASGPK HLMNKLTRAQ
351 FEGIVTDLIK RTIAPCQKAM QDAEVSKSDI GEVILVGGMT RMPKVQQTVQ
401 DLFGRAPSKA VNPDEAVAIG AAIQGGVLAG DVTDVLLLDV TPLSLGIETL
451 GGVFTKLINR NTTIPTKKSQ VFSTAADGQT QVEIKVCQGE REMAGDNKLL
501 GQFTLIGIPP APRGVPQIEV TFDIDANGIV HVSADKGTG REQQIVIQSS
551 GGLSKDDIEN MVKNAEKYAE EDRRKKERVE AVNMAEGIIH DTETKMEEFK
601 DQLPADECNK LKEEISKMRE LLARKDSETG ENIRQAASSL QQASLKL FEM
651 AYKKMASERE GSGSSSTGEQ KEDQKEEKQ

```

Figura-R&D25. Secuencia peptídica de la proteína Grp 75. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del *spot* n°37 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 49% (333 de 679 aminoácidos).

- Aminopeptidasa sensible a puromicina.

Las aminopeptidasas sensibles a puromicina son un grupo de proteasas relacionadas con la formación de péptidos ricos en glutamina (poliglutaminas). En ciertas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington, aparecen péptidos insolubles y potencialmente tóxicos, denominados, poliglutaminas, que son repeticiones de 6-35 veces de grandes secuencias de restos de glutamina. Estas poliglutaminas pueden ser degradadas, en primer lugar, por el proteasoma y, posteriormente, los péptidos resultantes por otras peptidasas, donde en primer lugar actúan endopeptidasas y luego aminopeptidasas como la aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA). La PSA es una metaloproteasa dependiente de Zn^{2+} , presente en el cerebro de mamíferos. Participa en el metabolismo de neuropéptidos, regulación del ciclo celular, presentación de péptidos antigénicos en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase I (MHC-I) y en la hidrólisis de productos

proteasomales a amino ácidos. Reconoce el residuo N-terminal del péptido con preferencia sobre aminoácidos hidrofóbicos o básicos (**Bhutani et al., 2007**). Existen trabajos que relacionan a esta proteína con otras funciones, así el grupo de *Osada* ha descrito que en ratones knockout homocigotos PSA se desarrollaba enanismo y desequilibrio en la función reproductora en ambos sexos (**Osada et al. 2001a, b**); además estos mismo investigadores, previamente, encontraron alteración en la actividad motora, incremento en la ansiedad y desequilibrio en la respuesta al dolor en ratones deficientes en PSA (**Osada et al., 1999**). Quizás estos comportamientos y anormalidades neurológicas estén relacionadas con el fallo en el metabolismo de las poliglutaminas.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D26**.

```

 1 MNCADIDIIT ASYAPEGDEE IHATGFNYQN EDEKVTLSPF STLQTGTGTL
 51 KIDFVUGELND KMKGFYRSRY TTPAGEVRYA AVTQFEATDA RRAFPCWDEP
101 AIKATFDISL VVPKDRVALS NMNVIDRKPY PDDENLVEVK FARTPVMSTY
151 LVAFVVGGEYD FVETRSKDGV CVRVYTPVGK AEQGFALFV AAKTLPFYKD
201 YFNVPYPLPK IDLIAIADFA AGAMENWGLV TYRETALLID PKNSCSSSRQ
251 WVALVVGHEL AHQWFGNLVT MEWTHLWLN EGFASWIEYL CVDHCFPEYD
301 IWTQFVSADY TRAQELDALD NSHPIEVSVG HPSEVDEIFD AISYSKGASV
351 IRMLHDYIGD KDFKKGMNMY LTKFQOKNAA TEDLWESLES ASGKPIAAVM
401 NTWTKQMGFP LIYVEAEQVE DDRVLKLSQK KFCASGPYVG EDCPQWMVPI
451 TISTSEDPNQ AKLKILMDKP EMSVVLKNVK PDQWVKLNLG TVGFYRTQYS
501 SAMLESLLPG IRDLSPVPD RLGLQNDLFS LARAGIISTV EVLKVMEAFV
551 NEPNYTVWSD LSCNLGILST LLSHTDFYEE IQEFVKDVFS PIGERLWDP
601 KPGEGLDAL LRGLVLGKLG KAGHKATLEE ARRRFKEHVE GKQILSADLR
651 SPVYLTVLKH GDGTTLDIML KLHKQADMQE EKNRIERVLG ATLSPELIQK
701 VLTFALSEEV RPQDTVSVIG GVAGGSKHGR KAAWKFIKDN WEELYNRYQG
751 GFLISRLIKL SVEGFAVDKM AGEVKAFFES HPAPSAERTI QCCENILLN
801 AAWLKRDAAS IHQYLLQRKA SPPSV

```

Figura-R&D26. Secuencia peptídica de la aminopeptidasa sensible a purinomicina. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del *spot* n°31 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 25% (206 de 825 aminoácidos).

- Dihidrolipoil lisil acetiltransferasa.

La dihidrolipoil lisil acetiltransferasa (DLAT) es la unidad E2 del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa. Éste, a su vez, está formado por las unidades E1 y E3 que son la piruvato deshidrogenasa acetiltransferasa y la dihidrolipoil deshidrogenasa (DLD), respectivamente. El complejo multienzimático realiza la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetato, utilizando como co-factor la tiamina difosfato, desprendiéndose dióxido de carbono. Cataliza una reacción irreversible en los tejidos animales que es previa y necesaria para incorporar los glúcidos al ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarbónicos. El metabolismo aerobio del piruvato mediante el ciclo de Krebs y su posterior continuación con la cadena de transporte de electrones producen más energía que si el piruvato siguiera una ruta anaeróbica con su conversión a lactato ó etanol. Podríamos pensar que el mal funcionamiento de esta enzima está relacionado con el desequilibrio del balance energético, con el aumento en la síntesis de glucógeno y la disminución en el proceso glucolítico que se encuentra en el estado hiperamonémico (**Zamora et al., 1973**).

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D27**.

La unidad E2 cataliza la reacción de transferencia de un grupo acetilo desde la enzima N(6)-(S)-acetilhidrolipoil)lisina al acetil-CoA, es decir, la transferencia del grupo acetilo al CoA. Se conoce que los pacientes con cirrosis primaria biliar presentan auto-anticuerpos contra la DLAT (la cirrosis primaria biliar se caracteriza por la obstrucción inflamatoria del conducto biliar).

Otro aspecto interesante de ser comentado sería la posible relación entre el glutamato-ciclo de Krebs-piruvato deshidrogenasa. Uno de los sustratos aportados para el ciclo de Krebs sería el acetato, producto de la piruvato deshidrogenasa. Por otra parte, el α -cetoglutarato es un producto intermediario de este ciclo, el cual es necesario para la síntesis de glutamato y a su vez el glutamato es uno de los sustratos de la glutamina sintetasa del astrocito. Con todo ello se podría decir que tanto la piruvato deshidrogenasa

como la glutamina sintetasa son enzimas que se afectan por el estado oxidativo generado por el estado de hiperamonemia, afectando también a la relación que se podría establecer entre ellas.

1	MWRVCARRVQ	SAVPRAGFRA	RWATLKGPRT	GPAAVRCGSG	IPSYGVRSLC
51	GWSYGSATVP	RNRILQQLLG	SPSRRSYSLP	PHQKVPLPSL	SPTMQAGTIA
101	RWEKKEGEKI	SEGDLIAEVE	TDKATVGFES	LEECYMAKIL	VPEGTRDVPV
151	GSIIICITVEK	PQDIEAFKNY	TLDSATAATQ	AAPAPAAAPA	AAPAAPSASA
201	PGSSYPVHMQ	IVLPALSPTM	TMGTVQRWEK	KVGEKLSEGD	LLAEIETDKA
251	TIGFEVQEEG	YLAKILVPEG	TRDVPLGTPL	CIIVEKQEDI	AAFADYRPT
301	VTSLKQAPP	PVPPPVAAVP	PIPQPLAFTP	SAAPAGPKGR	VFVSPLAKKL
351	AAEKGIDLTQ	VKGTGPEGRI	IKKDIDSFVP	TKAAPAAAAA	APPGPRVAPT
401	PAGVFIDIPI	SNIRRVIAQR	LMQSKQTIPH	YYLSVDVNMG	EVLVVRKELN
451	KMLEGK GKIS	VNDFIIKASA	LACLKVPEAN	SSWMDTVIRQ	NHVVDVSVAV
501	STPAGLITPI	VFNAHIKLE	TIASDVVSLA	SKAREGKLPQ	HEFQGGFTI
551	SNLGMFGIKN	FSAIINPPQA	CILAIGASED	KLIPADNEKG	FDVASVMSVT
601	LSCDHRVVDG	AVGAQWLAEF	KKYLEKPVTM	LL	

Figura-R&D27. Secuencia peptídica de la dihidrolipoilil acetiltransferasa. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del spot nº38 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 26% (164 de 632 aminoácidos).

El edema producido en los hepatocitos y en los astrocitos como consecuencia del estado de hiperamonemia conduce a un aumento de la síntesis de glucógeno e inhibe la glucólisis, esto explicaría el incremento en los depósitos de glucógeno encontrados en el hígado de ratas en los modelos animales de EH crónica (**Zamora et al., 1973**).

- Precursor de la aldehído dehidrogenasa mitocondrial.

La aldehído deshidrogenasa cataliza la oxidación de acetaldehído a ácido acético. Se concentra, mayormente en el hígado, pero existe en otros tejidos como el cerebro. La isoenzima 2, mitocondrial, participa en el metabolismo del alcohol, y es fundamental para mantener los niveles sanguíneos de acetaldehído. El intermediario que se forma es tóxico cuando los niveles que se alcanzan son elevados o cuando las rutas para eliminarlos

están bloqueadas. En ese caso, cuando se acumula se generan síntomas cómo náuseas, dolor de cabeza, vómitos, palpitaciones, serían lo que vulgarmente se conoce con el nombre de “resaca”. La población oriental presenta una baja tolerancia al alcohol debido a una mutación en esta enzima (un residuo de lisina por un glutamato en el sitio activo en la posición 487). Si bien su relación con la hiperamonemia y por ende con la EH no esta clara.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D28**.

1	RRGPRLSRL	SAAATSAVPA	PNQQPEVFCN	QIFINNEWHD	AVSKKTFPTV
51	NPSTGEVICQ	VAEGNKEDVD	KAVKAARA AAF	QLGSPWRR MD	ASDRGRLLYR
101	LADLIERDRT	YLAALETLDN	GKPYVISYLV	DLDMVLKCLR	YYAGWADKYH
151	GKTIPIDGDF	FSYTR HEPVG	VCGQIIPWNF	PLLMQAWK LG	PALATGNVVV
201	MKVAEQTPLT	ALYVANLI KE	AGFPPGVVNI	VPGFPTAG	AIASHEDVDK
251	VAFTGSTEVG	HLIQVAAGSS	NLKRVTLELG	GKSPNIIMSD	ADMDWAVEQA
301	HFALFFNQGQ	CCCAGSR TFV	QEDVYDEFVE	RSVARAKSRV	VGMPFDSRTE
351	QGPQVDETQF	KKILGYIKSG	QQEGAKLLCG	GGAAADR GYF	IQPTVFGDVK
401	DGMTIAKEEI	FGPVMQILKF	KTIEEVVGRA	NNSKYGLAAA	VFTKDL DKAN
451	YLSQALQAGT	VMINCYDVFG	AQSPFGGY KM	SGSGRELGEY	GLQAYTEVKT
501	VTVKVPQKNS				

Figura-R&D28. Secuencia peptídica del precursor de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del *spot* n°45 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 36% (184 de 510 aminoácidos).

- ARNt–alanina sintetasa.

La ARNt-alanina sintetasa es una enzima citoplasmática que se encarga de unir el aminoácido alanina al ARN transferente (ARNt). Su relación con la hiperamonemia y por ende con la EH no esta clara.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D29**.

1	MDSTLTAREI	RERFINYFKR	NEHTYVHSSA	TIPLDDPTLL	FANAGMNQFK
51	PIFLNLTVDPS	HPMAKLSRAA	NTQKCIRAGG	KHNDLDDVGK	DVYHHTFFEM
101	LGSWSFGDYF	KELACK MALE	LLTQEFGIPV	ERLYVTYFGG	DEAAGLEPDL
151	ECRQIWQMLG	LDEAK ILPGN	MKDNFWEMGD	TGPCGPCSEI	HYDRIGGRDA
201	AHLVNQDDPN	VLEIWNLVFI	QYNRESDGVL	KPLPKK SIDT	GMGLER LVSV
251	LQNK MSNYDT	DLFVPYFEAI	QKGTGARPYT	GKVGAE TDG	IDMAYR VLAD
301	HAR TITVALA	DGGRPDNTGR	GYVLRRLRR	AVRYSHEKLN	ASRGFFATLV
351	DVVVQSLGDA	FPELKKDPM	VKDIINEEEV	QFLK TLRGR	RILDRKIQSL
401	GDCQTIPGDT	AWLLYDTYGF	PVDLTGLIAE	EKGLV DMDG	FEEER KLAQL
451	KSQKGAGGE	DLIMLDIYAI	EELRAKLEA	TDDSPKYNH	SDSSGSYVFE
501	CTVATVLALR	REKMFVDEVV	TGQECGVLD	KTCFYAEQGG	QIFDEGYLVK
551	VDDSSSEKTE	FTVKNAQVRG	GYVLHIGTIY	GNLRVGDQVR	LFIDEPRRRP
601	VMSNHTATHI	LNFALR SVLG	DADQKGS LVA	PDRLRF DTA	KGAM STEQIK
651	KTEEIVNGMI	EAAKPVYTL	CPLAAAKAIQ	GLR AVF DETY	PDPVR VVSIG
701	VPVSELLDDP	SGPAGSLTSV	EFCGGTHLRN	SSHAGAFVIV	TEEA LAKGIR
751	RIVAVTGAEA	QK ALRKSETL	KKSLSAMEVK	VKAQSAPNKD	VQKEIADLGE
801	VLATAVIPQW	QKDEQRETLK	SLKKVMDDL	RASKADVQKR	VLEKTK QLID
851	SNPNQPLVIL	EMESGASAKA	LNEALKLFKT	HSPQTSAMLF	TVDNEAGKIT
901	CLCQVPQMAA	NRGLKASEWV	QQVSG LMDGK	GGGKDMSAQ	TGKNVGCLOE
951	ALQLATSFQAQ	LRLGDVKN			

Figura-R&D29. Secuencia peptídica del precursor de la ARNt-alanina sintetasa. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del *spot* n°30 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 36% (348 de 968 aminoácidos).

- Precursor mitocondrial del factor de elongación Tu.

El factor de elongación Tu participa en el proceso de elongación de la cadena de ADN. Media la entrada del aminoacil ARNt.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D30**.

alanina y los efectos neurotóxicos del glutamato derivado de la Gln, también contribuyen a ese estado. Este fenómeno de edema en los astrocitos también se relaciona con procesos como la proliferación celular o la apoptosis (**Reeds and Burrin., 2001**).

1	MATSASSHLN	KGIKQMYMNL	PQGEKIQLMY	IWVDGTGEGE	L	RCKTRTLDCD
51	PKC VEELPEW	NFDGSSTFQS	EGSDSDMYLH	PVAMFRDPFR	RDPNKLVFCE	
101	VFKYNRKP AE	TNLRH SCKRI	MDMVSSQHPW	FGMEQEYTLM	GTDGHPPGWP	
151	SNGFPGPQGP	YYCGVGADKA	YGRDIVEAHY	RACLYAGIKI	TGTNAEVMPA	
201	QW EFQIGPCE	GIRMGDHLWV	ARFILHRVCE	DFGVIATFDP	KPIPGNWWGA	
251	GCHTNFSTKA	MREENGLRCI	EEAIDKLSKR	HQYHIRAYDP	KGGLDNARRL	
301	TGFHETS ININ	DFSAGVANRS	ASIRIPR IVG	QEKKGYFEDR	RPSANCDPYA	
351	VTEAIVRTCL	LNETGDEPFQ	YKN			

Figura-R&D31. Secuencia peptídica de la glutamina sintetasa. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del *spot* nº49 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 50% (186 de 373 aminoácidos).

Además la acumulación de Gln en el estado hiperamonémico contribuye al desequilibrio de los aminoácidos al estimular el transporte de los aminoácidos aromáticos a través de la barrera hematoencefálica, en concreto el contenido de triptófano es incrementado al ser intercambiado por la Gln tanto en fallo hepático agudo como crónico (**Hilgier et al., 1992**), promoviendo la síntesis de neurotransmisores inhibidores, serotonina (5-hydroxytriptamina, 5-HT), la cual está implicada en la EH y está implicada en el desequilibrio de la actividad motora.

Otra consideración con respecto al papel de la glutamina en el entorno celular es con referencia a la regulación del pH, ya que como consecuencia de su metabolismo se produce la eliminación neta de dos protones por cada molécula de glutamina catabolizada (**Solbu et al., 2005**). El proceso catabólico comienza por la acción de la glutaminasa fosfato dependiente (PAG) y la glutamato deshidrogenasa, produciéndose 2-oxoglutarato y dos moléculas de NH_4^+ (**Curthoys, 2001**). El amonio generado pasa ser eliminado en el ciclo de la urea y el 2-oxoglutarato entra en el ciclo de Krebs y en la gluconeogénesis

vía fosfoenolpiruvato. Esto genera dos iones HCO_3^- que pasan a la circulación y a ejercer su función tampón con los iones H^+ (**Curthoys and Gstraunthaler, 2001**). El metabolismo renal de glutamina se incrementa como mecanismo de defensa frente a la acidosis metabólica (**Parry and Brosnan, 1978**). A nivel cerebral no se conoce este tipo de regulación, pero si podríamos pensar que el incremento de glutamina cerebral podría dar lugar a un desequilibrio local ácido-base, lo que podría estar relacionado con la creatina quinasa, enzima relacionada con el equilibrio ácido-base.

En condiciones hiperamonémicas, no sólo se produce edema en los astrocitos, sino cambios en la expresión de la glutamina sintetasa, aumenta su expresión en áreas glutamatérgicas para retirar el exceso tanto de amonio como de glutamato. Esto conlleva a una elevación en la producción de glutamina, que actúa como osmolito en el interior celular, contribuyendo al edema en el astrocito y generándose un bucle de retroalimentación positiva.

Esta enzima se regula mediante modificación covalente reversible, un residuo de tirosina en cada subunidad de la GS puede ser adenilado por la adenilil transferasa, perdiendo actividad la enzima. A su vez la adenilil transferasa puede ser regulada por dos proteínas reguladoras: Proteína A, P_A y Proteína D, P_D . La P_A disminuye la actividad de la GS uniéndole una molécula de adenosina monofosfato (AMP); en cambio la P_D retira esa molécula de AMP ejerciendo la acción contraria. También puede regularse por productos o metabolitos del metabolismo de la glutamina: triptófano, histidina, carbamil fosfato, glucosamina-6-fosfato, citidina trifosfato y AMP, todos ellos actúan como inhibidores. También se regula por su propio producto: niveles bajos de glutamina la activan y niveles altos la inhiben. El glutamato, que es otro producto del metabolismo de la glutamina, también actúa como inhibidor.

El proceso fisiopatológico del estrés oxidativo de la EH está también asociado a la acumulación de manganeso en el cerebro, un cofactor de enzimas como la glutamina sintetasa o la Mn-superóxido dismutasa. Ésta última enzima posee una función antioxidante (dismutación del superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno) clave en los mecanismos biológicos de

defensa contra el estrés oxidativo en la mitocondria. La acumulación de manganeso induce estrés oxidativo y fallo en el balance energético de la mitocondria.

