



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de pós-graduação em Patologia

Natália Katley Oliveira

**AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E
DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E NEUROQUÍMICOS NO CÓRTEX PRÉ-
FRONTAL E NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS COM ENCEFALOPATIA
HEPÁTICA INDUZIDA POR TIOACETAMIDA**

Belo Horizonte

2022

NATÁLIA KATLEY OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E
DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E NEUROQUÍMICOS NO CÓRTEX PRÉ-
FRONTAL E NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS COM ENCEFALOPATIA
HEPÁTICA INDUZIDA POR TIOACETAMIDA**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação
em Patologia como requisito parcial à
obtenção do título de doutor em Patologia
investigativa da Universidade Federal de
Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Linha de pesquisa: Modelos experimentais de
doenças

Orientadora: Prof^ª. Dra. Milene Alvarenga
Rachid

Coorientadoras: Prof^ª. Dra. Aline Silva de
Miranda e Prof^ª. Dra. Ana Cristina Simões e
Silva

Belo Horizonte

2022

043

Oliveira, Natália Katley.

Avaliação dos componentes do sistema renina-angiotensina e dos parâmetros inflamatórios e neuroquímicos no córtex pré-frontal e no hipocampo de camundongos com encefalopatia hepática induzida por tioacetamida [manuscrito] / Natália Katley Oliveira. – 2022.

119 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.^a Dra. Milene Alvarenga Rachid. Coorientadoras: Prof.^a Dra. Aline Silva de Miranda. Prof.^a Dra. Ana Cristina Simões e Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Sistema Renina-Angiotensina. 3. Citocinas. 4. Encefalopatia Hepática. 5. Fígado. 6. Tioacetamida. 7. Fatores de Crescimento Neural. I. Rachid, Milene Alvarenga. II. Miranda, Aline Silva de. III. Silva, Ana Cristina Simões e. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DOUTORADO Nº 439 - NATÁLIA KATLEY OLIVEIRA

Realizou-se, no dia 21 de fevereiro, às 14 horas, por videoconferência, plataforma online, a defesa de Tese, intitulada “**AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E NEUROQUÍMICOS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS COM ENCEFALOPATIA HEPÁTICA INDUZIDA POR TIOACETAMIDA**”, apresentada

por **Natália Katley de Oliveira**, número de registro **2018675200**, graduada no curso de **Ciências Biológicas**, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em **PATOLOGIA**, à seguinte Comissão Examinadora: **Prof. Dr. Vinicius Sousa Pietra Pedroso** – PUC/Campus Betim/MG; **Profa. Dra. Eliana Cristina de Brito Toscano** - Faculdade de Medicina da UFJF; **Prof. Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira** - ICB/UFMG; **Profa. Dra. Ana Cristina Simões e Silva** – Faculdade de Medicina/UFMG – **COORIENTADORA**; **Profa. Dra. Aline Silva de Miranda** – ICB/UFMG – **COORIENTADORA**; **Profa. Dra. Milene Alvarenga Rachid** – ICB/UFMG – **ORIENTADORA**

A Comissão considerou a Tese:(x) Aprovado() Reprovado

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 21 de fevereiro de 2022.

*** De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Doutor só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Tese, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Doutorado.**



Documento assinado eletronicamente por **Milene Alvarenga Rachid**, **Servidor(a)**, em 23/02/2022, às 22:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Cristina Simoes e Silva**, **Membro de comissão**, em 24/02/2022, às 10:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de](#)



[novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Eliana Cristina de Brito Toscano, Usuário Externo**, em 08/03/2022, às 20:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius Sousa Pietra Pedroso, Médico**, em 09/03/2022, às 20:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline Silva de Miranda, Servidor(a)**, em 10/03/2022, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabício Marcus Silva Oliveira, Usuário Externo**, em 11/03/2022, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1276636** e o código CRC **C1D4128C**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à professora Dra. Milene Alvarenga Rachid! Que com toda paciência, positividade e profissionalismo, me orientou de forma ímpar! Agradeço imensamente pela oportunidade! Obrigada por fazer parte de minha formação profissional!

Agradeço aos meus pais, que continuam vibrando pelo meu sucesso e me fortalecendo nos momentos de dificuldades! Meu porto seguro! Amo vocês!

Ao meu irmão, obrigada pela ajuda nos problemas técnicos de informática!

Às professoras Dra. Aline Miranda e Dra. Ana Cristina Simões, agradeço pelas contribuições ao trabalho.

Agradeço também, à Dra. Eliana Toscano, pelas conversas e importante ajuda neste trabalho.

Agradeço à doutoranda Bruna da Silva, por sua contribuição nos experimentos!

Aos queridos colegas da pós-graduação e da vida, muito obrigada pelas horas de distrações! Certamente, essa companhia, tornou mais leve a árdua caminhada do meio acadêmico.