La Metionina Sulfoximina (MSO), es un inhibidor que se une al sitio activo (lugar de unión del glutamato) y si éste se fosforila por ATP, resulta en una inhibición no covalente irreversible de la GS. El MSO se ha utilizado en ratas hiperamonémicas y en ratas con EH (**Albrecht et al., 2010**) y se ha visto que los efectos causados por el amonio los revierte: disminución del consumo de glucosa (reducción en la demanda energética cerebral por disminución en la actividad cerebral), prevención del edema en los astrocitos, aumento del transporte de amonioácidos aromáticos a través de la barrera hematoencefálica, disminución del aumento de la presión intracraneal, normalización de los niveles de Gln, entre otros.

Durante el proceso de edema se ha visto que se induce una rápida nitración dependiente de Ca^{2+} en determinados residuos de tirosina en proteínas (glutamina sintetasa y receptores RPB) de los astrocitos (**Häussinger et al., 2002**), lo que implica la activación de los receptores NMDA (receptores ionotrópicos del glutamato) y la inducción de la óxido nítrico sintetasa. Estos dos últimos procesos pueden ser inhibidos por MSO, el antagonista del glutamato, que a su vez es un inhibidor de la glutamina sintetasa, hecho mencionado con anterioridad. Estos resultados sugieren una serie de observaciones:

a) Antagonistas de los receptores NMDA y el MSO inhiben la nitración de tirosinas (**Schliess et al., 2002**) y se utilizan para atenuar la toxicidad del amonio.

b) Factores como el amonio, el edema en los astrocitos, las benzodiazepinas y las citoquinas inflamatorias, todos ellos factores conocidos que contribuyen a la EH, pueden inducir la nitración de tirosinas.

c) La nitración de residuos de tirosina es más pronunciada y selectiva en los astrocitos que forman parte de la barrera hematoencefálica. Esto es usado como marcador de la EH (**Ferenci, 1991**).

La oxidación de esta enzima también podría afectar a la liberación del glutamato. El glutamato se sintetiza en los astrocitos a partir del α -cetoglutarato via ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs.

- ATPasa de vesículas de fusión.

También denominada con las siglas NSF (*N-ethylmaleimide sensitive fusion protein*). Participa en el proceso celular de fusión de membranas, ya sea a nivel de transporte interno (transporte de vesículas del retículo endoplasmático-Golgi-membrana, exocitosis) o externo (sinapsis).

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D32**.

1	MAGRTMQAAR	CPTDELSLSN	CAVVNEKDYO	SGQHMVVRTS	PMHKYIFTLR
51	THPSVVP	GCIAFSLP	QRKWA	GLSIGQDIEV	ALYSFDKAKQ
101	FLOKKNIDSN	PYDTDKMAAE	FIQQFNHQAF	SVGQQLVFSF	NDKLFGLLVK
151	DIEAMDPSIL	KGEPASGKRQ	KIEVGLVVGW	SQVAFKAEN	SSLNLIGKAK
201	TKENR QSIIN	PDWNFEK	MGI	GGLDK	EFSDI
251	KHVKGILLYG	PPGCGK	TLLA	RQIGKMLNAR	EPK VVNGPEI
301	NIRKLFADAE	EEQRRLG	ANS	GLHIIIFDEI	DAICK QRGSM
351	VNQLLSKIDG	VEQLMNILVI	GMTNRPDLID	EALLRPGRLE	VR MEIGLPDE
401	KGRLQILHIH	TARMRGH	QLL	SADVDIKELA	VETK NSGAE
451	TAMNRHIKAS	TKVEVDMEKA	ESLQVTRGDF	LASLENDIKP	AFGTNQEDYA
501	SYIMNGI IKW	GDPVTRV	LDD	GELLVQ	QTKN
551	ALAAK IAEES	NFPFIK	CSP	DKMIGF	SETA
601	VVDDIERLLD	YVPIGPR	FSN	LVLQALLVLL	KKAPPQGRKL
651	VLQEMEMLNA	FSTTIHVPNI	ATGEQLLEAL	ELLGNFKDKE	RTTIAQQVKG
701	KKVWIGIKKL	LMLIEMSL	QM	DPEYRVR	KFL
				ALMREEG	ASP
					LDFD

Figura-R&D32. Secuencia peptídica de la ATPasa de vesícula de fusión. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del *spot* n°39 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 39% (290 de 744 aminoácidos).

El proceso de fusión de membrana consiste en la unión de dos bicapas de fosfolípidos en un entorno acuoso, donde hay que vencer fuerzas como la tensión superficial ó la repulsión de cargas. Para ello, la célula intenta crear un

ambiente adecuado con una serie de proteínas, además de aportar energía mediante la hidrólisis del GTP. La ubicación de la vesícula y el compartimento diana ocurre por un proceso donde interaccionan proteínas de la pared de la vesícula (sinaptobrevina y sinaptotagmina) y de la membrana del compartimento diana (syntaxina y SNAP-25). Algunas de estas proteínas se asocian para formar un complejo, SNARE (syntaxina, *synaptosomal-associated protein 25*, SNAP-25, y sinaptobrevina), que interacciona con dos proteínas solubles, una asociada a proteínas de membrana, NSF (factor sensible a N-etilmaleimida; con actividad ATPasa) y otra que se une a la anterior, α -SNAP (*NSF-attachment protein*). Cuando el Ca^{2+} se une a la sinaptotagmina (proteína que actúa como sensor de Ca^{2+}) ésta permite que α -SNAP se una al complejo; a su vez, la actividad ATPasa de NSF disocia el complejo SNARE desencadenando el proceso de fusión. Por último, una proteína situada en la membrana vesicular, Rab-3, hidroliza el GTP a GDP, el GDP se une a una proteína de membrana plasmática, n-sec 1 y esto permite la fusión de ambas membranas.

El funcionamiento de esta proteína podría estar relacionado en el estado de hiperamonemia con la alteración del proceso de liberación de los neurotransmisores GABA y glutamato en las neuronas sinápticas.

- α -Internexina.

Es un tipo de filamento intermedio (neurofilamento), forma parte del citoesqueleto de las células, el cual ayuda en la organización de los orgánulos celulares y en la estructura de la célula, en consecuencia en su tipología y funcionalidad.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D33**.

```

1 MSFGSEHYLC SASSYRKVFG DGSRLSARLS GPGASGSFRS QLSRSSNVAS
51 TAACSSASSL GLGLAYRRLP ASDGLDLSQA AARTNEYKII RTNEKEQLQG
101 LNDRFAVFI KVHQLETQNR ALEAELAALR QRHAEPSRVG ELFQRELREL
151 RAQLEEASSA RAQALLERDG LAEEVQRLRA RCEEESRGRE GAERALKAQQ
201 RDVDGATLAR LDLEKKVESL LDELAFVRQV HDEEVAELLA TLQASSQAAA
251 EVDVAVAKPD LTSALREIRA QYESLAAKNL QSAEEWYKSK FANLNEQAAR
301 STEAIRASRE EIHEYRRQLQ ARTIEIEGLR GANESLERQI LELEERHSAE
351 VAGYQDSIGQ LESDLRNTKS EMARHLREYQ DLLNVKMALD IEIAAYRKLL
401 EGEETRFSTS GLSISGLNPL PNPSYLLPPR ILSSTTSKVS SAGLSLKKEE
451 EEEEEEEGA SKEVTKKTSK VGESFEETLE ETVWSTKKTE KSTIEEITTS
501 SSQKM

```

Figura-R&D33. Secuencia peptídica de la α -internexina. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir de los spots n^o40 y 41 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 61% (308 de 505 aminoácidos).

- rCG49429.

Proteína perteneciente a la familia de las septinas. Las septinas son proteínas integrantes del citoesqueleto celular.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D34**.

```

1 MSVAVEFRDY LGDFIEHYAQ LGPSQPPDLA QAQDEPRRAL KSEFLVRENR
51 KYYMDLKENQ RGRFLRIRQT VNRGPGLGST QGQTIALPAQ GLIEFRDALA
101 KLIDDYGVVEE EPAELPEGTS LTVDNKRFFF DVGSNKYGVF MRVSEVKPTY
151 RNSITVPYKV WAKFGHTFCK YSEEMKKIQE KQREKRAACE QLHQQQQQQQ
201 EETTAATLLL QGEEEGEED

```

Figura-R&D34. Secuencia peptídica de la rCG49429. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del spot n^o55 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 68% (156 de 229 aminoácidos).

-Septina 3, isoforma CRA_a.

La septina-3 (SEPT-3) es una proteína con dominio GTPAasa que juega un papel fundamental en la sinaptogénesis y en el desarrollo neuronal y en el reciclaje de las vesículas sinápticas. Puede interactuar con otras septinas formando filamentos, los oligómeros septina3-septina5-septina7 (SEPT3-SEPT5-SEPT7) se han encontrado en cerebro de rata (**Lukoyanova *et al.*, 2008**). Se encuentra altamente expresada en neuronas.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D35**.

```
1 MWACLPFSVS PSCAAGQSGL GKSTLVNTLF KSQVSRKASS WNREEKIPKT
51 VEIKAIGHVI EEGGVRMKLT VIDTPGFGDQ INNENCWEPI EKYINEQYEK
101 FLKEEVNIAR KKRIPDTRVH CCLYFISPTG HSLRPLDLEF MKHLSKVVNV
151 IPVIAKADTM TLEEKSEFKQ RVRKELEVNG IEFYPQKEFD EDLEDKTEND
201 KIRQESMPFA VVGSDKEYQV NGKRVLGRKT PWGIIEVENL NHCEFALLRD
251 FVIRTHLQDL KEVTHNIHYE TYRAKRLNDN GGLPPVSVDT EESHDSNP
```

Figura-R&D35. Secuencia peptídica de la septina 3. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del *spot* nº54 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 38% (117 de 308 aminoácidos).

- CDCre1-1AI ó Septina 5.

La septina 5 (SEPT5) se encuentra altamente expresada en neuronas. Puede interactuar directamente con la proteína SNARE sintaxina, involucrada en procesos de fusión de vesículas con membranas. La fosforilación por una kinasa, Cdk5, hace disminuir su capacidad de unión con la sintaxina.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D36**.

1	MDSLAAAPQDR	LVEQLLSPRT	QAQRRLK DID	KQYVGFATLP	NQVHRKSVKK
51	GFDFTLMVAG	ESGLGKSTLV	HSLFLTDLYK	DRKLLSAEER	INQTVEILKH
101	TVDIEEKGVK	LKLTIVDTPG	FGDAVMNFEC	WKPITDYVDQ	QFEQYFRDES
151	GLNRKNIQDN	RVHCCLYFIS	PFGHGLRPVD	VGFMKALHEK	VNIVPLIAKA
201	DCLVPSEIRK	LKDRIREEID	KFGIHVYQFP	ECDSDEDEDF	KQQDRELKES
251	APFAVIGSNT	VVEAKGQQRV	GRLYPWGIVE	VENQAHCDFV	KLRNMLIRTH
301	MHDLKDVTC	VHYENYRAHC	IQQMTSKL TQ	DSRMESPIPI	LPLPTDSET
351	EKLIRMKDEE	GRAGR			

Figura-R&D36. Secuencia peptídica de la septina 5. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del spot nº56 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 48% (175 de 365 aminoácidos).

- rCG53214, isoforma CRA_a, Septina 6.

La septina-6 (SEPT6) es una proteína con GTPasa requerida en la organización del citoesqueleto, en los filamentos de actina. Las septinas polimerizan en complejos de proteínas hetero-oligoméricas, formando filamentos de orden superior que se asocian con las membranas celulares, los filamentos de actina y los microtúbulos. La actividad GTPasa se requiere para formar los filamentos de actina. Los filamentos son ensamblados a partir de heterotrímeros asimétricos, compuestos por SEPT2, SEPT6 y SEPT7 que se asocian cabeza a cabeza para formar una unidad hexamérica. La interacción de este complejo con los paquetes de actina es a través de la proteína adaptadora anilina. También interactúan con otras septinas. Participan en el proceso del ciclo celular, en la citocinesis, en la formación del surco. El complejo septina6-septina8 (SEPT6-SEPT8) está implicado en el *tethering* o fusión de vesículas exocíticas hacia la membrana plasmática.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D37**.

1	MAAAD	IARQV	GEDCRT	TVPLA	GHVGF	DSLPD	QLVNK	SVSQG	FCFNIL	CVGE
51	TGLGK	STLMD	TLFNT	KFEGE	PTTHT	QPGVQ	LRSST	YDLQE	SNVGL	KLTIV
101	STVGFG	DQIN	KEDSY	KPIVE	FIDAQ	FEAYL	QEELK	IRRVL	HSYHD	SRIHA
151	CLYFIA	PTGH	SLKSL	DLVTM	KKLDS	KVNII	PIIAK	SDAIS	KSELAK	FKIK
201	ITSELV	SNGV	QIQFP	TDDE	SVAEI	NGTMN	AHLPF	AVVGS	TEEVK	IGNKM
251	MRARQ	YPWGT	VQVENE	AHCD	FVKLR	EMLIR	INMED	LREQT	HARHY	ELYRR
301	CKLEEM	GFKD	TDPDS	KPFSL	QETYE	AKRNE	FLGEL	QKKEE	EMRQM	FVQRV
351	KEKEAE	LKEA	EKELH	EKFDR	LKKLH	QEEKK	KLEDK	KKCLD	EEMNA	FKQRK
401	AAAELL	QSQG	SQAGGS	QTLK	RDKEK	KKNFF				

Figura-R&D37. Secuencia peptídica de la septina 6. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del *spot* n°47 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 39% (167 de 429 aminoácidos).

VI.4.2.- Estudio 2D-Oxy-blot, e identificación de proteínas oxidadas en cerebelo de ratas-*sham* y ratas-*dpc*.

Para el estudio de la oxidación de proteínas en el cerebelo de ratas-*dpc* se ha seguido el mismo planteamiento realizado con las muestras de la corteza. Es decir, para analizar el daño causado a las proteínas por los radicales libres y que proteínas eran más vulnerables al estrés oxidativo generado por el estado de hiperamonemia en el cerebelo de ratas-*dpc* tras 6 semanas de la operación, se ha estudiado la detección y cuantificación de grupos carbonilos (carbonilación) en las proteínas mediante inmunodetección, previa separación en 2D, transferencia a membrana (*Wester-blotting*) y post-derivatización con DNPH.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura-R&D38** y se resumen en la **Tabla-R&D14**. Como podemos observar en el cerebelo de las ratas-*dpc* podemos distinguir 10 proteínas con un índice f_{ox} estadísticamente significativamente mayor que en el cerebelo de las ratas controles o ratas-*sham*. Como más abajo discutiremos estas proteínas pueden agruparse en

diferentes grupos: proteínas relacionadas con el metabolismo (36%), proteínas de unión (9%), proteínas relacionadas con el transporte de vesículas (9%), proteínas relacionadas con el citoesqueleto (37%), proteínas implicadas en la regulación génica (0%), proteínas implicadas en el recambio de proteínas (0%), y otras proteínas (9%) (**Figura-R&D39**).

Tabla-R&D14. Proteínas oxidadas diferencialmente en el cerebelo de ratas-*dpc* a las 6 semanas.

Nº SPOT	Nº de acceso	Proteína identificada	Protein score	Punto isoeléctrico (pI)	Peso molecular (Da)
1	gi 47477769	Snap2 protein	311	5.19	283004.3
3	gi 9506811	alpha-internexin	427	5.2	56252.7
54	gi 149032469	guanine nucleotide binding protein, alpha o, isoform CRA_b	659	5.18	35118.1
37	gi 38512104	Arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)	297	5.39	73355.6
38	gi 158138568	serum albumin precursor	475	6.09	70709.9
61	gi 38328248	Tubulin, alpha 1A	396	4.94	50815.9
Extra	gi 31543764	spectrin alpha chain, brain	970	5.19	285218.4
35	gi 149064296	rCG46767, isoform CRA_c	571	5.11	66873.8
56	gi 6981146	L-lactate dehydrogenase B chain	308	5.7	36874.2
46	gi 290677865	Septin 6, rCG53214 isoform CRA_a	397	6.23	49146
57	gi 149041704	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha, isoform CRA_f	614	5.87	39408.9
C	gi 56388799	Ckb protein	288	5.4	45561.8
		Protein	ScoreCI%=100.	Especie	<i>Rattus norvegicus.</i>

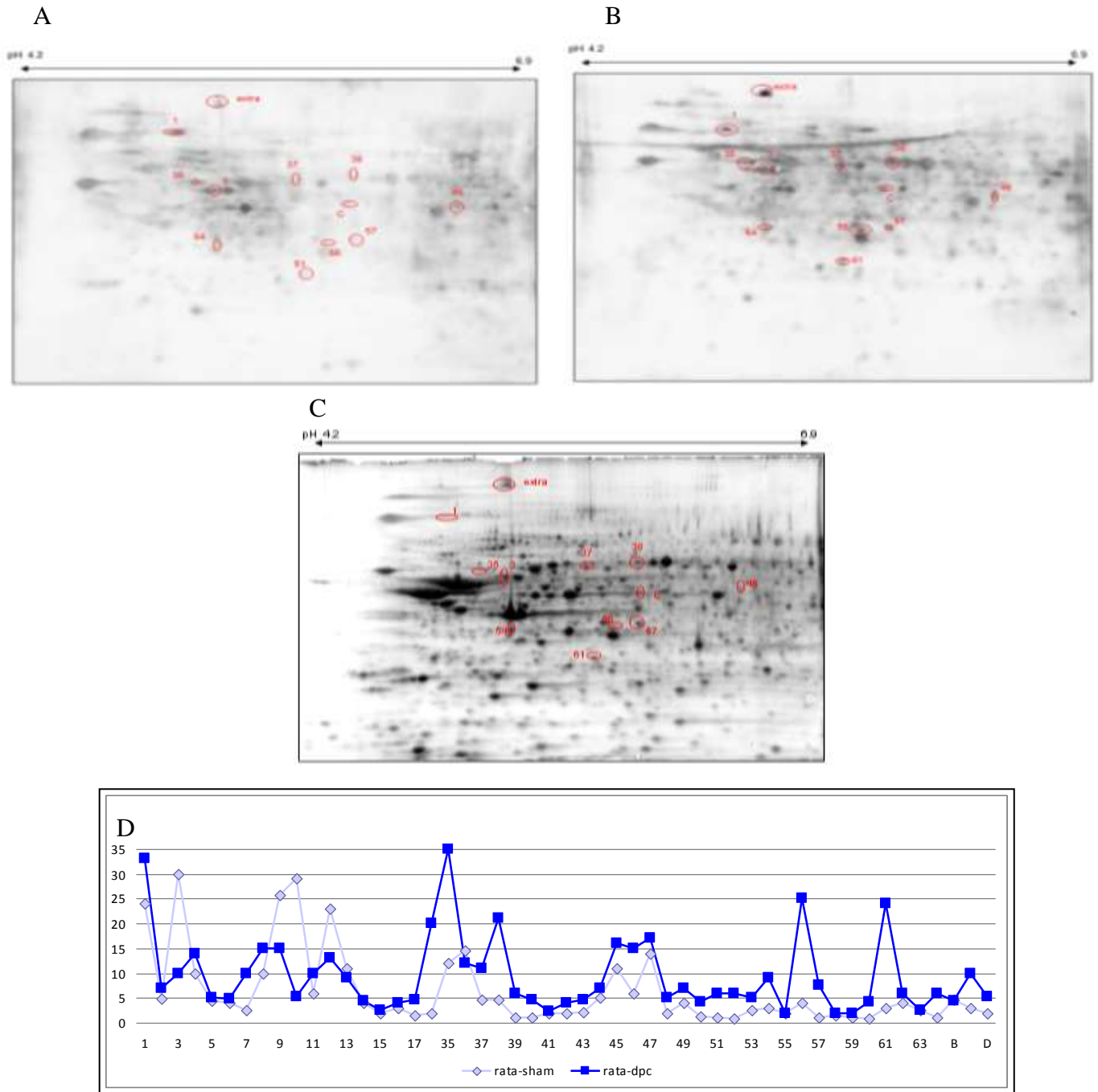


Figura-R&D38. Análisis representativo de 2D-Oxyblot de proteínas del cerebelo de ratas-*dpc* de 6 semanas. **(A)** Oxiblot de ratas-*sham* de 6 semanas; **(B)** Oxiblot de ratas-*dpc* de 6 semanas; **(C)** 2D-Electroforesis de ratas-*sham* de 6 semanas (150 μ g; teñidos con Sypro-Ruby); **(D)** Cociente de oxidación f_{ox} (x1000) de 11 *spots* oxidados en cerebelo. Los círculos en rojo indican los *spots* con diferencias en el cociente f_{ox} estadísticamente significativos (cociente $> 1,5$) entre las muestras de ratas-*sham* y ratas-*dpc*. Para el análisis se utilizaron tiras de isoelectroenfoco de 13 cm y pH 4-7.

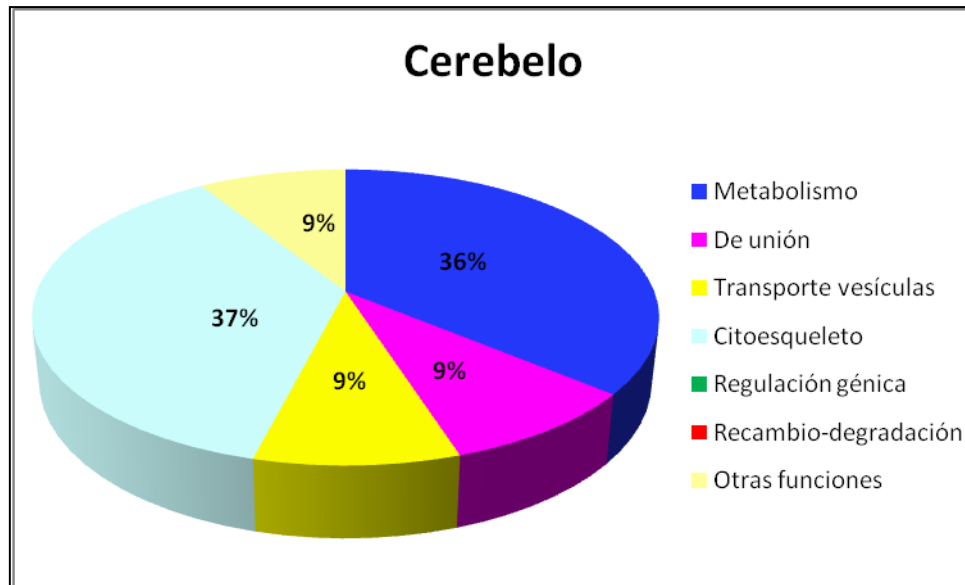


Figura-R&D39. Clasificación de las proteínas identificadas en cerebelo de ratas-*dpc* según su relación con diferentes funciones celulares.

Seguidamente discutiremos el papel o función de cada una de estas proteínas, haciendo especial hincapié en su posible relación con la fisiopatología de la EH asociada a hiperamonemia.

- α -internexina

La α -internexina es un proteína relacionada con la formación del citoesqueleto. La función y características de la α -internexina han sido comentadas en el apartado anterior (ver página 154).

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D33** (ver página 155).

- Snap2.

Las proteínas *alpha-slouble NSF attachment protein 2* (Snap2) pertenecen al grupo de las proteínas implicadas en el transporte vesicular. Las **proteínas Snap** son proteínas solubles que se asocian a las vesículas de fusión por medio de las proteínas NSF y que participan en los procesos específicos de anclaje y fusión de las vesículas con las membranas aceptoras (ya sea plasmática o de cualquier compartimento), así como a las proteínas SNARE que son proteínas de membrana o bien están ancladas a lípidos.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D40**.

1	MDPSCVKVLE	TREDIQERRQ	QVLDRYHRFK	ELSTLRRQKL	EDSYRQFFQ
51	RDAEELEKWI	QEKLVASDE	NYKDPTNLQ	KLQKHQAFEA	EVQANSCAIV
101	KLDETGNI	SEGHEFSETI	RTRLMLHRQ	WELLLKMR	KGICLLQAQK
151	LVQYLRECD	VMDWINDKEA	IVTSEELGQD	LEHVEVLQK	FEEFQDGLAA
201	HEERWNEVQ	FAAKLIQEQH	PEEELIKTKQ	EEVNAWQRL	KGLALQKQK
251	LFGAREVQRF	NRDVEDTIGW	IKEKEQLMAS	DDFGRDLASV	QALLRKHGEL
301	ERDLAALEDK	VKALCREADR	LQQSHPLSN	QIQVKREELI	TNWEQIRTLA
351	AERHARLDD	YRLQRFADF	RDLTSWVTM	KALINADBLA	NDVACAEALL
401	DRHQEHKGEI	DAHEDSFKSA	DESGQALLA	GHYASDEVRE	KLILSEERA
451	ALLELWELRR	QQYEQCMDLQ	LFYRDTQVD	NWMSKQEAFL	LNEDLGDSDL
501	SVEALLKKEH	DFEKSLSAQE	EKITALDEFA	TKLIQNNHYA	MEDVATRRDA
551	LLSRNALHE	RAMHRRQLA	DSFHLQFEER	DSDELKSWVN	EKMKTATDEA
601	YKDPNLQK	VQKHQAFERE	LSANQSRIDA	LEKAGQKLD	VNHAYKEEVA
651	ARMNEVISLW	KLLEATELTK	GVKLEARNQ	QQENRNVEDI	ELWLYEVEGH
701	LASDDYCKDL	TNVQNLQKKH	ALLEADVAAH	QDRIDGITIQ	ARQFQDAGHE
751	DAENIKKQK	ALVARYEALK	EPMVARKQKL	ADSLRLQLQ	RDVEDEETWI
801	REKEPIAAS	NRKDLIGVQ	NLLKQHQLQ	REIAGHEPRI	KAVTQRGNAM
851	VEEGHEARE	VKAKLSELNQ	KWEALKAKAS	QRRQDLEDL	LAQWYFADAN
901	EAESWMREKE	PIVGSTDYGK	DEDSAEALK	KHEALMSDL	RYGSSIQALR
951	EQAQSCRQV	APMDDTCKE	LVLALYDYE	KSPREVTMK	GDILTLNLS
1001	NKDWWKVVN	DRQGFVPRAY	VKCLDPAQSA	SRENLELQ	SIALRQCQID
1051	NOYQSLLEL	EKRKCMLEKS	CKKFMFLREA	NELQQWINEK	EAALTSEVQ
1101	ADLEQVEVLQ	KKEDDEQKDL	KANESRLKDI	NKVAEDLESE	GLMAAEVQAV
1151	QQQEVYCHMP	RDEADSKTAS	PWKSARLMVH	TVATFNSIKE	LNERWRSLQ
1201	LAEBERSQLG	SAHEVQRFHR	DADETKEWIE	EKNQALNTDN	YGHDLASVQA
1251	LQRKHEGFER	DLAALGDKVN	SLGETAQRLL	QSHPEAEDL	KEKCTELNQ
1301	WTSGLKPADQ	RKAKLGDSDH	LQRFLSDFRD	LMSWINGIRG	LVSSDLAKD
1351	VTGAEALLER	HQEHRTIDA	RAGTFQAFBQ	FGQQLLAHGH	YASPEIKEKL
1401	DILDQERTDL	EKAWVQRMM	LDHCLBLQLF	HRDCEQANW	MAAREAFNLT
1451	EDKGDSDLSV	EALIKKHEDE	DKAINVQEEK	IAALQAFADQ	LIADVHYAKG
1501	DIANRRNEVL	DRWRRLKAM	IEKRSKLGES	QTLQFSDV	DEIEMISEK
1551	LQTASDESYSK	DPTNIQSKHQ	KHQAFEAELH	ANADRIRCVI	DMCNSLIERG
1601	ACACSEDAVK	ARLAALADQW	QFLVQKSAEK	SQKLKEANKQ	QNFNTGKIDF
1651	DFWLEVEEAL	LASEDYCKDL	ASVNNLLKKH	QLLEADISAH	EDRLKDLNSQ
1701	ADSLMTSSAF	DTSQVKEKRD	TINGRFQKIK	SMATSRRAKL	SESHRLHQFF
1751	RDMDDEESWI	KEKKLLVSS	DYGRDLTCVQ	NLRKKHRLLE	ABELAAHEPAI
1801	QGVLDTGKRL	SDNTIGQEE	IQQRLAQFVE	HWRKELQLAA	ARGQRLSESL
1851	EYQQFVANVE	EERAWINEKM	TLVASEDYGD	TLARIQGLLK	KHEAFETDFT
1901	VHKDFVNDVC	TNGQDLIKKN	MHHEEMISSK	MKGLNGKVS	LEKAAAQRKA
1951	KLDENSAFLQ	FNWKADVVES	WICEKENSLE	TDYCRDLSS	VQTLTLTKQET
2001	FDACLQAFQ	EGIANITALK	DQLLARKHIQ	SKATEARHAS	LMKRWTQLLA
2051	NSATRKKKLL	EQSHFERKVE	DLFLTFAKKA	SAFNWSWFENA	EEDLTDPVRC
2101	NSLEEKALR	EAHDAFRSSL	SSAQADFNL	AELDRQIKSF	RVASNPYTW
2151	THEALEETWR	NLQKIKERE	LELQKEQRRQ	EENDKLRQEF	AQHANAQHW
2201	IQETRTYLLD	GSCMVERSGT	LESQLEATKR	KHQEIRAMRS	QLKKIIDLGA
2251	AMEEALILDN	KYTEHSTVGL	AQQWDQLDQL	GMRMQHNLEQ	QIQARNTTGV
2301	TEEALKEFSM	MFKHFDKDKS	GRLNHQEFKS	CLRSLGYDLP	MVEEGEPDPE
2351	FEALDITVDP	NRDGHVSLQE	YMAFMISRET	ENVKSSERIE	SAFRALSSEC
2401	KPYVTKEELY	QNLTREQADY	CVSHMKPYVD	GKGRLELPAE	DYVEEFTSLF
2451	VN				

Figura-R&D40. Secuencia peptídica de la proteína Snap2. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del spot nº1 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 17% (417 de 2452 aminoácidos).

Las vesículas de secreción, además de transportar en su interior neurotransmisores también pueden llevar asociadas proteínas de membrana. La liberación de proteínas de señalización de membrana, receptores y transportadores a la membrana plasmática son de especial importancia para la comunicación entre los astrocitos, entre los astrocitos y las neuronas y entre éstos y otras células adyacentes. Parece ser que en la EH esta comunicación se encuentra afectada ya que los astrocitos presentan tanto cambios morfológicos como alteraciones en su metabolismo (aspectos comentados con anterioridad).

- Subunidad α (o G_0) de la proteína G.

Esta proteína ha sido comentada ampliamente en el apartado anterior (ver página 137).

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D22** (ver página 138).

- Arginil aminopeptidasa ó aminopeptidasa B.

La arginil aminopeptidasa es una exopeptidasa que corta residuos de lisina ó arginina por el extremo N-terminal de péptidos como las encefalinas y la somatostatina. También participa en la síntesis de leucotrienos (hidrólisis de leucotrieno A4 a leucotrieno B4). Posee zinc como cofactor. Puede localizarse en el aparato de Golgi, en la parte extracelular de la membrana plasmática, de la fracción soluble del citosol o en vesículas de secreción o bien en sinaptosomas.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D41**.

Las encefalinas son unos péptidos que intervienen en la regulación del dolor y en la percepción corporal del mismo. Son endorfinas unidas al receptor opioíde corporal. Se producen en la glándula pituitaria y se liberan como hormonas. Reducen el dolor, aumentan la secreción ácido gástrica, relajan la musculatura del estómago y del íleon, bloquean la secreción pancreática de

insulina y glucagón, inhiben a la somatostatina, y estimulan la liberación de dopamina.

1 MGRIRDAILY **ALENLTAEF** **KKFKMKLLSV** PLREGYGRIP **RGTLLPMDAM**
51 DLTDKLVSY LEEYGALTA **VVLRDIGMQE** **TAERLQETSH** **KVSILELAQL**
101 **PSSILPGASH** **FVDQHRAALI** **TRVTEVDEVL** **DALYGKVLSE** **QQYQAVRAES**
151 **TNPGKMRKLF** SFAPAWNTTC **KDLLLLTALRN** TQPYLVADLE KS

Figura-R&D41. Secuencia peptídica de la aminopeptidasa B. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del *spot* nº37 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 44% (84 de 192 aminoácidos).

La somatostatina es una hormona secretada por los islotes de Langerhans (páncreas). Regula el estado de glucemia, inhibe la secreción de insulina y glucagón. Se secreta cuando los niveles de glucosa, aminoácidos, ácidos grasos libres y otras hormonas se encuentran elevados. Por tanto un desequilibrio en su regulación provoca alteración en el metabolismo de los carbohidratos. También es secreta por el hipotálamo y otras partes del sistema nervioso central como la glándula pineal. Esta hormona inhibe la síntesis o la secreción de la hormona del crecimiento (GH, STH ó Somatotropina), además de inhibir el eje hipotálamo-hipófisis-tiroide bloqueando la hormona estimulante del tiroides (TSH) ó la hormona liberadora de tirotrina (TRH). Puede ser secretada por la mucosa gastrointestinal, por ciertas células cancerosas y se ha encontrado como neurotransmisor en el sistema nervioso central. Otras acciones que puede ejercer esta hormona son: disminuir la tasa de digestión y absorción de nutrientes en el tracto gastrointestinal, con lo que inhibe la motilidad gástrica, duodenal y biliar, reducir la secreción de ácido clorhídrico, pepsina, gastrina, secretina, jugo intestinal y enzimas pancreáticas.

Los leucotrienos participan en los procesos inflamatorios, aumentando la permeabilidad vascular y la aparición de edema cerebral en el astrocito.

Se ha comentado que en los astrocitos ocurren procesos de edema (*swelling*) como consecuencia de los elevados niveles de amonio. La aminopeptidasa B corta a los precursores de las hormonas que han sido comentadas para que sean activas. Si la enzima responsable de la activación de estas hormonas no es funcional o su funcionalidad no es completa, los procesos a los que afecta se verán alterados como la inflamación, la percepción del dolor y la regulación en el metabolismo de los carbohidratos.

- Precursor de la albúmina sérica.

Es la principal proteína del plasma. Su principal función es la regulación de la presión coloidal osmótica en sangre. Proteína transportadora de zinc. Otras funciones que desarrolla son ayudar al transporte de las hormonas tiroideas, de los ácidos grasos libre, de ciertos fármacos, control de pH, entre otros. Sin embargo su presencia en este tejido cabe atribuirse fundamentalmente a un efecto contaminante probablemente debido a la dificultad para eliminar de manera completa la sangre. Por lo que sería recomendable depletar de albúmina la muestra.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D42**.

1	MKWVTFLLLL	FISGSAFVRG	VFRREAHKSE	IAHRFKDLGE	QHFKGLVLIA
51	FSQYLQKCPY	EEHIKLVQEV	TDFAKTCVAD	ENAENCDKSI	HTLFGDKLCA
101	IPKLRDNYGE	LADCCAKQEP	ERNECFLQHK	DDNPNLPPFQ	RPEAEAMCTS
151	FQENPTSFLG	HYLHEVARRH	PYFYAPELly	YAEKYNEVLT	QCCTESDKAA
201	CLTPKLDVAVK	EKALVA AVRQ	RMKCSSMQRF	GERAFKAWAV	ARMSQRF PNA
251	EFAEITKLAT	DLTKINKECC	HGDLLECADD	RAELAKYMCE	NQATISSKLQ
301	ACCDKPV LQK	SQCLAEIEHD	NIPADLPSIA	ADFVEDKEVC	KNYAEAKDVF
351	LGTFlyEYSR	RHPDYSVSLl	LRLAKKYEAT	LEKCCAEGDP	PACYGTVLAE
401	FQPLVEEPKN	LVKTNCElyE	KLGEYGFQNA	ILVRYTQKAP	QVSTPTLVEA
451	ARNLGRVGTK	CCTLPEAQRL	PCVEDYLSAI	LNRLCVLHEK	TPVSEKVTKC
501	CSGSLVERRP	CFSALTVD ET	YVPKEFKAET	FTFHSDICTL	PDKEKQIKKQ
551	TALAE LVKHK	PKATEDQLKT	VMGDF AQFVD	KCKKAADKDN	CFATEGPNLV
601	ARSKEALA				

Figura-R&D42. Secuencia peptídica de la albúmina sérica. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del *spot* n°38 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 49% (298 de 608 aminoácidos).

- Subunidad α de la tubulina.

La tubulina es una proteína formada por el ensamblamiento ordenado de un heterodímero de subunidades α y β que al ensamblarse de manera altamente organizada constituyen el principal constituyente de los microtúbulos. El dímero de tubulina une dos moléculas de GTP (una se sitúa en un sitio intercambiable (β) y la otra molécula en un sitio no intercambiable (α)) cuya hidrólisis depende del ensamblaje-desensamblaje (**Oakley, 2000**).

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D43**.

Presentan modificaciones como la glutamilación, que aunque aún no está clara su función, parece ser que participan en el dinamismo y ensamblaje de los microtúbulos. Otra modificación encontrada en la tubulina es la acetilación de determinados restos de lisina en las cadenas α . Estas modificaciones estabilizan los microtúbulos, afecta a la afinidad y a la motilidad, teniendo una gran repercusión en determinadas funciones celulares como motilidad celular, regulación del ciclo celular, para transporte vesicular y señalización.

1	MRECISIHVG	QAGVQIGNAC	WELYCLEHGI	QPDGQMPSDK	TIGGGDDSFN
51	TFSETGAGK	HVPRAVFVDL	EPTVIDEVRT	GTYRQLFHPE	QLITGKEDAA
101	NNYARGHYTI	GKEIIDLVLD	RIRKLADQCT	GLQGFLVFHS	FGGGTGSFT
151	SLLMERLSVD	YGKSKLEFS	IYPAPQVSTA	VVEPYSILT	THTTLEHSDC
201	AFMVDNEAIY	DICRRNLDIE	RPTYTNLNL	IGQIVSSITA	SLRFDGALNV
251	DLTEFQTNLV	PYPRIHFPLA	TYAPVISA EK	AYHEQLSVAE	ITNACFEPAN
301	QMVKCDPRHG	KYMACCLLYR	GDVVPRDVNA	AIATIKTKRT	IQFVDWCPTG
351	FKVGINYQPP	TVVPGDLAK	VQRAVCMLSN	TTAIAEAWAR	LDHKFDLMYA
401	KRAFVHWYVG	EGMEEGEFSE	AREDMAALEK	DYEEVGVDSV	EGEGEEEGEE
451	Y				

Figura-R&D43. Secuencia peptídica de la tubulina. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del spot nº61 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 18% (81 de 451 aminoácidos).

- Cadena alfa (α) de la espectrina.