Agradeço ao corpo diretor do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI UFMG), que possibilitou a conciliação do trabalho com minha formação como Doutora.

Aos colegas de trabalho do CAPI, muito obrigada pelo apoio!

Agradeço à banca, por gentilmente aceitar meu convite!

Ao meu eterno Kaduzinho, obrigada pelo amor, peraltices e “lambeijos” durante as horas de estudo! Você faz falta aqui!

Por fim, agradeço à Deus por me sustentar sempre!

RESUMO

A encefalopatia hepática é uma síndrome neuropsiquiátrica que envolve disfunções cognitivas e motoras, devido à insuficiência hepática. O fígado possui importante papel no metabolismo de lipídeos e macronutrientes, na desintoxicação e regulação do volume sanguíneo. A tioacetamida é comumente utilizada para induzir lesão hepática aguda, fibrose hepática e cirrose em camundongos e outros modelos experimentais. A Tioacetamida pode induzir vacuolização intracelular disseminada, necrose hepatocelular e infiltração de células inflamatórias no fígado. Estudos clínicos e experimentais sugerem que a enzima conversora de angiotensina (ECA), a Angiotensina (Ang) II e o receptor angiotensinérgico do tipo 1 (AT1R), que compõem a via clássica do sistema renina-angiotensina (SRA), induzem neuroinflamação exacerbada em diferentes doenças neurológicas. Por outro lado, Ang-(1-7), ECA2 e o receptor Mas, que integram o eixo alternativo do SRA, têm-se mostrado um alvo terapêutico promissor em distúrbios neuropsiquiátricos, levando à neuroproteção. Este estudo teve como objetivo investigar a participação dos componentes do SRA assim como os níveis de fatores neurotróficos, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas no córtex pré-frontal e no hipocampo de camundongos com EH induzida por TAA. Além disso, avaliamos as alterações bioquímicas e histopatológicas no fígado dos animais acometidos. Os camundongos com EH apresentaram níveis corticais elevados de ECA e níveis de Ang-(1-7) reduzidos nas amostras corticais e no hipocampo, em comparação aos controles. Os camundongos com EH apresentaram aumento da razão Ang II/Ang-(1-7) em associação a níveis reduzidos do fator de crescimento neural (NGF) no córtex pré-frontal. Houve aumento dos níveis de IFN- γ e CCL2 no córtex pré-frontal e de TNF, IL-6, IL-12 e CCL2 no hipocampo dos camundongos com EH. TAA promoveu necrose hemorrágica e inflamação associada com aumento de marcadores de função hepática e da atividade dos neutrófilos e dos macrófagos. Nossos dados apontam para a possível participação dos componentes do SRA na fisiopatologia da encefalopatia hepática induzida por tioacetamida. Sugere-se que a redução de componentes da via alternativa do SRA esteja associada aos efeitos deletérios da neuroinflamação e ao menor efeito neuroprotetor do NGF na doença.

Palavras-chave: sistema renina-angiotensina; citocinas; encefalopatia hepática; fígado; tioacetamida; fatores neurotróficos.

ABSTRACT

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric syndrome that involves cognitive and motor dysfunctions due to liver failure. The liver plays an important role in lipid and macronutrient metabolism, in detoxification, and blood volume regulation. Thioacetamide is commonly used to induce acute liver injury, liver fibrosis and cirrhosis in mice and other experimental models. Thioacetamide can induce disseminated intracellular vacuolization, hepatocellular necrosis, and infiltration of inflammatory cells in the liver. Clinical and experimental studies suggest that the angiotensin converting enzyme (ACE), Angiotensin (Ang) II, and angiotensin type 1 receptor (AT1R), that compose the classical pathway of the renin–angiotensin system (RAS), exacerbate neuroinflammation in different neurologic diseases. Conversely, Ang-(1-7), ACE2, and Mas receptor, which integrate the alternative RAS axis, have been shown as a promise therapeutic target in neuropsychiatric disorders, leading to neuroprotection. This study aimed to investigate the participation of the RAS components and the levels of neurotrophic factors, pro-inflammatory cytokines, and chemokine in pre-frontal cortex and hippocampus of TAA-induced HE in mice. We also evaluated the histopathological and biochemical changes in the liver of affected mice. Mice presented increased cortical levels of ACE and decreased levels of Ang-(1-7) in pre-frontal cortex and hippocampal samples compared to controls. HE mice had an increase in the Ang II/Ang-(1-7) ratio along with reduced levels of neural growth factor (NGF) in the prefrontal cortex. The animals also showed elevated levels of IFN- γ and CCL2 in the prefrontal cortex and of TNF, IL-6, IL-12, and CCL2 in the hippocampus, compared with controls. TAA promoted hemorrhagic necrosis and inflammation associated with increased levels of hepatic markers, and higher activity of neutrophils and macrophages. Our data suggest the possible participation of components of the RAS in the pathophysiology of TAA-induced HE. It is suggested that the reduction of components of the alternative RAS axis is associated with the deleterious effects of neuroinflammation and lower neuroprotective effects of NGF in the disease.