Las espectrinas son unas proteínas del citoesqueleto originalmente descritas en los eritrocitos. Están formadas por dos cadenas (α , β) de heterodímeros que posteriormente se asocian en tetrámeros para enlazarse o asociarse con otras proteínas del citoesqueleto. En conjunto estas proteínas van a formar una especie de malla densa e irregular que está asociada a la membrana plasmática de la célula. Ésta se une a otra proteína del citoesqueleto, la anquirina, que a su vez se une a una proteína de membrana que constituye un canal iónico, quedando anclado el esqueleto del citoesqueleto a la membrana plasmática. La espectrina no sólo se encuentra en eritrocitos sino en otras células y tejidos como en el cerebro, por ejemplo la fodrina (espectrina II) es típica de los axones y la β -espectrina en dendritas y somas de células maduras del cerebro, así como en las células postsinápticas del cerebelo (**Malchiodo-Albedi *et al.*, 1993**). Otras proteínas con las que establecen conexión son las sinapsinas, f-actinas, amelinas y las calmodulinas, entre otras, además de establecer también conexiones con orgánulos (mitocondria, retículo endoplásmico) y vesículas sinápticas. Entre sus funciones se destaca la capacidad de organización de la membrana plasmática en las células excitables ya que participan en la creación de dominios en la membrana donde se localizan proteínas que según el tipo de asociación o estructura que conformen pueden dar lugar a la creación de los denominados dominios. Lo mismo ocurre con los dominios de “rafts lipídicos” (balsas lipídicas) o zonas de la membrana donde se concentran fosfolípidos saturados, colesterol y proteínas de membrana.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D44**.

1	MDPSCVKVLE	TAEDIQERRQ	QVLDRYHRFK	ELSTLRRQKL	EDSYRFQFFQ
51	RDAREELEKWI	QEKLVASDE	NYKDPTNLQG	KLQKHQAFEA	EVQANSRAIV
101	KLDETCNLMI	SEGHFASSETI	RTLMLHLHRQ	WELLLLEKMBE	KGIKLLQAQK
151	LVQYLRECECD	VMDWINDKEA	IVTSEELGQD	LEHVEVLQKK	FEFFQTDLAA
201	HEERVNEVNQ	FAAKLIQEQH	PEEELIKTKQ	EEVNAARQRL	KGLALQRQCK
251	LEGAAREVQRE	NRDVEDETIGW	IKEKEQLMAS	DDFGRDLASV	QALLRKHEGL
301	EDDLAALEDK	VKALCAEADR	LQSSHPLSAN	QIQVKREELI	TNWEQIRTLA
351	AERHARLDD	YRLQRFADF	RDLTSWVTEM	KALINADELA	NDVACABALL
401	DRHQEHKGEI	DAHEDSFKSA	DESGALLAA	GHYASDEVRE	KLSILSEERA
451	ALLELWELRR	QQYEQCMDLQ	LFYRDTEQVD	NWMSKQEAFL	LNEDLGDSDL
501	SVEALKKKHE	DFEKLSAQE	EKITALDEFA	TKLIQNNHYA	MEDVATRDA
551	LLSRRNALHE	RAMHRRQAQA	DSEHLQQEER	DSEELKSWVN	EKMKATDEA
601	YKDPNSLQCK	VQKHQAFERE	LSANQSRIDA	LEKAGQKLID	VNHYAKEEVA
651	ARMNEVISLW	KKLLEATELK	GVKLREANQQ	QQFNRRNVEDI	ELWLYEVEGH
701	LASDDYCKDL	TNVQNLQKKH	ALLEADVAAH	QDRIDGTTIQ	ARQFQDAGHF
751	DAENIKKKQE	ALVARYEALK	EPMVARQKQL	ADSLRLQQLF	RDVEDEETWI
801	REKEPIAAS	NRGKDLIGVQ	NLLKQHQAALQ	AEIAGHEPRI	KAVTQKGNM
851	VEEGHFAED	VKAKLSELNQ	KWEALKAKAS	QRRQDLEDL	QAQQYFADAN
901	EAESWMBEKE	PIVGS TDYCK	DEDSAEALLK	KHEALMSDLS	AYGSSIQALR
951	EQAQSCRQV	APMDDETGKE	LVLALYDYQE	KSPREVTMKK	GDILTLLNST
1001	NKDWWKVEVN	DRQCFVPAAY	VKRLDPAQSA	SRENLLREQC	SIALRQGGID
1051	NQTRITKEAC	SVSLRMKQVE	ELYQSLEELG	EKRKCMLEKS	CKKFMFLFREA
1101	NELQQWINEK	EAALTSEEVG	ADLEQVEVLQ	KKFDDFQKDL	KANESRLKDI
1151	NKVAEDLESE	GLMAEEVQAV	QQQEVYGMMP	RD EADSKTAS	PWK SARLMVH
1201	TVATFNSTIKE	LNERWRSLQQ	LAEERSQLLG	SAHEVQRFHR	DADETKEWIE
1251	EKNQALNTDN	YGHDLASVQA	LQRKHEGFER	DLAALGDKVN	SLGETAQRLLI
1301	QSHPEAEDL	KEKCTELNQA	WTSLGKRADQ	PKAKLGDSDH	LQRFLSDFRD
1351	LMSWINGIRG	LVSSDELAKD	VTGAEALLER	HQEHRTIDA	PAGTFQAFEQ
1401	FGQQLLAHGH	YASPEIKKEL	DILDQERTDL	EKAWVQRMM	LDHCLLQLF
1451	HRDCEQAENW	MAAREAFELNT	EDKGDSDLSV	EALIKKHEDF	DKAINVQEEK
1501	IAALQAFADQ	LIALDHYAKG	DIAMRRNEVL	DRWRRLKAQM	IEKRSKLGES
1551	QTLQQFSRDV	DEIEAWISEK	LQTASDESYK	DPTNIQSKHQ	KHQAFEAELH
1601	ANADRIRGVI	DMGNSLIERC	ACACSEDAVK	ARLAALADQW	QFLVQKSAEK
1651	SQKLKEANKQ	QNFNTGKIDF	DFWLSEVEAL	LASEDYGKDL	ASVNNLLKKH
1701	QLLEADISAH	EDRLKDLNSQ	ADSLMTSSAF	DTSQVKEKRD	TINGRFQKIK
1751	SMATSRRAKL	SESHRLHQEF	RDMDDEESWI	KEKLLVSSSE	DYGRDLTGVO
1801	NLRKKHKRLE	AELAAHEPAI	QCVDLTGKKL	SDBNTIGQEE	IQQLRAQFVE
1851	HWKELQLAA	ARGQRLSESL	EYQQFVANVE	EEEAWINEKM	TLVASEDYGD
1901	TLAAIQGLLK	KHEAFETDFT	VHKDRVNDVC	TNGQDLIKKN	NHHEENISSK
1951	MKGLNGKVS	LEKAAAQRKA	NVDENSAFLQ	FNWKADVVE	WIGEKENSLK
2001	TDYGRDLSS	VQTLTKQET	FDAGLQAFQQ	EGIANITALK	DQLLAAKHIQ
2051	SKAIEARHAS	LMKRWTQLLA	NSATRKKLL	EAQSHERKVE	DLFLTFAKKA
2101	SAFNWUFENA	EEDLTDPVRC	NSLEEKALR	EAHDAFRSSL	SSAQADFNQL
2151	AELEDRQIKSF	RVASNPTWF	TMEALEETWR	NLQKIIBERE	LELQKEQRQ
2201	EENDNVRQEF	AQHANA FHQW	IQETRTYLLD	GSCMVEESGT	LESQLEATKR
2251	KHQEIRAMRS	QLKKIEDLGA	AMEEALILDN	KYTEHSTVGL	AQQWDQLDQL
2301	GMRMQHNLQ	QIQARNTTCV	TEEALKEFSM	MEKHFDKDKS	GRLNHQEFKS
2351	CLRSLGYDLP	MVEEGEPDPE	FEALD TVDP	NRDGHVLSQE	YMAFMISRET
2401	ENVKSSEEIE	SAFRALSSEC	KPYVTKEELY	QNLTRREQADY	CVSHMKPYVD
2451	GKGRELPTAF	DYVEFTRSLF	VN		

Figura-R&D44. Secuencia peptídica de la espectrina. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del spot n°extra identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 29% (716 de 2472 aminoácidos).

Los cambios tanto en las conexiones que establecen con otros elementos como en la asociación entre cadenas de las espectrinas se pone de

manifiesto en los primeros días del desarrollo neuronal donde incrementan los niveles de β -espectrina en el hipocampo, hecho que refleja su participación en la sinaptogénesis (**Steward et al., 1989**).

- rCG46767.

Proteína con una secuencia conservada que se encuentra en proteínas de los filamentos intermedios.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D45**.

```
1 MATATPVQQR AGSRASAPAT PLSPTRLSRL QEKEELRELN DRLAVYIDKV
51 RSLETENSAL QLQVTEREEV RGRELTGLKA LYETELADAR RALDDTARER
101 AKLQIELGKF KAEHDQLLN YAKKESDLG AQIKLREYEA ALNSKDAALA
151 TALGDKKSLE GDLEDLKDQI AQLEASLSAA KKQLADETLL KVDLENRCQS
201 LTEDLEFRKN MYEEEINETR RKHETRLVEV DSGRQIEYEV KLAQALHEMR
251 EQHDAQVRLY KEELEQTYHA KLENARLSSE MNTSTVNSAR EELMESRMRI
301 ESLSSQLSNL QKESRACLER IQELEDMLAK ERDNRRLMS DKEREMAEIR
351 DQMQQQLNDY EQLLDVKLAL DMEISAYRKL LEGEERLKL SPSRSSRVTV
401 SRASSRSVR TTRGKRKRVV VEESEASSV SISHSASATG NVCIEEIDVD
451 GKFIRLKNTS EQDQPMGGWE MIRKIGDTSV SYKYTSRYVL KAGQIVTVA
501 ANAGVTASPP TDLIWNQNS WGTGEDVKVV LKNSQGEEVA QRSTVFKTTI
551 PEEEEEEEE PIGVAIEEER FHQQTTPRAS NKSCAIM
```

Figura-R&D45. Secuencia peptídica de la proteína rCG46767. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del *spot* n°35 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 50% (293 de 587 aminoácidos).

Los astrocitos de tipo II de Alzheimer son característicos por sus cambios morfológicos respecto de los astrocitos normales. Podría pensarse que una de las posibles causas sería una alteración en esa red que conforma el esqueleto de la célula, el citoesqueleto, siendo responsable de algunos de los cambios en cuanto a morfología y composición que se encuentran en ellos.

- Cadena B de la L-lactato deshidrogenasa.

La lactato deshidrogenasa es una enzima citoplasmática que cataliza la fermentación ó reducción del piruvato (procedente de la glucólisis) a lactato ó ácido láctico gracias a la oxidación de la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) a NAD⁺ en condiciones anaerobias. Bajo estas condiciones la tasa de oxígeno en sangre es baja y la piruvato deshidrogenasa no es capaz de convertir el piruvato a acetil-CoA lo suficientemente rápido como para que no se acumule; para evitar que la glucólisis se inhiba y se reduzca la producción de ATP, la lactato deshidrogenasa actúa. De esta manera se produce el NAD⁺ necesario para continuar la glucólisis (**Nelson and Cox, 2005**).

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D46**.

```
1 MATLKEKLIA PVADETAVP NNKITVVGVG QVGMACAISI LGKSLADELA
51 LVDVLEDKLK GEMDLQHGS LFLQTPKIVA DKDYSVTANS KIVVVTAGVR
101 QQEGESRLNL VQRNVNVFKF IIPQIVKYSP DCTIIVVSNP VDILTYVTWK
151 LSGLPKHRVI GSGCNLDSAR FRYLMAEKLG IHPSSCHGWI LGEHGDSSVVA
201 VWSGVNVAGV SLQELNPEMG TDNDSENWKE VHRMVDSAY EVIKLKGYTN
251 WAIGLSVADL IESMLKNLSR IHPVSTMVKG MYGIENEVFL SLPCILNARG
301 LTSVINQKLK DEVAQLRKS ADTLWDIQKD LKDL
```

Figura-R&D46. Secuencia peptídica de la lactato deshidrogenasa. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del *spot* n°56 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 55% (183 de 332 aminoácidos).

Su paso a sangre es como consecuencia de la destrucción de los tejidos (traumática, neoplásica o infecciosa) donde se encuentra (corazón, hígado, cerebro, riñones, músculo, glóbulos rojos y pulmones), por lo que su elevación en suero se utiliza como biomarcador de procesos como cardiopatías (infarto de miocardio), hepatopatías (hepatitis, obstrucción de vías biliares), alcoholismo, neumonías, entre otros.

Cuando los requerimientos energéticos en el cerebro no son suficientes con el aporte de glucosa, se utiliza el lactato como sustrato energético. El aporte de lactato al cerebro depende de un transportador de monocarboxilatos en la barrera hematoencefálica. Cuya constante de Michaelis-Menten (K_m) es relativamente baja (3mM), aunque cuando el pH sanguíneo disminuye, su capacidad de transporte aumenta. En el estado de hiperamonemia el pH sanguíneo disminuye, favoreciéndose la capacidad de transporte del lactato. Esto, además de la modificación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, podría explicar que en el cerebro, bajo estas circunstancias, se obtuviese la energía a través de esta serie de reacciones y no tanto a partir de glucosa. El piruvato formado atraviesa la membrana mitocondrial utilizando el transportador de monocarboxilatos y se convierte a acetil-CoA mediante el complejo piruvato deshidrogenasa liberando CO_2 . Este acetil-CoA se incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, por lo que los carbonos procedentes del lactato pueden también incorporarse en CO_2 en las reacciones catalizadas por la isocitrato deshidrogenasa-NAD, el complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa y la glutamato descarboxilasa, ésta última en el ciclo del GABA.

En el cerebro el lactato es el principal intermediario metabólico liberado por los astrocitos en cultivo. Éste puede ser tomado por las neuronas a través de un transportador específico. La producción de lactato en los astrocitos puede estimularse a través del glutamato, principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central, el cual desencadenaría la estimulación de la ruta glucolítica en los astrocitos. Por lo tanto la glucosa procedente de los capilares sanguíneos es tomada por los astrocitos, allí se metaboliza a lactato mediante la glucólisis, y este lactato es liberado al espacio extracelular, es tomado por las neuronas y allí es metabolizado, por ejemplo, de nuevo a piruvato para continuar con el ciclo de Krebs.

En cuanto a las isoenzimas, la de tipo H predomina en el cerebro de adulto.

- Subunidad α de la isocitrato deshidrogenasa 3 (IDH 3).

La isocitrato deshidrogenasa es una enzima del ciclo de Krebs que cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato en 2-oxoglutarato. En eucariotas existen tres isoenzimas: IDH 1 citoplasmática, IDH 2 mitocondrial, ambas dependientes de NADP^+ , e IDH 3 mitocondrial dependiente de NAD^+ como aceptor de electrones. Como cofactores utiliza magnesio o manganeso. Se induce por sustrato (isocitrato, NAD^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+}) y se inhibe por productos (2-oxoglutarato, NADH), por ATP por inhibición competitiva (**Nelson and Cox, 2005**).

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D47**.

```
1 MRPGVAAVAA VREVDAMAGS AWVSKVQIVT LIPGDGIGPE ISASVMKIFD
51 AAKAPIQWEE RNVTAIQGPG GKWMIPPEAK ESMKKNKMGL KGPLKTPIAA
101 GHPSMNLRLR KTFDLIANVR PCVSIEGYKT PYTDVNIVTI RENTEGEYSG
151 IEHVIVDGVW QSIKLITEGA SKRIAEFAFE YARNNHRSNV TAVHKANIMR
201 MSDGLFLQKC REVAENCKDI KFNEMYLDIV CLNMVQDPSQ FDLVLPNLY
251 GDILSDLGAG LIGGLGVTPS GNIGANGVAI FESVHGTPD IAGKDMANPT
301 ALLLSAVMML RHMGLFDHAA KIAACFATI KDGKSLTKDL GGNSKCSDFP
351 EEICRRVKDL D
```

Figura-R&D47. Secuencia peptídica de la isocitrato deshidrogenasa 3. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del *spot* nº57 identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 52% (188 de 361 aminoácidos).

- Proteína Ckb.

La creatina kinasa cataliza la fosforilación de la creatina con el consumo de una molécula de ATP, formando la fosfocreatina. Ésta puede constituir una reserva rápida de energía en el músculo esquelético pero también en el cerebro en condiciones anaeróbicas. La isoenzima del cerebro es un dímero de 2 subunidades B, tiene como sustrato principal la creatina pero también puede

utilizar ciclocreatina, glicociamina y N-etilglicociamina. Como cofactores puede utilizar el Mn^{2+} y el Mg^{2+} . Su aparición en sangre se puede deber a la destrucción de músculo o a procesos inflamatorios.

La secuencia peptídica de la proteína a partir de la cual se ha identificado se detalla en la **Figura-R&D48**.

```
1 ALRPELQAQA VCVFAPSGIP PAAAAAMPF SNSHNTQKLR FPAEDEFPDL
51 SSHNNHMAKV LTPELYAELR AKCTPSGFTL DDAIQTGVDN PGHPYIMTVG
101 AVAGDEESYD VFKDLFDPII EDRHGGYQPS DEHKTDLNPD NLQGGDDLDP
151 NYVLSSRVRT GRSIRGFCLP PHCSRGERA IEKLAVEALS SLDGDLSGRY
201 YALKSMTEAE QQQLIDDFL FDKPVSPDLL ASGMARDWPD ARGIWHDNDK
251 TFLWINEED HLRVISMQKG GNMKEVFTRF CTGLTQIETL FKSKNYEFMW
301 NPHLYIILTC PSNLGTGLRA GVHIKPLHLG KHEKFSEVLK RLRLQKRGTG
351 GVDTAAVGGV FVSNADRLG FSEVELVQMV VDGVKLLIEM EQRLEQGQPI
401 DDLMPAQK
```

Figura-R&D48. Secuencia peptídica de la creatina kinasa. Los péptidos en rojo son los que han sido identificados mediante MALDI-TOF a partir del *spot* n°C identificado en el gel. El porcentaje de cobertura aminoacídica fue del 46% (188 de 408 aminoácidos).

IV.5.- Resumen general de las funciones de las proteínas identificadas tanto en corteza cerebral como en cerebelo.

Para facilitar la comprensión y el análisis global de los resultados obtenidos en la corteza cerebral y en cerebelo de las ratas-*dpc* vamos a resumir las proteínas identificadas en grupos de funciones relacionadas con las diferentes funciones celulares:

A. METABOLISMO.

Del conjunto total de proteínas relacionadas con el metabolismo, en nuestro análisis hemos encontrado proteínas referentes a los siguientes procesos metabólicos:

1. Ciclo de Krebs (ciclo de los ácidos tricarbónicos).

Es una cadena de reacciones metabólicas donde el acetil-CoA se oxida hasta CO₂ liberando energía en forma de poder reductor, NADH y flavín adenin dinucleótido (FADH₂). La procedencia del acetil-CoA puede ser de la glucólisis (glucosa), de la beta oxidación de los ácidos grasos (lípidos) o de la desaminación oxidativa (aminoácidos). El poder reductor generado continúa hacia la fosforilación oxidativa (cadena respiratoria) para obtener energía en forma de ATP.

De las proteínas identificadas en este estudio se incluyen: **isocitrato deshidrogenasa**

2.- Metabolismo de los hidratos de carbono.

Aquí se incluyen los procesos de la glucólisis y la gluconeogénesis. La glucólisis es la vía metabólica catabólica donde se oxida una molécula glucosa (de seis átomos de carbono) hasta dos moléculas de piruvato (de tres átomos de carbono) generando energía en forma de ATP y poder reductor, NADH. La gluconeogénesis es una ruta metabólica anabólica donde se sintetiza glucosa a partir de precursores no glucídicos como lactato, piruvato, glicerol y ciertos aminoácidos. De las 10 reacciones enzimáticas que conforman la glucólisis, 7 son compartidas pero en sentido inverso con la gluconeogénesis, así la conversión de glucosa a glucosa 6-fosfato, la fosforilación de fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bifosfato y la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato son realizadas en cada caso por enzimas diferentes.

En este grupo podemos citar: **piruvato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa**, ambas enzimas glucolíticas o gluconeogénicas según hacia donde esté desplazado el equilibrio de la reacción.

3. Metabolismo nitrogenado (proteínas y aminoácidos).

Las enzimas identificadas que pertenecen a este grupo son: **glutamina sintetasa**, **creatina kinasa**, así como la **aminopeptidasa sensible a purinomicina** encargada de la degradación de acúmulos de poliglutamina, la **aminopeptidasa B** que es una exopeptidasa que corta a las encefalinas, somatostatina, y leucotrienos para activarlos.

4. Metabolismo de xenobióticos.

Los xenobióticos son moléculas cuya estructura química es poco frecuente o inexistente en la naturaleza (agentes químicos, fármacos, tóxicos, insecticidas, hormonas de origen exógeno...). En este grupo de ha identificado la **aldehído deshidrogenasa mitocondrial** encargada de metabolizar el alcohol ingerido por vía oral o bien cualquier molécula de acetaldehído que se forme en el organismo como consecuencia del metabolismo de otras moléculas.

B. PROTEÍNAS DE UNIÓN.

En este grupo se ha querido representar las proteínas de unión a GTP y al ATP. La principal característica es que estas proteínas tienen que unirse a otros elementos para desarrollar su función.

Hemos identificado a la **proteína G** tiene capacidad de unión-hidrólisis del GTP y que actúa en la cascada de señalización celular activando a otras moléculas o segundos mensajeros; y a **Grp75** que pertenece a la superfamilia de Hsp-70 ó proteínas de choque térmico, que presenta capacidad de unión al ATP y que participa en el ensamblaje y plegamiento de otras proteínas actuando como chaperona.

C. TRANSPORTE VESICULAR.

Aquí se hace alusión a las proteínas que participan en el transporte mediado por vesículas ya sea para moléculas que van a ser secretadas al espacio extracelular o que van a formar parte de la estructura/composición de la célula.

Las proteínas identificadas en este grupo son la **ATPasa de fusión**, que participa en el proceso de fusión de membranas en el transporte de las vesículas; y **Snap2** que se asocia a las vesículas de fusión y forma parte del complejo de anclaje y fusión vesicular.

D. CITOESQUELETO.

Habría que hacer una diferencia entre las proteínas que forman parte del citoesqueleto y aquellas que se asocian a ellas ya sea para unir a otras proteínas del citoesqueleto o bien a otras estructuras como las vesículas de fusión citadas en el apartado anterior.

Citamos a la **α -internexina**, **espectrina** y **tubulina**, como proteínas integrantes del citoesqueleto; y a las proteínas asociadas al citoesqueleto: **rCG49429**, **septina 3**, **septina 5**, **septina 6**, **rCG46767**.

E. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

Las proteínas que se han identificado en este estudio y que pertenecen a este grupo son: **sintetasa ARN_t -Ala**, cuya función es cargar, unir el aminoácido alanina a su ARN transferente; y el **precursor del factor de elongación Tu**.

F.- DEGRADACIÓN-RECAMBIO.

Dentro de este reducido grupo incluimos la **enzima activadora de la ubiquitina (E1)** encargada de activar la ubiquitina para “etiquetar” las proteínas que van a ser degradadas por el proteasoma.

G.- OTROS.

Donde se incluye la **albúmina sérica** implicada en el equilibrio de la presión coloidal osmótica, pero que en este caso se considera una contaminación debida a la presencia de restos de sangre en la muestra.

En la **Figura-R&D49** se la distribución porcentual de estas proteínas.

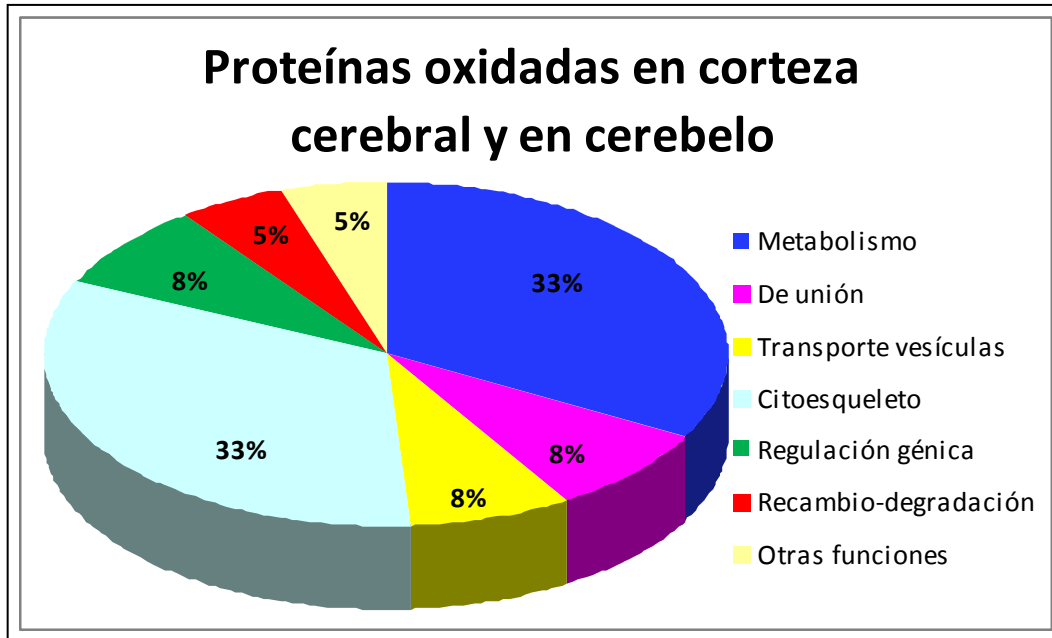


Figura-R&D49. Distribución porcentual según su función de las proteínas oxidadas en la corteza cerebral y cerebelo de ratas-*dpc*.

El papel de estas proteínas en la fisiopatología de la EH parece estar afectado por el estado de hiperamonemia. El amonio, en condiciones normales, llega al hígado desde la mucosa intestinal (producido por la rotura del amino ácido glutamina por la glutaminasa de las bacterias intestinales, pero fundamentalmente debido a un incremento de la actividad glutaminasa fosfato dependiente (Romero-Gómez *et al.*, 2006, 2005, 2004) y desde los riñones por deamidación de la glutamina. La función principal del hígado es la de la síntesis de urea a partir de amonio y otras sustancias. Parte del amonio generado también se utiliza para volver a sintetizar glutamina. El amonio restante puede ser absorbido en otros órganos tales como el riñón, cerebro y músculos. El cerebro y el músculo carecen de ciclo para detoxificar el amonio, dependiendo de la síntesis de glutamina para ello. Al ser un ciclo, la glutamina creada desde el amonio llegaría a convertirse en el intestino y en los riñones, de nuevo, en amonio.

La hipótesis del amonio mantiene que, durante el fallo hepático, no es posible la detoxificación del amonio, resultando en un estado de hiperamonemia. Este amonio va a generar una serie de cambios en el metabolismo que tendrá como consecuencia diferentes efectos a nivel celular.

El amonio induce despolarización en células nerviosas in vivo o in vitro genera un incremento en la liberación glutamato dependiente de Ca^{2+} en varias regiones cerebrales (**Hilgier et al., 1991**), produciéndose como consecuencia directa de la excesiva liberación de glutamato la sobre-estimulación de los receptores ionotrópicos de glutamato, en particular los receptores NMDA. La estimulación se cree que es reforzada por un incremento en la glicina extracelular, la cual actúa como moduladora positiva de estos receptores, y por una pérdida de los receptores GABA_B que modulan negativamente la liberación del glutamato. Esta activación de los receptores NMDA inducida por el amonio conduce a una serie de cambios metabólicos en el sistema neuronal: **a)** incremento de la actividad ATPasa dependiente de Na^+/K^+ en las membranas de las células nerviosas, conduciendo a una disminución en los niveles de ATP celular; **b)** proteólisis de los microtúbulos asociados a la proteína MAP-2, disminuyéndose la polimerización de los mismos y desequilibrando el transporte axonal de vesículas neurotransmisoras; y **c)** un incremento en la generación del NO, lo cual aumenta la acumulación de peróxidos, reduce la actividad antioxidante de los enzimas y genera un estado oxidativo que como consecuencia del mismo causa un daño en la célula nerviosa.

El amonio es una neurotoxina que inhibe los canales de cloruro, contribuyendo a la depresión del sistema nervioso central. En un principio, se pensó que el amonio se unía al α -cetoglutarato depletando los intermediarios del ciclo de Krebs en el sistema nervioso central. Sin embargo, esto es poco probable dado que el amonio se metaboliza en el cerebro a través de su combinación con el glutamato formando glutamina, pudiendo afectar al metabolismo energético, alterando la lanzadera del malato aspartato. El amonio facilita la captación de triptófano en el cerebro el cual es punto de partida para la síntesis de varios metabolitos neuroactivos, entre ellos la serotonina. El

amonio disminuye la neurotransmisión glutamatérgica, provocando neurodepresión (**Haussinger et al., 2002; Jalan and Hayes, 1997**).

Por otro lado, hemos visto que en las ratas-*dpc* de 6 semana aparecen oxidadas las proteínas G, éstas no podrán ejercer su función en las rutas de señalización de los receptores GABA_B; los receptores de GABA_B metabotrópicos (permeables al K⁺ y al Ca²⁺) son receptores asociados a proteína G. Estos se pueden encontrar tanto en el terminal pre-sináptico (donde la unión de GABA/agonista disminuye la entrada de Ca²⁺, originándose una menor liberación de glutamato y monoaminas) así como en el terminal post-sináptico (donde se incrementaría la salida de K⁺ al medio extracelular, produciendo un potencial inhibitorio lento).

Existen autores que no confirman la hipótesis de la correlación del nivel de amonio en sangre o en los tejidos con el grado de desarrollo de la EH. Se ha postulado que la razón para esto podría ser que los niveles fuesen medidos en muestras de sangre venosa (**Mullen, 2000**), argumentando que no sería una buena medida, ya que el cerebro está expuesto a sangre arterial. En cambio, existen otros trabajos que lo refutan, donde se argumenta que la correlación se observa tanto en los niveles medidos en sangre arterial así como en venosa (**Nicolao et al., 2003**).

En nuestros resultados un 33% del total de proteínas identificadas en corteza y cerebelo de ratas-*dpc* pertenecen al citoesqueleto, ya sea como proteínas estructurales o bien asociadas al citoesqueleto. Podríamos decir que, en su mayoría, las septinas en estados de hiperamonemia presentan un alto porcentaje de oxidación (carbonilación), como hemos comprobado en nuestros resultados.

Las septinas son una familia de proteínas conservadas con actividad GTPasa que actúan como anclaje o punto de reclutamiento de otras proteínas, en la organización de microtúbulos y de filamentos de actina, en el establecimiento de la polaridad, en el tráfico de vesículas y su organización, exocitosis, citocinesis, formación del surco, membrana asociada al movimiento

celular, en el desarrollo neuronal y respuesta relacionada con el daño en los *checkpoint* ó puntos de regulación. Las septinas polimerizan entre ellas de forma hetero-oligomérica u homo-oligomérica para formar estructuras superiores o filamentos que se asocian con las membranas celulares, los filamentos de actina y los microtúbulos. Otra función que tienen las septinas es prevenir la degradación de proteínas como c-Jun-k-n-terminal kinasa (JNK) y la agregación de la sinucleína (**Chao et al., 2009**). El ensamblaje de estas proteínas es regulado por la proteína *cell division control protein 42 homolog* (*cdc42*) y mediante fosforilación. Su asociación a membrana, a veces, ocurre a través de proteínas adaptadoras como la anilina.

Existe una estrecha relación entre el grupo anterior y los grupos de las proteínas de unión y del transporte vesicular (8% en cada caso), ya que el citoesqueleto se encuentra asociado al transporte de vesículas (neurotransmisores, lípidos, proteínas de membrana...) directamente o indirectamente mediado por proteínas de unión.

En el cerebro de pacientes o bien de ratas con un modelo de EH, las neuronas presentan una morfología normal, en cambio los astrocitos, desde un punto de vista histológico, presentan una morfología que se conoce como astrocitos tipo II de Alzheimer. Se caracterizan por edematización con crecimiento nuclear, nucléolo prominente y marginación del patrón de cromatina. Las funciones alteradas de estos astrocitos, así como la interacción, no sólo entre ellos, sino con las neuronas, son importantes en la patología de la EH. Las funciones desempeñadas por los astrocitos comienzan en la neurogénesis y el desarrollo del individuo, sirviendo de andamios para la migración y el crecimiento adecuado de las neuronas, definen la orientación de las señales y participan en la proliferación neuronal. En el período adulto mantienen la homeostasis neuronal (neurotransmisión, regulación del medio iónico, etc) y la plasticidad sináptica, son constituyentes principales de la barrera hematoencefálica y capturan las sustancias que requieren de transporte desde la sangre al cerebro. En este cambio morfológico del astrocito podrían estar implicadas todas aquellas proteínas, que, de alguna manera, están asociadas a la red que conforma, no sólo la arquitectura del astrocito,

sino que dirige el tráfico vesicular en el interior, el citoesqueleto y proteínas asociadas. Hacemos referencia a la α -internexina, tubulina, espectrina y a las septinas (SEPT3, SEPT5, SEPT6), que como hemos visto se encuentran modificadas por el estrés oxidativo causado por el estado de hiperamonemia. Desde un punto de vista general, no sólo estas proteínas podrían estar implicadas en el cambio morfológico del astrocito, si no que habría que hacer referencia a todas aquellas interconexiones entre los componentes del citoesqueleto (microtúbulos, microfilamentos de actina- miosina, filamentos intermedios) y proteínas que ayudan tanto a la formación- degradación de los miembros del citoesqueleto (septinas, vinculina...) así como a su movimiento (troponina...) o al transporte de moléculas, orgánulos o vesículas (transporte axonal) que forman parte de la fisiología de la propia célula o que van a ser secretadas al exterior (exocitosis).

Por una parte, hay que recordar que todo lo referente al tráfico vesicular en el interior celular, transporte axonal (**Figura-R&D50**), está asociado a microtúbulos y a los filamentos de actina. En las neuronas los microtúbulos forman haces que recorren las prolongaciones celulares (dendritas y axón). Muy relacionado con los microtúbulos axónicos hay neurofilamentos y orgánulos, principalmente retículo endoplasmático liso y mitocondrias (**Paniagua et al., 2007**). Durante este transporte axonal también se transportan moléculas desde el citoplasma al retículo, a Golgi y al terminal axónico o bien a la membrana plasmática. Todo ello se realiza mediante la formación de vesículas, las cuales van madurando (su interior se acidifica, captan ATP, Ca^{2+} , se reordenan las proteínas que van destinadas a la membrana e incluso aquellas que forman parte de la propia vesícula) a lo largo de ese proceso. Hemos visto que la ATPasa de vesículas de fusión se encuentra oxidada, pudiendo pensar que ello contribuye al desequilibrio del transporte endocítico y en consecuencia podría afectar al metabolismo neuronal y a la composición propia de las neuronas y de los astrocitos, estados presentes en la EH.

Como consecuencia del cambio del volumen celular (*swelling*) o debido a ello, se producen cambios en la expresión y/o modificaciones en proteínas del citoesqueleto (**Häussinger, 1996**). Los microtúbulos juegan un papel

importante en la transducción de señales que se generan como consecuencia de las alteraciones metabólicas en respuesta a los cambios de volumen celular. Por ejemplo, la disrupción de los microtúbulos con colchicina reduce: la alcalinización de las vesículas endocíticas inducidas por el edema; la inhibición de la proteólisis; y la estimulación del transporte transcelular de los ácidos biliares. Todo ello como consecuencia de cambios en el estado de fosforilación y desfosforilación de las proteínas asociadas a microtúbulos y de las proteínas MAP kinasas. Además en el edema celular ocurre un incremento en la polimerización de la β -actina e incrementos en la estabilidad de los microtúbulos. Con todo ello se podría establecer una conexión entre el citoesqueleto, las proteínas asociadas a él, el edema y el cambio morfológico de los astrocitos.

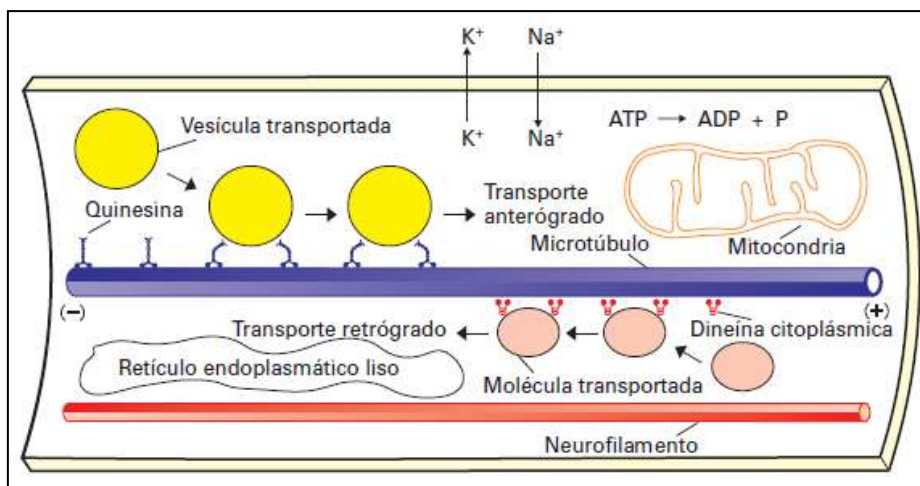


Figura-R&D50. Representación esquemática de posibles mecanismos del transporte axónico. La quinesina participa en el transporte anterógrado (dirección hacia el extremo del axón respecto del cuerpo neuronal o soma) y la dineína citoplasmática en el transporte retrógrado (dirección desde el axón hacia el soma) (**Paniagua et al., 2007**).

Desde los años 80 existen descripciones de autores que describen que los mecanismos de toxicidad del amonio generan alteración del metabolismo de las enzimas/proteínas (**Cooper and Plum, 1987; Noremberg, 1981**), y, más recientemente, estrés oxidativo (**Murthy et al., 2000**). Nosotros hemos encontrado que un 33% del total de proteínas en corteza cerebral y cerebelo de

ratas-*dpc* presentaban un elevado estado de oxidación. Esto enlazaría el hecho de que el estado de hiperamonemia genera tanto estrés oxidativo como alteración en el metabolismo, lo cual hace pensar que no sólo las alteraciones en el metabolismo podrían ser originadas por el estado de hiperamonemia, sino, también podría estar influenciada por el estado oxidativo creado.

A principios de este siglo, el grupo de Butterworth sugirió la inhibición del ciclo de Krebs tanto a nivel de la piruvato deshidrogenasa como de la α -cetoglutarato deshidrogenada (**Zwingmann *et al.*, 2003**), ambos pasos limitantes del metabolismo oxidativo. Nosotros hemos descrito la oxidación de la piruvato deshidrogenasa generada por el estado de hiperamonemia. Podríamos pensar que esa oxidación podría ser una de las causas por la cual esta enzima aparece inhibida en estados de hiperamonemia.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La derivación porto-cava en ratas es un buen modelo de Encefalopatía Hepática, que mimetiza un estado de hiperamonemia crónica y disfunción hepática, caracterizado por la elevación del amonio en sangre y en otros tejidos como en el cerebro.
2. Las ratas-*dpc* muestran un claro estado de estrés oxidativo, como se refleja en los siguientes parámetros (biomarcadores):
 - a) Los niveles de “oxidantes activos” (ERO y ERN) medidos por el método de la DCFH-DA, son el doble en ratas hiperamonémicas (*dpc*) que en ratas controles (*sham*).