Keywords: Angiotensin-renin system; cytokines; hepatic encephalopathy; liver; thioacetamide; neurotrophic factors.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01- Fisiopatologia da encefalopatia hepática.** Adaptado de Córdoba, J., Mínguez, B., 2008.....20
- Figura 02- Sistema renina-angiotensina - eixo- clássico.** Adaptado de Simões e Silva, AC., *et al.*, 2017; Villapol, Sônia, 2015.....33
- Figura 03- Sistema renina-angiotensina cerebral. Efeitos via receptor AT1 e AT2.** Adaptado de Cosarderelioglu *et al.*, 2020.....35
- Figura 04- Redução da atividade locomotora e histopatologia do fígado após encefalopatia hepática induzida por TAA.....43**
- Figura 05- Expressão de Ang II, Ang (1-7) e Ang II/Ang (1-7) no córtex pré-frontal e hipocampo após 24 horas de administração de TAA em camundongos.....44**
- Figura 06- Expressão de ACE e de ACE2 no córtex pré-frontal e no hipocampo, 24 horas após indução com TAA em camundongos.....45**
- Figura 7- Níveis de citocinas TNF, IFN-gama, IL-6, IL12 p70 e da quimiocina CCL2 no córtex pré-frontal e no hipocampo 24 horas após a administração de TAA em camundongos.....46**
- Figura 8- Níveis dos fatores neurotróficos BDNF, NGF e GDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo 24 horas após a administração de TAA em camundongos.....47**

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Classificação da encefalopatia hepática West-Haven.....	15
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT- Alanina aminotransferase
BDNF- Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CCL4 - tetracloreto de carbono
CX3CL1 – Fraquitulina
EH- Encefalopatia hepática
ECA-Enzima conversora de angiotensina
ECA2 - Enzima conversora de angiotensina 2
FHA- Falência hepática aguda
FHC- Falência hepática crônica
FHF- Falência hepática fulminante
GDNF- Fator Neurotrófico derivado da Glia
IHA- Insuficiência hepática aguda
IHC- Insuficiência hepática crônica
IL-6 - Interleucina 6
IL- 1 β – Interleucina β
IFN- γ – Interferon gama
IL-12 Interleucina 12
LTP- Potenciação de longo termo
NGF- Fator de Crescimento do Nervo
ROS- Espécies reativas de oxigênio
RNS- Espécies reativas de nitrogênio
SNC – Sistema nervoso central
SRA- Sistema renina-angiotensina
TAA- Tioacetamida
TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta
TNF – Fator de Necrose Tumoral
TNFR1 – receptor tipo I para fator de necrose tumoral
TNFR2- receptor tipo II para fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA	12
1.1 Encefalopatia Hepática.....	12
1.2 Alterações patológicas.....	15
1.3 Modelos experimentais.....	16
1.4 Fisiopatologia da encefalopatia hepática.....	17
1.5 Sistema renina-angiotensina e encefalopatia hepática.....	32
2. OBJETIVOS	37
2.1.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Animais e grupos experimentais.....	38
3.2 Indução da Insuficiência Hepática.....	38
3.3 Análise de parâmetros comportamentais.....	38
3.4 Avaliação histopatológica do fígado.....	39
3.5 Dosagem dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina.....	39
3.6 Mensuração dos Fatores Neurotróficos.....	39
3.7 Detecção dos níveis de citocinas e quimiocina CCL2.....	40
3.8 Análise Estatística.....	41
4. RESULTADOS	42
4.1 Atividade locomotora e alterações histopatológicas.....	43
4.2 Níveis dos componentes do sistema renina-angiotensina no córtex pré-frontal e hipocampo.....	44
4.3 Concentrações de TNF, IFN- γ , IL-6, IL-12 p70 e CCL2 no córtex pré-frontal e hipocampo.....	45
4.4 Dosagem dos fatores neurotróficos (BDNF, NGF E GDNF) no córtex pré-frontal e hipocampo.....	47
5.0 DISCUSSÃO	48
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8. ANEXOS	83
8.1 PROTOCOLO CEUA.....	83

1. INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Encefalopatia hepática

A encefalopatia hepática (EH) é um distúrbio neurológico associado a possíveis complicações clínicas ocasionadas pela falência hepática aguda (FHA) ou crônica (FHC) (VILSTRUP *et al.*, 2014). A doença pode ainda estar associada à presença de desvios porto-sistêmicos congênitos ou adquiridos (JAYAKUMAR & NORENBORG, 2018; DHAREL & BAJAJ, 2015; FERENCI *et al.*, 2002). O paciente acometido pela EH apresenta alterações neuropsiquiátricas, que variam desde um leve prejuízo do sono e da atenção, caracterizando assim a forma mais leve da doença ou EH mínima, até pronunciadas disfunções cognitivas e motoras, confusão mental e coma (AMODIO *et al.*, 2004; SHAWCROSS *et al.*, 2005). No entanto, pelo fato da EH apresentar etiologia heterogênea, o diagnóstico clínico da doença torna-se complicado. Assim, as taxas de incidência podem apresentar grandes variações (VILSTRUP *et al.*, 2014). Um estudo com pacientes dinamarqueses portadores de cirrose alcoólica mostrou que a mortalidade anual após a manifestação da EH foi de 64% (JEPSEN *et al.*, 2010). Outros autores relatam que a encefalopatia sintomática apresenta uma taxa de incidência de 30 a 40% nos pacientes cirróticos (VILSTRUP *et al.*, 2014; JEPSEN *et al.*, 2010; AMODIO *et al.*, 2001). Nos Estados Unidos da América (EUA), foram registradas 110.000 internações entre os anos de 2005 e 2009 (STEPANOVA *et al.*, 2012).

Classificada como a 11^a causa de morte no mundo, a cirrose hepática é uma das causadoras da EH (ASRANI *et al.*, 2018). Melo *et al.* (2017) mostraram que, no ano de 2015, as mortes por cirrose e câncer hepático em decorrência do uso de álcool foram de 28 mil mortes no Brasil. Sobre o transplante de fígado, sabe-se que o procedimento é muito importante em diversas doenças hepáticas, incluindo a EH (TROTTER & CÁRDENAS, 2016). Especificamente sobre os dados epidemiológicos da EH na América Latina e no Brasil, observa-se escassez de informações.

Um estudo envolvendo os principais centros de transplante hepático do Brasil, entre 2016 e 2021, buscou investigar as principais causas de insuficiência hepática aguda que levaram ao transplante de fígado no país. O estudo incluiu adultos e crianças e mostrou que a etiologia da doença, na maioria dos casos, era indeterminada. Nas causas determinadas, a maior prevalência foi da lesão hepática induzida por drogas, principalmente nas regiões Sul e Sudeste (SANTOS *et al.*, 2021). Nos Estados Unidos, a lesão hepática induzida por medicamentos responde por 50% dos casos (REUBEN *et al.*, 2010).

A FHA é uma disfunção crítica e progressiva que, embora rara, apresenta um alto risco de morte (THAWLEY, 2016). Clinicamente, observa-se grave deficiência funcional do

fígado, intensa lesão hepática e distúrbios da coagulação (DELAY *et al.*, 2019; GREK & ARASI, 2016; BERNAL *et al.*, 2013). De acordo com O'Grady JG, 2005, a FHA pode ser dividida em hiperaguda, aguda e subaguda de acordo com o surgimento da encefalopatia, que varia entre 7 e 28 dias (O'GRADY, 2005).

Geralmente, o processo necrótico está associado ao uso ou exposição a drogas hepatotóxicas, como o álcool, ou após um quadro de hepatite viral (GREK & ARASI, 2016; JAYAKUMAR & NORENBURG, 2018). No contexto da FHA, a encefalopatia hepática desenvolve-se de forma conturbada, com rápida deterioração do quadro neurológico, edema cerebral, aumento da pressão intracraniana (PIC), coma e morte (VAQUERO *et al.*, 2003^a; THUMBURU, *et al.*, 2011; SHAWCROSS & WENDON, 2012). A FHA apresenta alta taxa de mortalidade, variando entre 55 e 70% dos casos. Assim, um rápido e eficiente diagnóstico se faz necessário durante os atendimentos de urgências médicas em pacientes com FHA (DELAY *et al.*, 2019; AMODIO, 2018; VAQUERO *et al.*, 2003a). Além disso, quanto mais a doença progride, mais chances o paciente tem de se tornar um candidato ao transplante hepático, aumentando também o seu risco de morte (BERNAL *et al.*, 2010; O' GRADY *et al.*, 1993).

No contexto de FHC, a evolução da EH acontece de forma mais lenta, estendendo-se por meses e agravando-se gradualmente (SUREKA *et al.*, 2015). Exacerbações constantes são comuns na EH em decorrência da falência hepática crônica e isso acaba gerando uma enorme perda da qualidade de vida e da capacidade laborativa do paciente (SUREKA *et al.*, 2015; VAQUERO *et al.*, 2003).

A cirrose é listada como a principal etiologia da EH, e uma das principais causas de morte no mundo. Durante os cinco primeiros anos após o diagnóstico da cirrose, estima-se que o risco de episódios de EH esteja em torno de 5-25% e após o primeiro episódio, o risco cumulativo situa-se em torno de 40% de recorrência (VILSTRUP *et al.*, 2014).