 - b) El incremento en la producción de NO en el tejido cerebral de ratas-*dpc*, que podría interpretarse como la inducción de la NO-sintetasa inducible (NOS-II_i) de la microglía, por parte del amonio.
 - c) Los niveles de peroxidación lipídica medidos como TBARS, MDA y HNE son más elevados en las ratas-*dpc* que en ratas-*sham*, lo que indica que el estrés oxidativo causado por la enfermedad aumenta los niveles de peroxidación lipídica.
 - d) La oxidación de proteínas (medida como los niveles de grupos carbonilos) es un 50% mayor en ratas hiperamonémicas (*dpc*) que en ratas control (*sham*), demostrando que la oxidación de proteínas ocurre de manera clara en la EH.
3. No se ha encontrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto al patrón de expresión diferencial de proteínas ni en cerebelo ni en corteza analizada mediante DIGE, lo cual reforzaría el hecho de que las modificaciones que ocurren podrían ser post-traduccionales.
4. En estudios preliminares sobre la oxidación de proteínas (carbonilación) en ratas con *dpc* se observó que los animales hiperamonémicos presentaban

un mayor nivel de oxidación que los animales control (ratas-*sham*) y que no todas las proteínas se oxidan por igual, habiendo proteínas más sensibles a la oxidación que otras.

El estudio detallado de las proteínas oxidadas mediante técnicas proteómicas (*Redox-proteomic*) pone de manifiesto que estas proteínas están implicadas en diferentes procesos celulares y/o metabólicos:

- el 33% implicadas en el metabolismo energético (ciclo de Krebs, metabolismo de los carbohidratos, de los compuestos nitrogenados y de los xenobióticos) (isocitrato deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, glutamina sintetasa, creatina quinasa, aminopeptidasa sensible a purinomicina, aminopeptidasa B y la aldehído deshidrogenasa mitocondrial)
- el 8% relacionadas con las proteínas de unión (en cascada de señalización celular del sistema GABA-glutamato, en el hinchazón de los astrocitos así como en el ensamblaje y plegamiento de las moléculas) (proteína G y Grp75)
- el 8% implicadas en el transporte mediado por vesículas (ATPasa de fusión y Snap2)
- el 33% forman parte del citoesqueleto de las células (α -internexina, espectrina, tubulina, rCG49429, septina 3, septina 5, septina 6, rCG46767)
- el 8% implicadas en la regulación de la expresión génica (sintetasa ARN_{t-Ala}, y el precursor del factor de elongación Tu)
- el 5% relacionadas con la maquinaria previa al proteasoma (enzima activadora de la ubiquitina, E1)
- el 5% clasificada en otros (albúmina sérica)

5. La alteración de la mayor parte de estas proteínas puede relacionarse con la fisiopatología de la EH, por lo que su identificación y caracterización (llevada a cabo en este estudio) nos permitirá profundizar en el conocimiento de la fisiopatología de la EH y posiblemente utilizarlas como dianas para prevenir y/o tratar esta patología.

CONCLUSIONS

1. Portacaval-anastomosis (*pcs*) in rats is a suitable animal model for Hepatic Encephalopathy (HE). Such intervention induces chronic hyperammonemia and hepatic dysfunction, characterized with an ammonia increase in both, blood and brain.

2. According to oxidative biomarkers, *pcs*-rats show a clear oxidative stress induction:
 - a) “Reactive Oxygen Species” and “Reactive Nitrogen Species” levels measured with the DCF-DA method are 2,4-fold higher in hyperammonemic rats (*pcs*) compared in control rats (*sham*).
 - b) Increased generation of nitric oxide in the brain of *pcs*-rats suggests ammonia-induced expression of iNOS in the microglia.
 - c) Lipidic peroxidation levels measured by TBARS, MDA and HNE are found to be higher in *pcs*-rats compared to *sham*-rats. These data suggest that the increased lipid peroxidation is a consequence of the oxidative stress induced by this metabolic alteration.
 - d) Protein oxidation (measured as carbonyl groups) is 50% higher in hyperammonemic rats (*pcs*) than in control rats (*sham*) which is a consequence of oxidative stress.

3. There are not significant differences in protein expression in samples of cortex and cerebellum analyzed by DIGE. These findings agree with the hypothesis that post-translational modifications are one of the main causes implicated in HE induced hyperammonemia.

4. Hyperammonemic animals showed increased and differential levels of protein oxidation. These oxidized proteins can be classified into different cellular process:

- 33% in energy-related metabolism (Krebs cycle, carbohydrate metabolism) or in nitrogen and xenobiotics metabolism (aminopeptidase puromycin sensitive; dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex; mitochondrial aldehyde dehydrogenase precursor; Glul protein; Arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B); L-lactate dehydrogenase B chain; isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha, isoform CRA_f; Ckb protein).
- 8% related with binding proteins (in GABA-glutamate cellular signalling pathway, in astrocytes swelling and in assembly and folding proteins) (protein G; grp75).
- 8% related with transport process involving vesicles trafficking (Snap2 protein; vesicle-fusing ATPase).
- 33% are members of cell cytoskeleton (Tubulin, alpha 1A; spectrin alpha chain, brain; rCG46767, isoform CRA_c; alpha-internexin; rCG53214, isoform CRA_a; rCG49429; septin 3, isoform CRA_a; CDCrel-1A1).
- 8% are related with gene expression regulation (alanyl-tRNA synthetase; cytoplasmic, elongation factor Tu, mitochondrial precursor).
- 5% are involved in the initial steps of proteasome pathway (ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1)
- 5% are involved in other functions

5. Changes in the most of these proteins can be related with the pathophysiology of the Hepatic Encephalopathy, therefore, their identification and characterization (shown in this study) can be useful in the knowledge of the HE pathophysiology and can be used as therapeutic target to prevent and/or treat this pathology.

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES EN REVISTAS NACIONALES E INTERNACIONALES:

- Carbonero-Aguilar, P., Díaz-Herrero, MM., Cremades, O., Romero-Gómez, M., Bautista, J. Brain Biomolecules oxidation in portacaval-shunted rats. *Liver International* 2011; 31(7): 964-969.
- Cremades, O., Carbonero-Aguilar, P., Díaz-Herrero, MM., Alvarez-Ossorio Pastor, C., Fontiveros Heredia, E., et al. Obtención y Caracterización de Preparados de Champiñón Ricos en Selenio: Alimentos Funcionales para la Prevención de Enfermedades Asociadas al Estrés Oxidativo. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*. Vol. 31. Núm. 1. 2011. Pag. 68-68.
- Carbonero-Aguilar, P., Diaz-Herrero, MM., Felipo, V., Romero-Gómez, M., Bautista, J. Differential Protein Expression in the Cerebellum of Portocaval-Shuted Rats: a Dige/ Ms Study. *Journal of Hepatology* 2010; 52 (S1): 203-203
- Carbonero-Aguilar, P., Diaz-Herrero, MM., Felipo, V., Romero-Gómez, M., Bautista, J. Expresión Diferencial de Proteínas en Cerebelo de Ratas con Derivación Porto-Cava: un Estudio Dige/Ms. *Gastroenterología y Hepatología* 2010; 33: 141-141
- Díaz-Herrero, MM., del Campo Castillo, JA., Carbonero-Aguilar, P., Jover-Cobos, M., Vega Pérez, JM., et al. Thdp-17 Inhibits the Glutaminase Activity in Caco-2 Cell Cultures. *Journal of Hepatology* 2010; 52 (S1): S70-S71.
- Jover, Cobos, M., Carbonero-Aguilar, P., Díaz-Herrero, MM., Camacho Benítez, I., Bautista, J. et al. Estudio Proteomico Cuantitativo en Cerebro de Ratas Sometidas a Derivacion Porto-Cava. *Gastroenterología y Hepatología* 2008; 31: 114-114

TRABAJOS EN REDACCIÓN:

- Carbonero-Aguilar, P., Díaz-Herrero, MM., Romero-Gómez, M., Bautista, J. Protein carbonilation in the brain of pcs-rats(Role of oxidative stress and brain protein carbonylation in the pathogenesis of hepatic encephalopathy).
- Carbonero-Aguilar, P., Díaz-Herrero, MM, Casco-Lorente, B., Romero-Gómez, M., Bautista, J. Imprivement of pcs-rats by a treatment with a diet enriched in selenium, ergothioneine and branched chain amino acids.
- Candiraci, M., Castaño A., Santa María, C., Revilla, C., Domínguez-Barragán, M., Rodríguez-Morgado, B., Carbonero-Aguilar, P., Bautista, J, Parrado, J. Antioxidant and anti-inflammatory properties of a new soluble extract from grape pomace (a *Pytochemical Reviews*)

APORTACIONES A CONGRESOS:

- Carbonero-Aguilar, P., Díaz-Herrero, MM., Felipo, V., Romero-Gómez, M., Bautista, J. Diferencial de Proteínas en Cerebelo de Ratas con Derivación Porto-Cava: un Estudio Dige/Ms. *Gastroenterología y Hepatología*, XXXV Congreso Anual de la Fundación/ Asociación Española para el Estudio del Hígado, Madrid (España) 2010; 33:141-141.
- Carbonero-Aguilar, P., Díaz-Herrero, MM., Felipo, V., Romero-Gómez, M., Bautista, J. Differential Protein Expression in the Cerebellum of Portocaval-Shuted Rats: a Dige/ Ms Study. The International Liver Congress, 45th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver, *Journal of Hepatology*, Viena (Austria) 2010; 52: 203-203.
- Díaz-Herrero, MM., Campo Castillo, JA., Carbonero-Aguilar, P., Jover, M, Vega Perez, JM., Iglesias Guerra, F., Periñán Domínguez, I., Bautista J., Romero-Gómez M. Thdp-17 Inhibits the Glutaminase Activity in Caco-2 Cell Cultures. *Journal of Hepatology* , 2010; 52: S70-S71.

- Carbonero, P., Díaz-Herrero, MM., Felipo, V., Romero-Gómez, MM., Bautista, J. Expresión diferencial de proteínas en cerebelo de ratas con derivación porto-cava: un estudio DIGE/MS. International Symposium on Hepatic Encephalopathy. Cátedra Santiago Grisolia. Fundación Ciudad de las Artes y las Ciencias, Valencia (España) 2009.
- Jover, M., Carbonero-Aguilar, P., Díaz-Herrero, MM., Camacho, I., Benítez, Bautista, J., Felipo, V., Romero-Gómez, M. Estudio Proteómico Cuantitativo en Cerebro de Ratas Sometidas a Derivacion Porto-Cava. XXXII Congreso Anual de la Fundación y Asociación Española para el estudio del Hígado, *Gastroenterología y Hepatología*, Córdoba (España) 2008; 31: 114-114.
- Carbonero, P., Bautista, J. Efecto de la Hiperamonemia Sobre la Oxidacion de Proteinas de Ratas con Derivacion Porto-Cava. XXXI Congreso Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). País Vasco (España) 2008.

PROYECTOS:

Proyectos:

- Tratamiento nutricional de la encefalopatía hepática: Una aproximación nutrigenómica ([P06-CTS-01887](#)). Investigador responsable: Juan D. Bautista Palomas. Participación: como Becaria.
- Study of brain proteins expression in hyperammonemic-rats (an animal model of hepatic encephalopathy): a proteomic approach ([DEC2009-0098](#)). Investigador responsable: Juan D. Bautista Palomas. participación: como investigadora.

Contratos 68/83:

- Estudios sobre la aplicación y/o utilización del productos derivados de *Pocambarus clarkii* como alimentos funcionales ([OG-038/08](#)).

Investigador responsable: Juan D. Bautista Palomas. Participación:
como investigadora.

- Desarrollo de elicitores inductores de respuesta sistemática en plantas ([OG-176/07](#)). Investigador responsable: Juan D. Bautista Palomas. Participación: como investigadora.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

A)

- Ahboucha, S., Desjardins, P., Chatauret, N., Pomier-Layrargues, G., Butterworth, RF. Normal coupling of brain benzodiazepine and neurosteroid modulatory on the GABA-A receptor complex in human hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 2003; 43:551-556.
- Ahboucha, S., Butterworth, RF. The neurosteroid system: an emerging therapeutic target for hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2007; 22:291-308.
- Alamdari, D. H., Kostidou, E., Paletas, K., Sarigianni, M., *et al.*, High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of protein. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 39: 1362–1367.
- Alban, A., David, SO., Bjorkesten, L., Andersson, C., Sloge, E., Lewis, S., *et al.* A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* 2003; 3: 36–44
- Albrecht, J., Norenberg, MD. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 2006; 44:788-794.
- Albrecht, J., Zienlinska, M., Norenberg, MD. Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. *Biochemical Pharmacology* 2010; 80: 1303-1308.
- Allen, R. G., Tresini, M., Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28: 463–499.
- Alvarez, B., Radi, R., Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 2003; 25: 295–311.
- Antoni, M. Hepatic Encephalopathy: from pathophysiology to treatment. *Digestion* 2006; 73:86-93.
- Aschner, M., Gannon, M., Kimelberg, HK. Manganese uptake and efflux in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 1992; 58(2): 730-735.

B)

- Bai, G., Rama Rao, KV., Murthy, ChRK., Panikar, AR., Jayakumar, MD., Norenberg, MD. Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rats astrocytes. *J Neurosci Res* 2001; 66: 981-991.
- Bautista, J.; Corpas, R.; Ramos, R.; Cremades, O.; Gutiérrez, J.F.; Alegre, S. Brain mitochondrial complex I inactivación by oxidative modification. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000; 275:890-894.
- Baynes, J. W., Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405–412.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., Freeman, B. A., Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 1620–1624.
- Beckman, J. S., Koppenol, W. H., Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* 1996; 271: 40–45.
- Bélanger, M., Desjardins, P., Chatauret, N., Butterworth, RF. Loss of expression of glial fibrillary acid protein in acute hyperammonemia. *Neurochem Int.* 2002; 41(2-3): 155-160.
- Bemeur, Ch., Desjardins, P., Butterworth, RF. Evidences for oxidative/nitrosative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2010; 25: 3-9.
- Bergenhem, N., Carlsson, U., Strid, L., The existence of glutathione and cysteine disulfide-linked to erythrocyte carbonic anhydrase from tiger shark. *Biochim. Biophys. Acta* 1986; 871: 55–60.
- Berlett, BS., Stadtman, ER. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272: 20313-20316.
- Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., Frank, J. S., *et al.*, Atherosclerosis: Basic mechanisms: Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995; 91: 2488–2496.
- Berliner, J. A., Heinecke, J. W., The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 1996; 20: 707–727.
- Bhutani, N., Venkatramam, P., Goldberg, AL. Puromycin-sensitive aminopeptidase is the major peptidase responsible for digesting polyglutamine sequences released by proteasome during protein degradation. *The EMBO Journal* 2007; 26: 1385-1396.

- Bismuth, M., Funakoshi, N., Cadranel, J-F., Blanc, P. Hepatic Encephalopathy: from pathophysiology to therapeutic management. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2010; 23(1):8-22.
- Blackshear, PJ. Systems for polyacrylamide gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.* 1984; 104: 237-255
- Blutke, A., Block, C., Berendt, F., Herbach, N., Kemter, E., Amann, K., Frölich, T., Arnold, GJ, Wanke, R. Differential glomerular proteome analysis of two murine nephropathy models at onset of albuminuria. *Proteomics Clin Appl.* 2011; 5(5-6):375-81.
- Bonetto V. and Ghezzi P. Thiol-disulfide oxidoreduction of protein cysteines: Old methods revised for proteomics. In: *Redox Proteomics. From protein modifications to cellular dysfunction and diseases* (Edited by: I. Della-Donne, A. Scaloni, D.A. Butterfield), pp. 101-122. Wiley-Interscience (2006).
- Boulton, CL., Southan, E., Garthwaite, J. Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neurochem.* 1995; 69: 699-703.
- Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Brück, J., Görg, B., Bidmon, H-J., Zemtsova, I., Qvartskava, N., Keitel, V., Kirches, G., Häussinger, D. Locomotor impairment and cerebrocortical oxidative stress in portal vein ligated rats in vivo. *Journal of Hepatology* 2011; 54:252-257.
- Budde, P. P., Kumagai, A., Dunphy, W. G., Heald, R., Regulation of Op18 during spindle assembly in *Xenopus* egg extracts. *The Journal of Cell Biology* 2001; 153: 149-157.
- Burcham, P. C., Kuhan, Y. T., Introduction of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product, malondialdehyde. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 220: 996-1001.
- Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Domigan, N. M., Winterbourn, C. C., Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 23: 361-366.
- Butterfield, DA., Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: Implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic. Res.* 2002; 36: 1307-1313.

- Butterfield, DA., Amyloid beta-peptide [1-42]-associated free radical-induced oxidative stress and neurodegeneration in Alzheimer's disease brain: Mechanisms and consequences. *Curr. Med. Chem.* 2003; 10: 2651–2659.
- Butterfield, DA., Proteomics: A new approach to investigate oxidative stress in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* 2004; 1000: 1–7.
- Butterfield, DA., Drake, J., Pocernich, C., Castegna, A., Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: Central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol. Med.* 2001; 7: 548–554.
- Butterfield, DA., Castegna, A., Lauderback, C. M., Drake, J., Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol. Aging* 2002; 23: 655–664.
- Butterworth, RF. Images of brain in chronic liver failure. *J Hepatol* 2001; 35(5): 661-662.
- Butterworth, RF. Neurotransmitter dysfunction in hepatic encephalopathy: new approaches and new findings. *Metab Brain Dis* 2001; 16:55-65.
- Butterworth, RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metab Brain Dis* 2002; 17:221-227.
- Butterworth, RF. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: new insights from neuroimaging and molecular studies. *J Hepathol* 2003; 39:278-285.
- Butterworth, RF. Altered glial-neuronal crosstalk: cornerstone in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochemistry International* 2010; 57: 383-388.
- Butterworth, RF., Spahr, L., Fontaine, S., Layrargues, GP. Manganese toxicity, dopaminergic dysfunction and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 1995; 10: 259-267.

C)

- Carbonero-Aguilar, P., Díaz-Herrero, MM., Cremades, O., Romero-Gómez, M., Bautista, JD. Brain biomolecules oxidation in portocaval-shunted rats. *Liver International* 2011; 31(7): 964- 969.
- Casco-Lorente, B. Tesis doctoral: Papel de los aminoácidos ramificados en la malnutrición asociada a enfermedades que cursan a través de vías hipercatabólicas. Universidad de Sevilla, 2008.

- Cerutti, PA., Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 1985; 227: 375–381.
- Cerutti, PA., Oxidant stress and carcinogenesis. *Eur. J. Clin. Invest.* 1991; 21: 1–5.
- Cerutti, PA., Oxyradicals and cancer. *Lancet* 1994; 344: 862–863.
- Chan, H., Butterworth, RF. Glutamatergic synaptic regulation déficit in liver failure; a review of molecular mechanisms. In: Haüssinger, D., Kircheis, G., Schkiess, F (Eds.). *Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism*. Springer, Dordrecht 2006; 160-170.
- Chao, L., Yu, W., Wu, Y., Yu, L. The evolution complex structures and function of septin proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2009; 66: 3309-3323.
- Choi, J., Malakowsky, CA., Talent, JM., Conrad, CC., Gracy, RW., Identification of oxidized plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 293: 1566–1570.
- Claiborne, A., Miller, H., Parsonage, D., Ross, RP., Proteinsulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation. *FASEB J.* 1993; 7: 1483–1490.
- Collantes-de Terán, L. Tesis doctoral: Aproximación proteómica cuantitativa del enterocito y su relación con la Encefalopatía Hepática. Universidad de Sevilla, 2008.
- Conrad, CC., Talent, JM., Malakowsky, CA., Gracy, RW. Post-electrophoretic identification of oxidized proteins. *Bio Proced Online.* 2002; 2: 39-45.
- Cooper, AJ., Lai, JC. Cerebral ammonia metabolism in normal and hyperammonemic rats. *Neurochem Pathol* 1987; 6(1-2):67-95.
- Cooper, AJ, Plum, F. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol.Rev.* 1987; 67:440-519.
- Córdoba, J., Alonso, J., Rovira, A., Jacas, C., Sanpedro, F., Castells, L., Vargas, V., Margarit, C., Kulisevsky, J., Esteban, R., Guardia, J. The development of low-grade cerebral edema in cirrosis is supported by the evolution of ¹H-magnetic resonance abnormalities after liver transplantation. *J Hepatol* 2001; 35:598-604.
- Curthoys, NP., Watford, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annual Rev Nutr* 1995; 15:133-159.

- Curthoys, NP. Role of mitochondrial glutaminase in rat renal glutamine metabolism. *J Nutr* 2001; 131: 2491-2495.
- Curthoys, NP. and Gstraunthaler, G. Mechanism of increased renal gene expression during metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: 381-390.

D)

- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003a; 329: 23-38.
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.* 2003b; 9: 169–176.
- Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., *et al.*, Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* 2005; 24: 55–99.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A., Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.* 2006; 52: 601–623 (a).
- Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Butterfield, D. A., *Redox Proteomics: From Protein Modifications to Cellular Dysfunction and Diseases*, Wiley & Sons, New York 2006 (b).
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Colombo, R., Milzani, A., S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 43: 883–898.
- Davies, MJ., The oxidative environment and protein damage. *Biochim. Biophys. Acta* 2005; 1703: 93–109.
- Di Carli M., Zamboni A., Pe ME., Pezzotti M., Lilley KS., Benvenuto E., and Desiderio A. Two-Dimensional Differential in Gel Electrophoresis (2D-DIGE) Analysis of Grape Berry Proteome during Postharvest Withering. *J. Proteome Res.*, 2011; 10: 429–446.
- Di Marco, T., Giulivi, C., Current analytical methods for the detection of dityrosine, a biomarker of oxidative stress, in biological samples. *Mass Spectrom. Rev.* 2007; 26: 108–120.
- Dormann, P., Borchers, T., Korf, U., Hojrup, P., *et al.*, Amino acid exchange and covalent modification by cysteine and glutathione explain isoforms of fatty acid-binding protein occurring in bovine liver. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 16286–16292.

E)

- Eiserich, JP., Patel, RP., O'Donnell, VB., Pathophysiology of nitric oxide and related species: Free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol. Aspects Med.* 1998; 19: 221–357.
- England, K., Cotter, T., Identification of carbonylated proteins by MALDI-TOF mass spectroscopy reveals susceptibility of ER. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 320: 123–130.
- Erceg S., Monfort P., Hernandez-Viadel M., Llansola M., Montoliu C., Felipe V. Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain Research* 2005; 1036: 115-121.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186: 407–421.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H., Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 1991; 11: 81–128.
- Evans, P., Lyras, L., Halliwell, B. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Methods Enzymol.* 1999; 300: 145-156.

F)

- Fagan, JM., Slecicka, BG., Sohar, I., Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999; 31: 751–757.
- Faint, V. The pathophysiology of hepatic encephalopathy. *British association of critical care nurses, nursing in critical care* 2006; 11(2): 69-74.
- Ferenci, P. Pathophysiology of hepatic encephalopathy. *Hepatogastroenterology* 1991; 38: 371-376.
- Ferenci, P., Lockwood, A., Mullen, K., Tarter, R., Weissenborn, K., Blei, AT. Hepatic Encephalopathy-Definition, nomenclature, Diagnosis and quantification: Final report of the working party at the 11th world congress of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 2002; 35:716-721.
- Finkel, T., Redox-dependent signal transduction. *FEBS Letters* 2000; 476:52–54.
- Floyd R, Carney J. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol* 1992; 32:S22–S27.

- Forrester, MT., Stamler, JS., A classification scheme for redox-based modifications of proteins. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2007; 36: 136–137.
- Fratelli, M., Gianazza, E., Ghezzi, P., Redox proteomics: identification and functional role of glutathionylated proteins. *Expert Rev. Proteomics* 2004; 1:365–376.
- Frölich, T., Arnold, GJ., Fritsch, R., Mayr, T., Laforch, T. LC-MS/MS-based proteome profiling in *Daphnia pulex* and *Daphnia longicephala*: the *Daphnia pulex* genome database as a key for high throughput proteomics in *Daphnia*. *BMC Genomics* 2009; 10:171.
- Fu, X., Mueller, DM., Heinecke, JW., Generation of intramolecular and intermolecular sulfenamides, sulfinamides, and sulfonamides by hypochlorous acid: A potential pathway for oxidative cross-linking of low-density lipoprotein by myeloperoxidase. *Biochemistry* 2002; 41: 1293–1301.

G)

- Gharbi, S., Gaffney, P., Yang, A., Zvelebil, MJ., Cramer, R, Waterfield, MD., Timms, JF. Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system. *Molecular & Cellular Proteomics* 2002; 1: 91-98.
- Goldstein, S., Czapski, G., Lind, J., Merenyi, G., Tyrosine nitration by simultaneous generation of NO[•] and O₂^{•-} under physiological conditions. How the radicals do the job. *J Biol. Chem.* 2000; 275: 3031–3036.
- Görg, B., Foster, N, Reihner, R., Bidmon, HJ., Höngen, A., Häussinger, D., Schliess, F. Benzodiazepine-induced protein tyrosine nitration in astrocytes. *Hepatology* 2003; 37:334-342.
- Görg, A., Weiss, W., and Dunn, MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 2004; 4(12): 3665-3685.
- Gregorios, JB., Mozes, LW., Norenberg, MD. Morphologic effects of ammonia on primary astrocytes cultures. II. Electron microscopic studies. *J Neuropathol Exp Neurol* 1985; 44:404-414.
- Grune, T., Reinheckel, T., Davies, K. J. A., Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* 1997; 11: 526–534.
- Grune, T., Merker, K., Sandig, G., Davies, K. J. A., Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 305: 709–718.
- Grune T, Jung T, Merker K, Davies KJ. Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and

'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36: 2519-2530.

- Gygi SP., Rist, B., Gerber SA., Turecek F., Gelb MH. and Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology* 1999; 17:994–999.
- Gygi, SP., Corthals GL., Zhang Y., Rochon Y. and Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; 97: 9390-9395.

H)

- Hamdan, M., Righetti, PG. Modern strategies for protein quantification in proteome analysis: advantages and limitations. *MMass Spectrom. Rev.* 2002; 21(4): 287-302) (Ryley, HC. Isolation and partial characterisation of a thiol proteinase inhibitor from human plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1979; 89 (3): 871-878.
- Hahn, M., Massen, O., Nenecki, M., Pavlov, J., Die Eck'she fistel swischen der unteren hohlvene und der pfortader und ihre folgen für den organismos. *Arch Exp Pathol Pharm* 1983; 32:161-210.
- Häussinger D. The role of celular hydration in the regulation of cell function. *Biochem J* 1996; 313: 697-710.
- Häussinger, D., Kircheis, G., Fischer, R., Schleiss, F., vom Dahl, S. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low grade oedema? *Hepatology* 2000; 32: 1035–1038.
- Häussinger, D., Schliess, F., Kircheis, G. Pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2002; 17: 256-259.
- Hawcross, DL., Shabbir, SS., Taylo, NJ., Hughes, RD. Ammonia and the eutrophil in the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 2010; 51: 1062–1069.
- Hawkins, C. L., Davies, M. J., Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 2001; 1504: 196–219.
- Hazell, AS., Desjardins, P., Butterworth, RF. Chronic exposure of rat primary astrocyte cultures to manganese results in increased binding sites for the "peripheral-type" benzodiazepine receptor ligand ³H-PK11195. *Neurosci Lett* 1999; 271: 5-8.

- Headlam, HA., Davies, MJ., Markers of protein oxidation: Different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 36: 1175–1184.
- Herneth, AM., Steindl, P., Ferenci, P., Roth, E., Hörtnagl, H. Role of tryptophan in the elevated serotonin-turnover in hepatic encephalopathy. *J Neural Transmission* 1998; 105(8-9): 975-986.
- Herrlich, P., Boehmer, F. D., Redox regulation of signal transduction in mammalian cells. *Biochem. Pharmacol.* 2000; 59: 35–41.
- Heukeshoven, J., Dernick, R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 1985; 6: 103-112.
- Hilfielt, B., Plum, F., Duffy, TE. Effects of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portocaval shunts. *J Clin Invest* 1997; 59: 386-396.
- Hilgier, W., Haugvicova, R., Albrecht, J. Decreased potassium-stimulated release of [³H]D-aspartate from hippocampal slices distinguishes encephalopathy related to acute liver failure from that induced by simple hyperammonemia. *Brain Res* 1991; 567:165-168.
- Hilgier, W., Puka, M., Albrecht, J. Characteristics of large neutral amino acid-induced release of preloaded glutamine from rat cerebral capillaries in vitro: effects of ammonia, hepatic encephalopathy and γ -glutamyltranspeptidase inhibitors. *J Neurosci* 1992; 32: 221-226.
- Hogg, N., The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002; 42: 585–600.
- Hu, S., Sheng, WS., Ehrlich, LC., Peterson, PK., Chao, CC. Cytokine effect on glutamate uptake by human astrocytes. *Neuroimmunomodulation* 2000; 7:153-159.
- Huizenga, JR., Tangerman, A., Grips, CH. Determination of ammonia in biological fluids. *Ann Clin Biochem* 1994; 31:529-543.

I)

- Imlay, J. A., Pathways of Oxidative Damage. *Ann. Rev. Microbiol.* 2003; 57: 395–418.
- Iwasa, M., Matsumura, K., Watanabe, Y., Yamamoto, M., Kaiyo, M., Ikoma, J., Gabazza, EC., Takeda, K., Adachi, Y. Improvement of regional cerebral blood flow after treatment with branched-chain amino acid solutions in

patients with cirrhosis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2003; 15:733-737.

J)

- Jalan, R., Hayes, P. Hepatic encephalopathy and ascites. *Lancet* 1997; 350: 1309-1315.
- James, JH., Zipparo, V., Jeppson, B. Hyperammonemia, plasma amino acid imbalance and blood-brain aminoacid transport: a unified theory of portalsystemic encephalopathy. *Lancet* 1979; 2:772-775.
- Jayakumar, AR., Panickar, K., Norenberg, MD. Peripheral benzodiazepine receptor ligands induce the formation of free radicals in cultured neural cells. *Neurochem* 2002; 83:1226-1234.
- Jover, R., Madaria, E., Felipo, V., Rodrigo, R., Candela, A., Compañía, A. Animal models in the study of episodic hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Metabolic Brain Disease* 2005; 20(4): 399-408.
- Jover, M. Tesis doctoral: Papel de la Hiperamonemia sobre la actividad glutaminasa en diferentes tejidos y el estrés oxidativo en ratas sometidas a derivación portocava. Universidad de Sevilla 2006.
- Jurgens, G., Hoff, H. F., Chisolm Iii, G. M., Esterbauer, H., Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation - Characterization and pathophysiological implications. *Chem. Phys. Lipids* 1987; 45:315–336.

K)

- Karp, NA., Lilley, KS. Maximising sensitivity for detecting changes in protein expression: experimental design using minimal CyDyes. *Proteomics* 2005; 5: 3105–3115.
- Kim, JS., He, L., Qian, T., Lemasters, JJ. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Curr Mol Med* 2003; 3:527-535.
- Kim H., Cope MB, Herring R., Robinson G., Wilson L., Page GP., Barnes S. 2D Difference Gel Electrophoresis of Prepubertal and Pubertal Rat Mammary Gland Proteomes. *J. Proteome Res.*, 2008; 7: 4638–4650.
- Kinnula, V. L., Crapo, J. D., Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 36: 718–744.

- Kosenko, E., Venediktova, N., Kaminsky, Y., Montoliu, C., Felipo, V. Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication in vivo. *Brain Res* 2003; 981: 193–200.
- Kristensen, B. K., Askerlund, P., Bykova, N. V., Egsgaard, H., Miller, I. M., Identification of oxidised proteins in the matrix of rice leaf mitochondria by immunoprecipitation and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 2004 65 1839–1851.
- Kurisaki E, Hiraiwa. Western blot analysis for 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)-modified proteins in paraquat-treated mice. *Leg Med* 2009; 11:S431–S433.

L)

- Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- Lai, JC., Cooper, AJ. Brain α -cetoglutarate deshydrogenase: Kinetic properties, regional distribution and effects of inhibitors. *J Neurochem* 1986; 47; 1376-1386.
- Leal, LKAM., Junior, HVN., Cunhaa, GMA., Moraes, MO., Pessoa, C., Oliveira, RA., Silveira, ER., Canuto, KM., Viana, GSB. Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 2005; 388:86–90.
- Lee, S., Young, N. L., Whetstone, P. A., Cheal, S. M., *et al.*, Method to site-specifically identify and quantitative carbonyl end products of protein oxidation using oxidation-dependent element coded affinity tags (O-ECAT) and nanoliquid chromatography Fourier transform mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2006; 5: 539–547.
- Lee I., Schindelin H. Structural Insights into E1-Catalyzed Ubiquitin Activation and Transfer to Conjugating Enzymes. *Cell*, 2008; 134: 268-278.
- Lemberg, A., Fernandez, M.A. Hepatic encephalopathy, ammonia, glutamate, glutamine and oxidative stress. *Annals of Hepathology* 2009; 8(2): 95-102.
- Les, I., Doval, E., Garcia-Martinez, R., Planas, M., Cardenas, G., Gómez, P., Flaviá, M., Jacas, C., Mínguez, B., Vergara, M., Soriano, G., Vila, C., Esteban, R., Córdoba, J Effects of Branched-Chain Amino Acids Supplementation in Patients With Cirrhosis and a Previous Episode of Hepatic Encephalopathy: A Randomized Study. *American Journal of Gastroenterology* 2011; 106:1081-1088.
- Levine, RL., Garland, D., Oliver, CN., Amici, A., Climent, I., Lenz, AG., Ahn, BW., Shaltiel, S., Stadtman, ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*1990; 186: 464–478

- Levine, RL., Williams, JA., Stadtman, ER., Shacter, E., Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994; 233: 346–357.
- Levine, RL., Mosoni, L., Berlett, BS., Stadtman, ER., Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 15036–15040.
- Levine, RL., Berlett, BS., Moskovitz, J., Mosoni, L., Stadtman, ER., Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech. Ageing Dev.* 1999; 107: 323–332.
- Levine, RL., Stadtman, ER., Oxidative modification of proteins during aging. *Exp. Gerontol.* 2001; 36: 1495–1502.
- Levine RL. and Stadtman ER. Carbonylated proteins and their implications in physiology and pathology. In: Redox Proteomics. From protein modifications to cellular dysfunction and diseases (Edited by: I. Della-Donne, A. Scaloni, DA. Butterfield), pp. 123-168. *Wiley-Interscience* (2006).
- Lin, S., Rabe, W. Ammonia intoxication: effects on cerebral cortex and spinal cord. *J Neurochem* 1985; 44:1252-1258.
- Linares, M., Marín-García, P., Méndez, D., Puyet, A., Díez, A., Bautista, JM. Proteomic approach to identifying carbonylated protein in brain tissue. *Journal of Proteome Research* 2010; 10(4):1719-1727.
- Lockwood, AH., McDonald, JM., Reiman, RE., Gelbard, AS., Laughlin, JS., Duffy, TE., Plum, F. The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia. *J Clin Invest* 1979; 63:449-460.
- Lockwood, AH., Weissenborn, K., Butterworth, RF. An image of brain in patients with liver disease. *Curr Opin Neurol* 1997; 10: 525-533.
- Lukoyanova, N., Baldwin, SA., Trinick, J. 3D reconstruction of mammalian septin filaments. *J Mol Biol* 2008; 376:1-7.
- Lyman, SV., Hurst, J. K., Radical nature of peroxynitrite reactivity. *Chem. Res. Toxicol.* 1998; 11: 714–715.

M)

- Macario, AJL., de Macario, EC., Sick chaperones, cellular stress, and disease. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353: 1489–1501.

- Malchiodi-Albedi, F., Ceccarini, M., Winkelmann, JC., Morrow, JS., Petrucci, TC. The 270 kDa splice variant of erythrocyte β -spectrin (β 1S2) segregates in vivo and in vitro to specific domains of cerebellar neurons. *J C Sci* 1993; 106: 67-78.
- Márquez-Aguirre, AL., Canales-Aguirre, AA., Gómez-Pinedo, U., Gálvez-Gastélum, FJ. Aspectos moleculares de la Encefalopatía Hepática. *Neurología* 2010; 25:239-247.
- Master, S., Gottstein, J., Blei, AT. Cerebral blood flow and the development of ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* 1999; 30: 876-880.
- McDermott, W., Adams, R. Episodic stupor associated with an Eck fistula in the human with particular reference to the metabolism of ammonia. *J Clin Invest* 1954; 33:1-9.
- Meany, DL., Xie, HW., Thompson, LV., Arriaga, EA., Griffin, TJ., Identification of carbonylated proteins from enriched rat skeletal muscle mitochondria using affinity chromatography-stable isotope labeling and tandem mass spectrometry. *Proteomics* 2007; 7: 1150–1163.
- Mertens, ANN., Holvoet, P., Oxidized LDL and HDL: Antagonists in atherothrombosis. *FASEB J.* 2001; 15: 2073–2084.
- Mirzaei, H., Regnier, F., Affinity chromatographic selection of carbonylated proteins followed by identification of oxidation sites using tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2005; 77: 2386–2392.
- Mirzaei, H., Regnier, F., Creation of allotypic active sites during oxidative stress. *J. Proteome Res.* 2006; 5: 2159–2168 (a).
- Mirzaei, H., Regnier, F., Enrichment of carbonylated peptides using Girard P reagent and strong cation exchange chromatography. *Anal. Chem.* 2006; 78: 770–778 (b).
- Mirzaei, H., Regnier, F., Identification and quantification of protein carbonylation using light and heavy isotope labeled Girard's P reagent. *J. Chromatogr. A* 2006; 1134: 122–133 (c).
- Mirzaei, H., Regnier, F., Identification of yeast oxidized proteins - Chromatographic top-down approach for identification of carbonylated, fragmented and cross-linked proteins in yeast. *J. Chromatogr. A* 2007; 1141: 22–31.

- Mizzen, LA., Kabling, An., Welcht, WJ. The two mammalian mitochondrial stress proteins, grp75 and hsp58, transiently interact with newly synthesized mitochondrial proteins. *Cell Regulation* 1991; 2:165-179.
- Monfort, P., Corbalán, R., Martínez, L., López-Talavera, JC., Córdoba, J., Felipo, V. Altered content and modulation of soluble guanylate cyclase in the cerebellum of rats with portacaval anastomosis. *Neuroscience* 2001; 104: 1119-1125.
- Monfort, P., Cauli, O., Montoliu, C., Rodrigo, R., Llansola, M., Piedrafita, B., Mlili, N., Boix, J., Agustí, A., Felipo, V. Mechanisms of cognitive alterations in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: Therapeutical implications. *Neurochemistry International* 2009; 55:106-112.
- Montoliu, C., Rodrigo, R., Monfort, P., Llansola, M., Cauli, O., Boix, J., EIMlili, N., Agustí, A., Felipo. Cyclic GMP pathways in hepatic encephalopathy. Neurological and therapeutic implications. *Metab Brain Dis* 2010; 25:39-48.
- Morel, Y., Barouki, R., Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem. J.* 1999; 342: 481–496.