Por apresentar uma ampla gama de manifestações clínicas, alguns critérios são adotados para a classificação e melhor manejo e diagnóstico do quadro clínico do paciente. A conferência de Viena, em 1998, classificou a EH em diferentes subclasses. O tipo A classifica a EH associada à FHA (FERENCI *et al.*, 1998). O tipo B se refere à EH decorrente de desvios porto-sistêmicos sem doença hepática associada. E o tipo C define a ocorrência da EH em pacientes com cirrose e hipertensão portal ou algum *shunt* porto-sistêmico (MUNOZ, 2008). Nos casos do tipo C, associados à cirrose, a EH pode ser classificada em episódica, persistente e subclínica, levando-se em consideração o tempo de duração dos sinais e sintomas. Como o próprio nome diz, na forma episódica, o paciente exhibe curtos períodos de distúrbios da

consciência e alterações cognitivas, retornando ao estado normal após tratamento (FREDERICK, 2011). Na forma persistente, os episódios acontecem duas vezes a cada ano e não é observado retorno à normalidade após tratamento. Na forma subclínica ou mínima, o paciente muitas vezes continua com habilidades bem preservadas, como é o caso da fala (NARDONE, *et al.*, 2016). No entanto, ao ser submetido a testes neuropsicológicos e neurofisiológicos, demonstra déficit, tornando evidentes alterações do estado mental (FERENCI *et al.*, 2002; NARDONE, 2016). Por isso, a lentidão observada em estágios iniciais da doença pode confundir o diagnóstico e dificultar a terapia precoce. Nesse sentido, é muito importante que técnicas de manejo e observação desse paciente sejam adotadas de forma eficiente (NARDONE, 2016). Em muitos casos, os níveis de amônia no sangue não estão diretamente relacionados ao grau da EH, fazendo com que o diagnóstico clínico para a detecção de disfunções neurológicas e exclusão de outros tipos de doenças seja tão importante. Muitos pacientes acometidos pela EH não percebem alterações em seu comportamento, e acabam por resistir à avaliação clínica, dificultando abordagens médicas (MUNOZ, 2008).

Clinicamente são adotados sistemas de classificação da EH. A escala de West-Haven é uma boa forma de avaliação para os pacientes que apresentam EH aparente e em estágios iniciais da doença (MUNOZ, 2008; AMODIO, 2018). De acordo com os critérios de West-Haven, os pacientes são classificados em graus de 1 a 4, de acordo com as alterações neuropsicológicas apresentadas (Tabela 01). Outras escalas são utilizadas clinicamente para avaliar estágios mais avançados da doença, como é o caso da Escala de Coma de Glasgow. Nela, é avaliada a abertura ocular, fluência verbal e resposta motora (MOURI, *et al.*, 2015; REITH *et al.*, 2016; revisões em BRAINE *et al.*, 2017). Além disso, sistemas de classificação mais precisos vêm sendo recentemente estudados (MOURI, *et al.*, 2015; AMODIO, 2018; MONTAGNESE, *et al.*, 2018).

Alguns tratamentos no intuito de reduzir a produção de amônia no trato gastrointestinal têm sido aplicados. Dentre eles, destacam-se os dissacarídeos não absorvíveis, antibióticos e probióticos. Também são administrados moduladores do receptor ácido gama – aminobutírico (GABA) e medicamentos que aumentam a remoção da amônia através da produção de ureia (BUTTERWORTH, 2019).

Tabela 01: Classificação segundo critérios de West-haven (adaptado de Munoz, 2008 e Amodio, 2018).

EH	Quesito consciência	Função intelectual	Comportamento	Anormalidades neuromusculares e metabólicas
GRAU I (leve)	Padrão anormal do sono	Intervalo de atenção reduzido	Leves alterações comportamentais	Incoordenação muscular, tremor metabólico.
GRAU II (moderado)	Leve letargia e desorientação	Amnésia; raciocínio bastante prejudicado	Mudança evidente na personalidade e comportamento inadequado	Asterixis, reflexos prejudicados, ataxia.
GRAU III (grave)	Sonolência, semiestupor	Incapacidade de raciocinar	Desorientação grosseira	Reflexos hiperativos, sinal de Babinski.
GRAU IV (coma)	Estupor inconsciente	Ausente	Ausente	Pupilas dilatadas, opistótono, coma.

1.2 Alterações patológicas

Durante o desenvolvimento da EH em decorrência da insuficiência hepática é possível observar alterações histopatológicas importantes, como degeneração hidrópica e necrose centrolobular no fígado, edema e disfunção astrocítica. Nosso grupo de pesquisa observou elevados níveis de ALT, áreas de necrose centrolobular e edema astrocitário, 24h após a administração de TAA em camundongos C57BL/6 fêmeas (FALEIROS *et al.*, 2014). A ativação microglial é um dos fatores responsáveis pelo aumento da liberação de citocinas no encéfalo, aspecto observado em diversas doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas. Analisando os aspectos morfológicos ultraestruturais presentes no córtex cerebral de camundongos com IHA induzida por TAA através da microscopia eletrônica de transmissão, verificamos anormalidades morfológicas nos capilares cerebrais dos animais (FALEIROS *et al.*, 2014). O edema astrocitário é comum durante o desenvolvimento da EH, sobretudo no cérebro submetido a concentrações elevadas de amônia. Na EH em decorrência da cirrose, é comum observar uma alteração morfológica conhecida como astrocitose Alzheimer tipo 2, ou seja, edema, alteração do padrão de cromatina e palidez nuclear em astrócitos (BUTTERWORTH, *et al.*, 1987). Embora menos comum, a morte celular neuronal pode acontecer na EH. Nas camadas corticais profundas, ocorre degeneração espongiiforme (BUTTERWORTH, 2007). Em pacientes com doença hepática terminal, observa-se lesão diencefálica e degeneração cerebelar, com perda das células de Purkinje (KRIL & BUTTERWORTH, 1997).

Em amostras de tecido cerebral de pacientes com transtorno por uso de álcool e com diagnóstico de EH, foi observada proliferação microglial generalizada, com presença de corpo celular aumentado (DENNIS *et al.*, 2014). O modelo utilizando ligadura do ducto biliar em ratos, seguida de alimentação com acetato de amônia para indução da EH e condição de hiperamonemia, revelou que os astrócitos aumentaram seu tamanho em cerca de 60%. Assim também, a frequência de ativação da micróglia esteve aumentada (CHEN *et al.*, 2014). No córtex pré-frontal de ratos com IHA, foram observadas concentrações extracelulares aumentadas de glutamina, em decorrência da desvascularização hepática em função da progressão da EH (MICHALAK *et al.*, 1996). Com o intuito de diminuir as concentrações de glutamina no cérebro e consequentemente o edema astrocitário e, a fim de evitar as complicações advindas desse processo patológico, a metionina sulfoximina (MSO), foi utilizada *in vivo* e *in vitro*. A administração desse inibidor de glutamina sintetase atenuou o edema cerebral e diminuiu o *pool* de glutamina astrocítica (WILLARD-MACK *et al.*, 1996; BLEI *et al.*, 1994; NORENBURG & BENDER, 1994). No entanto, essa abordagem terapêutica é discutida, pois pode interferir na disponibilidade de glutamato, prejudicando assim a neurotransmissão excitatória e consequente piora da HE (COOPER *et al.*, 1976; RAO & MEISTER, 1972).

1.3 Modelos experimentais

Existem vários modelos experimentais desenvolvidos para o estudo desta síndrome. É importante ressaltar que os modelos devem reproduzir as características clínicas apresentadas em seres humanos, tais como hiperamonemia e inflamação sistêmica (DIAZ-GÓMEZ *et al.*, 2011). Os modelos experimentais para o estudo de lesão e fibrose hepática vêm sendo cada vez mais explorados. Estudos recentes mostram inclusive, o uso de mamíferos, como macacos, por exemplo, para o estudo destes processos (MATSUO *et al.*, 2020; INOUE *et al.*, 2018).

Ratos ou camundongos com lesão hepática tóxica a partir da administração de drogas hepatotóxicas, como a tioacetamida (TAA), são considerados bons modelos da EH ocasionada por insuficiência hepática aguda (Tipo A). Para a reprodução da EH em decorrência da insuficiência hepática crônica (Tipo B), modelos cirúrgicos são os mais amplamente utilizados, como, por exemplo, animais com ligadura do ducto biliar. Sobre a indução de cirrose, a partir da utilização do tetracloreto de carbono, pesquisadores ressaltam ser um modelo de boa reprodutibilidade, mas há pouca alteração comportamental e taxa de mortalidade alta (LIMA *et al.*, 2019; SNODGRASS, 1989). Os modelos que mimetizam a

doença em decorrência da lesão hepática alcoólica (Tipo C), ainda não são considerados satisfatórios (BUTTERWORTH *et al.*, 2009).