- Morgan, MY., Milson, JP., Sherlock, S. Plasma ratio of valine, leucine and isoleucine to phenylalanine and tyrosine in liver disease. *Gut* 1978; 19:1068-1075.
- Muckart, D., Bhagwanjee, S. Definitions of the systemic inflammatory response syndrome and allied disorders in relation to critically injured patients. *Crit Care Med* 1997; 25:1789-1795.
- Mullen, KD. Hepatic Encephalopathy. In: O'Grady, J., Lake, J., Howdle, P., (eds), *Comprehensive Clinical Hepatology*. London: Mosby (2000).
- Murphy, MP., Packer, MA., Scarlett, JL., Martin, SW., Peroxynitrite: A biologically significant oxidant. *Gen. Pharmacol.* 1998, 31, 179–186.
- Murray TK., Ridley, RM. The effect of dizocilpine (MK-801) on conditional discrimination learning in the rat, *Behav. Pharmacol* 1997; 8: 383– 388
- Murthy, CHRK., Liu, H. and Norenberg, MD. Ammonia-induced free radical production in primary cultures of astrocytes. *J.Neurochem* 2000; 74: S 81 A.
- Murthy, ChRK., Rama Rao, KV., Norenberg, MD. Ammonia induced production of free radicals in primary cultures of rats astrocytes. *J Neurosci Res* 2001; 66: 282-288.

N)

- Nakamura, A., Goto, S., Analysis of protein carbonyls with 2,4-dinitrophenyl hydrazine and its antibodies by immunoblot in two-dimensional gel electrophoresis. *J. Biochem.* 1996; 119: 768–774.
- Nelson, DL., Cox, MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Editorial Omega, New York: *W.H. Freeman and Company* 2008.
- Nicolao, F., Efrati, C., Masini, A., Merli, M., Attili, AF, Riggio, O. Role of determination of partial pressure of ammonia in cirrhotic patients with and without hepatic encephalopathy. *Journal of Hepatology* 2003; 38: 441-446.
- Norenberg, MD. The astrocyte in the liver disease. *Advances in cellular neurobiology* 1981; 2: 303-352.
- Norenberg, MD. The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol* 1987; 6:13-33.
- Norenberg, MD. Astrocyte-ammonia interactions in hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 1996; 16(3): 245-253.
- Norenberg, MD. Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 2003; 37:245–248.
- Norenberg, MD., Martínez-Hernández, A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 1979; 161:303-310.
- Norenberg, MD., Jayakumar, AR., Rama Rao, KV. Oxidative stress in the pathogenesis of the Hepatic Encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* 2004; 19: 313-329.
- Norenberg, MD., Jayakumar, AR., Rama Rao, KV., Panickar, KS. New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* 2007; 22:219-234.
- Numata, M., A modified technique to make a portacaval shunt in rats. *Microsurgery* 1983; 4: 243-244.
- Nystrom, T., Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* 2005; 24: 1311–1317.

O)

- Oakley, BR. An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol* 2000; 10 (12): 537-542.

- Osada, T., Ikegami, S., Takiguchi-Hayashi, K., Yamazaki, Y., Katoh-Fukui, Y., Higashinakawa, T., Sakaki, Y., Takeuchi, T. Increased anxiety and impaired pain response in puromycin-sensitive aminopeptidase gene-deficient mice obtained by a mouse gene-trap method. *J Neurosci* 1999; 19: 6068-6078.
- Osada, T., Watanabe, G., Kondo, S., Toyoda, M., Sakaki, Y., Takeuchi, T. Male reproductive defects caused by puromycin-sensitive aminopeptidase deficiency in mice. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 960-971 (a).
- Osada, T., Watanabe, G., Sakaki, Y., Takeuchi, T. Puromycin-sensitive aminopeptidase is essential for the maternal recognition of pregnancy in mice. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 882-893 (b).

P)

- Pacher, P., Beckman, J. S., Liaudet, L., Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 2007; 87: 315–424.
- Paniagua R., Nistal, M., Sesma., Álvarez-Uría, M., Fraile, B., Anadón, R., José Sáez, F., de Miguel, MPaz. *Citología e Histología Vegetal y Animal*. Ed. *Mac Graw Hill*. New York, 2007.
- Parry, DM., Brosnan, JT. Glutamine metabolism in the kidney during induction of, and recovery from, metabolic acidosis in the rat. *Biochem J* 1978; 174: 387-396.
- Patel, RP., McAndrew, J., Sellak, H., White, CR., *et al.*, Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* 1999; 1411: 385–400.
- Prakash, RD., Mullen, K. Mechanism, diagnosis and management of hepatic encephalopathy. *Gastroenterology & Hepathology* 2010; 7: 515-525.

Q)

- Quijano, C., Romero, N., Radi, R., Tyrosine nitration by superoxide and nitric oxide fluxes in biological systems: Modeling the impact of superoxide dismutase and nitric oxide diffusion. *Free Radical Biology and Medicine* 2005; 39: 728–741.

R)

- Radi, R., Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 4003–4008.
- Rama Rao, VL. Nitric oxide in hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *Neurochem Intern* 2002; 41:161-170.

- Rama Rao, VL., Audet, RM., Butterworth, RF. Increased nitric oxide synthase activities and L-[3H]arginina uptake in brain following portocaval anastomosis. *J Neurochem* 1995; 65:677-681.
- Rama Rao, VL., Audet, RM., Butterworth RF. Increased neuronal nitric oxide synthase expression in brain following portacaval anastomosis. *Brain Res* 1997; 765:169-172 (a).
- Rama Rao, VL., Audet, RM., Butterworth, RF. Portacaval shunting and hyperammonemia stimulate the uptake of L-[3H]arginina but not of L-[3H]nitroarginine into rat brain synaptosomes. *J Neurochem* 1997; 68: 337-343 (b).
- Rama Rao, KV., Chen, M., Simard, JM., Norenberg, MD. Increased aquaporin-4 expression in ammoniatreated cultured astrocytes. *Neuroreport* 2003; 14:2379-2382 (a).
- Rama Rao, KV., Jayakumar, AR., Norenberg, MD. Ammonia neurotoxicity: Role of the mitochondrial permeability transition. *Metabolic Brain Disease* 2003; 18:113-127 (b).
- Rama Rao, KV., Jayakumar, AR., Norenberg, MD. Induction of the mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes by glutamine. *Neurochem Int* 2003; 43:517-523 (d).
- Rahman, I., MacNee, W., Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: Therapeutic approaches. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28: 1405–1420.
- Reeds, PJ and Burrin, DG. Glutamine and the Bowel. *J Nutr* 2001; 131: 2505-2508.
- Reznick, AZ., Packer, L., Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994; 233: 357–363.
- Rhee, SG., Bae, YS., Lee, SR., Kwon, J., Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Science* 2000; 2000(53): p1.
- Robinson, CE., Keshavarzian, A., Pasco, DS., Frommel, TO., Winship, DH., Holmes, EW. Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Anal. Biochem.* 1999; 266: 48–57.
- Rodrigo, R., Erceg, S., Rodríguez-Díaz, J., Saez-Valero, J., Piedrafita, B., Suarez, I., Felipo, V. Glutamated- induced activation of nitric oxide synthase

is impaired in cerebral cortex in vivo in rats with chronic liver failure. *Neurochem.* 2007; 102: 51-64.

- Roe, MR., Xie, HW., Bandhakavi, S., Griffin, TJ., Proteomic mapping of 4-hydroxynonenal protein modification sites by solid-phase hydrazide chemistry and mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2007; 79: 3747–3756.
- Romero-Gómez, M., Ramos-Guerrero, R., Grande, L., Collantes de Terán, L., Corpas, R., Camacho, I., Bautista, JD. Intestinal glutaminase activity is increased in liver cirrosis and correlates with minimal hepatic encephalopathy. *Journal of Hepatology* 2004; 41:49-54.
- Romero-Gómez, M. Role of phosphate-activated glutaminase in the pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* 2005; 20(4):319-325.
- Romero-Gómez, M., Jover, M., Díaz-Gómez, D., Collantes de Terán, L., Rodrigo, R., Camacho, I., Echevarría, M., Felipo, V., Bautista, JD. Phosphate-activated glutaminase activity is enhanced in brain, intestine and kidney of rats following portacaval anastomosis. *World Journal Gastroenterology* 2006; 12(15): 2406-2411.
- Rose, C., Kresse, W., Kettenmann, H. Acute insult of ammonia leads to calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes, an effect of pH. *J Biol Chem* 2005; 280: 20937–2044.
- Rose, C. Effect of ammonia on astrocytic glutamate uptake/ release mechanisms. *J Neurochem* 2006; 97: 11–15.
- Ross, DB., Danielsen, ER., Blumi, S. Proton magnetic resonance spectroscopy: the new gold standard for diagnosis of clinical and subclinical hepatic encephalopathy. *Dig Dis* 1996; 14: 30-39.
- Rose, C., Kresse, W., Kettenmann, H. Acute insult of ammonia leads to calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes and effect of pH. *J Biol Chem* 2005; 280: 20937-20944.

S)

- Shacter, E., Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabol. Rev.* 2000; 32: 307–326.
- Schaus, R. Griess nitrite test in diagnosis of urinary infection. *J. Ann. Med. Assoc.* 1956; 161: 528-529.
- Schliess, F., Foster, N., Görrg, B., Reinehr, R., Häussinger D. Hypoosmofia swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. *Glia.* 2004; 47: 21-29.

- Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*. 1995; 373(6509): 81-83.
- Schliess, F., Görg, B., Fischer, R., *et al.* Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEBJ* 2002; 16: 739-741.
- Schliess, F., Foster, N., Görg, B., Reinehr, R., Häussinger D. Hypoosmofia swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. *Glia*. 2004; 47:21-29.
- Seda, HWM., Hughes, RD., Grove, CD., Williams, R. Inhibition of rats brain Na⁺-K⁺ ATPase activity by serum from patients with fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1984; 4:74-79.
- Seyan, AS., Hughes, RD., Shawcross, DL. Changing face of hepatic encephalopathy: Role of inflammation and oxidative stress. *World Journal of Gastroenterology* 2010; 16:3347-3357.
- Shacter, E., Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabol. Rev.* 2000; 32:307–326.
- Shaw, J., Rowlinson, R., Nickson, J., *et al.* Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics* 2003; 3: 1181-1195.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 1996; 68: 850–858.
- Shishehbor, MH., Aviles, RJ., Brennan, ML., Fu, X., Goormastic, M., Pearce, GL., Gokce, N., Keaney, Jr., JF., Penn, MS., Sprecher, DL., Vita, JA., Hazen, SL., Association of Nitrotyrosine Levels with Cardiovascular Disease and Modulation by Statin Therapy. *JAMA* 2003; 289: 1675–1680.
- Sobel, RA., DeArmond, SJ., Forno, LS., Eng, LF. Glial fibrillary acidic protein in hepatic encephalopathy. An immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol* 1981; 40:625-632.
- Sohal, RS., Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 33: 37–44.
- Sohn, JH., Han, KL., Lee, SH., Hwang, J.K., Protective effects of panduratin A against oxidative damage of tertbutylhydroperoxide in human HepG2 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2005; 28:1083–1086.

- Solbu, TT., Boulland, J-L., Zaid, W., Bredahl, MKL., Amiry-Moghaddam, M., Storm-Mathisen, J., Roberg, BA., Chaudhry, FA. Induction and targeting of the glutamine transporter SN1 to the basolateral membranes of cortical kidney tubule cells during chronic metabolic acidosis suggest a role in pH regulation. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 869-877
- Sommerburg O, Grune T, Klee S, Ungemach FR, Siems WG. Formation of 4-hydroxynonenal and further aldehydic mediators of inflammation during bromotrichloromethane treatment of rat liver cells. *Med Inflamm* 1993; 2: 27–31.
- Soreghan, BA., Yang, F., Thomas, SN., Hsu, J., Yang, AJ., High-throughput proteomic-based identification of oxidatively induced protein carbonylation in mouse brain. *Pharm. Res.* 2003; 20: 1713–1720.
- Spahr, L., Vingerhoets, F., Lazeyras, F., Delavelle, J., Du Pasquier, R., Giostra, E. Magnetic resonance imaging and proton spectroscopic alterations correlate with cirrosis. *Gastroenterology* 2000; 119:774-781.
- Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992; 257: 1220–1224.
- Stadtman, ER., Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Ann. Rev. Biochem.* 1993; 62: 797–821.
- Stadtman, ER., Protein oxidation and aging. *Free Radic. Res.* 2006; 40: 1250–1258.
- Stadtman, ER., Oliver, CN., Metal-catalyzed oxidation of proteins: Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 2005–2008.
- Stadtman, ER., Berlett, BS., Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem. Res. Toxicol.* 1997; 10: 485–494.
- Stadtman, ER., Levine, RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in protein. *Amino Acids* 2003; 25: 207-218 (a).
- Stadtman, ER., Moskovitz, J., Levine, RL., Oxidation of Methionine Residues of Proteins: Biological Consequences. *Antioxid Redox Signal.* 2003; 5: 577–582 (b).
- Stadtman, ER., Van Remmen, H., Richardson, A., Wehr, NB., Levine, RL., Methionine oxidation and aging. *Biochim. Biophys. Acta* 2005; 1703:135–140.

- Steward, O., Falk, PM. Protein-synthetic machinery at postsynaptic sites during synaptogenesis: a quantitative study of the association between polyribosomes and developing synapses. *J Neurosci* 1989; 6: 412-432.
- Suarez, I., Bodega, G., Rubio, M., Felipo, V., Fernández., B. Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression in the rat cerebellum following portacaval anastomosis. *Brain Research*, 2005; 1047: 205-213.
- Sultana, R., Butterfield, DA. Identification of the oxidative stress proteome in the brain. *Free Radical Biology & Medicine* 2011; 50:487-494.
- Sun, Y., Oberley, L. W., Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic. Biol. Med.* 1996; 21: 335–348.
- Swain, MS., Bergeron, M., Audet, R., Blei, AT., Butterworth, RF. Monitoring of neurotransmitter amonio acids by means of an indwelling cisterna magna catéter. A comparison of two rodent models of fulminant hepatic failure. *Hepathology* 1992; 16: 1028-1035.
- Swamy,M., Zakaria, A., Govindasamy, C., Sirajudeen, KNS., Nadiger, HA. Effects of acute ammonia toxicity on nitric oxide (NO), citrulline–NO cycle enzymes, arginase and related metabolites in different regions of rat brain. *Neuroscience Research* 2005; 53:116–122.
- Szabo, C., Ischiropoulos, H., Radi, R., Peroxynitrite: Biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007; 6: 662–680.

T)

- Talwalkar, JA., Kamath, PS. Influence of recent advances in medical management on clinical outcomes of cirrhosis. *Mayo Clin Proc* 2005; 80:1501-1508.
- Temple, A., Yen, T. Y., Gronert, S., Identification of specific protein carbonylation sites in model oxidations of human serum albumin. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2006; 17: 1172–1180.
- Thomas DD., Ridnour L., Donzelli S., Espey M.G., Mancardi D., Isenberg J.S., Feelisch M., Roberts D.D. and Wink D.A. The chemistry of protein modifications elicited by nitric oxide and related nitrogen oxides. In: Redox Proteomics. From protein modifications to cellular dysfunction and diseases (Edited by: I. Della-Donne, A. Scaloni, D.A. Butterfield), pp. 25-58. Wiley-Interscience (2006).
- Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., et al., Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 2001; 1: 377-396.

U)

- Uchida, K., Stadtman, ER., Covalent attachment of 4-hydroxynonanal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross- linking reaction. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 6388–6393.
- Unlu, M., Morgan, M., Minden, JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 1997; 18: 2071-2077.

V)

- Van Anken, HC., Schiphorst, ME. A kinetic determination of ammonia in plasma. *Clin Chim Acta* 1974; 56: 151-157.
- Varadarajan, S., Yatin, S., Aksenova, M., Butterfield, DA., Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J. Struct. Biol.* 2000; 130: 184–208.
- Vogt, W., Oxidation of methionyl residues in proteins: Tools, targets, and reversal. *Free Radic. Biol. Med.* 1995; 18: 93–105.

W)

- Waapeteresen, HS., Sonnewald, U., Larsson, OM., Schousboe, A. A possible role of alanine for ammonia transfer between astrocytes and glutamatergic neurons. *J Neurochem* 2000; 75:471-479.
- Wang, H., and Joseph, JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med*, 1999; 27: 612-616.
- Widmer, R., Kaiser, B., Engels, M., Jung, T., Grune, T. Hyperammonemia causes protein oxidation and enhanced proteasomal activity in response to mitochondrial-mediated oxidative stress in rat primary astrocytes. *Arch Biochem Biophys* 2007; 464: 1-11.
- Wolff, SP., Jiang, ZY., Hunt, JV., Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic. Biol. Med.* 1991; 10: 339–352.
- Wolpert, E., Phillips, SF., Summerskill, WH. Ammonia production in the human colon. Effects of cleansing, neomycin and acetohydroxamic acid. *N Engl J Med* 1970; 283:159-164.
- Wong, SHY., Knight, JA., Hopfer, SM., Zaharia, O., Leach, CN. and Sunderman, F.W. J. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde–thiobarbituric acid adduct. *Clinical Chemistry.* 1987; 33: 214-220.

- Wright, G., Jalan, R. Ammonia and inflammation in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: Pandora box? *Hepatology* 2007; 46:291-294.

X)

- Xu, G., Chance, M. R., Hydroxyl radical-mediated modification of proteins as probes for structural proteomics. *Chem. Rev.* 2007; 107: 3514–3543.

Y)

- Yan, LJ., Orr, WC., Sohal, RS., Identification of oxidized proteins based on sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis, immunochemical detection, isoelectric focusing, and microsequencing. *Anal. Biochem.* 1998; 263: 67–71.
- Yang, X., Bosoi, CR., Jiang, W., Trembaly, M., Rose, C. Portacaval anastomosis-induced hyperammonemia does not lead to oxidative stress. *Metab Brain Dis* 2010; 25: 11–15.
- Yoo, YS., Regnier, FE., Proteomic analysis of carbonylated proteins in two-dimensional gel electrophoresis using avidin-fluorescein affinity staining. *Electrophoresis* 2004; 25: 1334–1341.
- Yoritaka, A., Hattori, N., Uchida, K., Tanaka, M., Stadmant, ER., Mizumo, Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 2696–2701.
- Yurdaydin, C. Blood ammonia determination i cirrosis:still confusing alter all these years. *Hepatology* 2003; 38:1307-1310.

Z)

- Zamora, AJ., Cavanaugh, JB., Kyu, MH. Ultrastructural responses of the astrocytes to porta-caval anastomosis in the rat. *J.Neurol.Sci.* 1973; 18: 25-45.
- Zhou, G., Li, H., DeCamp, D., Chen, S., Gong, Y., Flaig, M., Gillespie, JW., Hu, N., Taylor, PR., Emmert-Buck, MR., Liotta, LA., Petricoin, EF., Zhao, Y. 2D Differential In-gel Electrophoresis for the Identification of Esophageal Scans Cell Cancer-specific Protein Markers. *Molecular & Cellular Proteomics* 2002; 1: 117-124.
- Zwingmann, C., Desjardins, P., Hazell, A., Chatauret, N., Michalak, A., Butterworth, RF. Reduced expression of astrocytic glycine transporter (Glyt-1) in acute liver failure. *Metab Brain Dis* 2002; 17: 263-273.

- Zwingmann, C., Chatauret, N., Leibfritz, D., Butterworth, RF. Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: results of a [H-C] nuclear magnetic resonance study. *Hepatology* 2003; 37: 420-428.
- <http://investigacion.us.es/area-investigacion/comite-etico>
- www.matrixscience.com