O modelo ideal para reproduzir a síndrome deve contemplar aspectos como: reversibilidade por tratamento apropriado, fornecer janela terapêutica, reprodutibilidade para indução do coma e aumento da pressão intracraniana e grau de insuficiência hepática. A TAA é um desses fármacos capazes de induzir tais respostas no modelo experimental (SEPEHRINEZHAD *et al.*, 2021). A TAA (CH_3CSNH_2) é um fármaco originalmente utilizado como fungicida e que depende da metabolização hepática, pela ação catalítica do complexo microsomal citocromo P-450, em S-dióxido de TAA, para que seu efeito seja tóxico (MANGIPUDY *et al.*, 1995). Esse metabólito reduz a atividade antioxidante no fígado, acentuando a peroxidação lipídica e estabelecendo uma condição de estresse oxidativo que leva à lesão hepática e necrose tecidual (TÚNEZ *et al.*, 2005). A TAA não é diretamente hepatotóxica, mas, seus metabólitos, são capazes de induzir lesão a partir do estresse oxidativo e inflamação, gerados após sua administração, de maneira semelhante ao que acontece nos seres humanos com EH (SEPEHRINEZHAD *et al.*, 2021). A TAA estimula a liberação de íons cálcio, gerando estresse oxidativo, o que acaba desencadeando alterações fisiopatológicas e deslocamento estrutural e funcional nas células (HAJIPOUR *et al.*, 2021). O fármaco pode ser administrado de diferentes formas: oral - na água ou na ração ingerida, por intubação intragástrica ou gavagem, ou por injeções subcutâneas ou intraperitoneais (FONTANA *et al.*, 1996). A TAA induz a janela de tempo observada em pacientes com FHA, e é reproduzível em várias espécies animais (SEPEHRINEZHAD, *et al.*, 2021). Além disso, a escolha por este modelo se deve ao fato de que o fármaco utilizado para a indução é de baixo custo e os animais da linhagem utilizada são disponibilizados em nossos biotérios.

Nosso grupo de pesquisa vem estudando os aspectos clínicos, patológicos e inflamatórios da EH em camundongos, utilizando o fármaco TAA. Observamos, na fase aguda, necrose hepática associada à alteração dos marcadores séricos de lesão hepatocelular. Os animais com EH apresentaram aumento significativo nos níveis cerebrais do neurotransmissor glutamato e de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias com alterações morfológicas dos astrócitos e das células endoteliais (MIRANDA *et al.*, 2010; FALEIROS *et al.*, 2014).

1.4 Fisiopatologia da Encefalopatia Hepática

As características fisiopatológicas da EH têm sido amplamente discutidas desde os primeiros registros descritivos da doença e, até hoje, não estão estabelecidos com precisão os

mecanismos para sua gênese (BUTTERWORTH, 2019; LIMA *et al.*, 2019; ADAMS, *et al.*, 1949; BUTTERWORTH, *et al.*, 1987). Sabe-se que seu surgimento está relacionado com eventos de hiperamonemia, ação de neurotoxinas e outros efeitos que envolvem edema cerebral e resposta neuroinflamatória exacerbada, com aumento de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo/nitrosativo (FREDERICK, 2011, WRIGHT & JALAN, 2007; SHAWCROSS & JALAN, 2005B; SHAWCROSS E JALAN, 2004; BUTTERWORTH, 2002). Com os recentes avanços científicos referentes à EH, sua origem atualmente é considerada multifatorial. No entanto, sua exata fisiopatologia ainda não é totalmente compreendida. Um consenso entre os estudiosos da área é de que muito provavelmente trata-se de um mecanismo multifatorial, com interação entre diversos fatores (JAYAKUMAR & NORENBURG, 2018).

Como um produto normal da degradação de proteínas e outros compostos no organismo, em condições normais, a amônia é convertida em ureia, após passar pelo fígado, órgão responsável pela neutralização de substâncias potencialmente tóxicas ao organismo (BUTTERWORTH, 2002; CABRERA-PASTOR *et al.*, 2019). Em casos de insuficiência hepática, ocorre o acúmulo dessa substância na corrente sanguínea, fazendo com que outros órgãos, como o encéfalo e músculos, sejam responsáveis por sua neutralização (DHAREL & BAJAJ, 2015). Por sua vez, a hiperamonemia sistêmica, resulta em alterações neuronais que levam à EH (O'CARROLL, 2008; WRIGHT & JALAN, 2007; SEIFERT *et al.*, 2006; STEWART E CERHAN, 2005). Além do fígado, outros tecidos também desempenham mecanismos capazes de metabolizar a amônia circulante. No sistema nervoso central, mais precisamente nos astrócitos, a glutamina sintetase incorpora a amônia ao glutamato para transformá-la em glutamina (CABRERA-PASTOR *et al.*, 2019; SCHOUSBOE, *et al.*, 2013). Os astrócitos são células nervosas abundantes no sistema nervoso central e participam da barreira hematoencefálica, contribuindo para a manutenção da homeostase cerebral (CABRERA-PASTOR *et al.*, 2019; SCHOUSBOE, *et al.*, 2013). Como resultado da hiperamonemia, o excesso de glutamina citoplasmática desencadeia desequilíbrio osmótico e acúmulo de água no interior destas células, acarretando em edema cerebral e aumento da pressão intracraniana (PIC) (WRIGHT E JALAN, 2007; SEIFERT *et al.*, 2006; STEWART E CERHAN, 2005; SHAWCROSS E JALAN, 2005B; SHAWCROSS E JALAN, 2004). O glutamato é um dos principais neurotransmissores de função excitatória em mamíferos. Sua ação é regulada por diferentes receptores e transportadores distribuídos sobre a membrana celular de neurônios e células gliais (ROBERTS E FRANKEL, 1950; SWANSON, *et al.*, 2005; FERRAGUTI E SHIGEMOTO, 2006). Dependendo da região cerebral, o processo se

estabelece de diferentes maneiras, principalmente no que se refere ao sistema glutamatérgico. O glutamato é um aminoácido livre presente no SNC e está envolvido em processos de desenvolvimento e plasticidade neural (GREWER *et al.*, 2005; FERRAGUTI E SHIGEMOTO, 2006). A glutamina, outro importante aminoácido, está relacionada à produção de amônia e glutamato no intestino, regulando também a produção de GABA, neurotransmissor de função inibitória (REUBI *et al.*, 1978; SCHOUSBOE, *et al.*, 2013). Além disso, a amônia destaca-se como um importante fator no ciclo glutamina-glutamato-GABA e qualquer alteração em seus níveis, conseqüentemente interfere na neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica. Sendo a amônia uma substância chave no contexto da EH, é importante ressaltar seu envolvimento na neurotransmissão (LANZ *et al.*, 2017; LLANSOLA *et al.*, 2015; CABRERA-PASTOR *et al.*, 2019). Estudos mostram que a maioria dos transportadores de glutamato é expressa exclusivamente pelos astrócitos, ou seja, essa célula pode desempenhar um papel crucial no processo de neurotransmissão. Assim como em outras alterações neurológicas, na EH também são relatadas variações na concentração de glutamato e sua participação na patogênese da doença (HIBA *et al.*, 2016; LONGO *et al.*, 2016; KOSENKO *et al.*, 2014a 014b; M. LLANSOLA *et al.*, 2015). Estudos prévios da nossa equipe de pesquisa mostraram aumento significativo na liberação do glutamato no córtex cerebral em camundongos tratados com tioacetamida (TAA) (MIRANDA *et al.*, 2010). Além disso, conforme estudo de Mcardle *et al.* (1996), também foi verificado aumento dos níveis extracelulares de glutamato no hipocampo. Utilizando dois modelos de EH em ratos, Moroni *et al.* (1938) relataram aumento da síntese e liberação de glutamato. Recentemente, Hernández-rabaza *et al.* (2016) e Galland *et al.*, (2017) mostraram que no hipocampo de ratos com hiperamonemia induzida, a absorção de glutamato por astrócitos foi reduzida, e a partir desse resultado, levantaram a suspeita da perda de expressão de transportadores de glutamato por essas células. Contudo, a patogênese da EH envolvendo alterações nos níveis do neurotransmissor glutamato ainda é motivo de estudo.

Possivelmente devido à sua proximidade com vasos sanguíneos, os astrócitos sejam as células mais afetadas pela hiperamonemia no sistema nervoso central (NORENBERG *et al.*, 2009). Além da hiperamonemia, o estresse oxidativo/nitrosativo também é um dos fatores discutidos em relação à patogênese da doença. Esse processo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção e neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) (BOSOI & ROSE; 2013). Além de participarem da sinalização celular, esses radicais são altamente reativos. O excesso desses radicais pode ocasionar lesões e consequente disfunção celular (VALKO *et al.*, 2007; BOSOI & ROSE; 2013). As

consequências desse desbalanço são tantas, que acarretam modificações em níveis lipídicos, proteicos e de ácidos nucleicos. Modificações nos níveis dos ácidos nucleicos são capazes de influenciar a síntese anormal de proteínas e alterar processos de tradução gênica. Essa série de desequilíbrios culmina em edema celular, capaz de produzir mais ROS, caracterizando um ciclo vicioso (HÄUSSINGER & GÖRG, 2010; REINEHR *et al.*, 2007).

Especificamente as ROS, são geradas a partir de moléculas de oxigênio que não são totalmente reduzidas para formar água, por exemplo. Dessa forma, ânions superóxidos acabam sendo produzidos e por apresentarem elétrons desemparelhados, tornam-se muito reativos (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1992). Por se tratar de um mecanismo natural inerente às células, a produção de ROS interage diretamente com as defesas enzimáticas em mamíferos. A glutatona, por exemplo, é um antioxidante capaz de reduzir e tornar as ROS menos reativas. Além disso, diversas outras moléculas antioxidantes participam ou interagem nesse sistema de redução da reatividade de ROS (DOS SANTOS *et al.*, 2015).

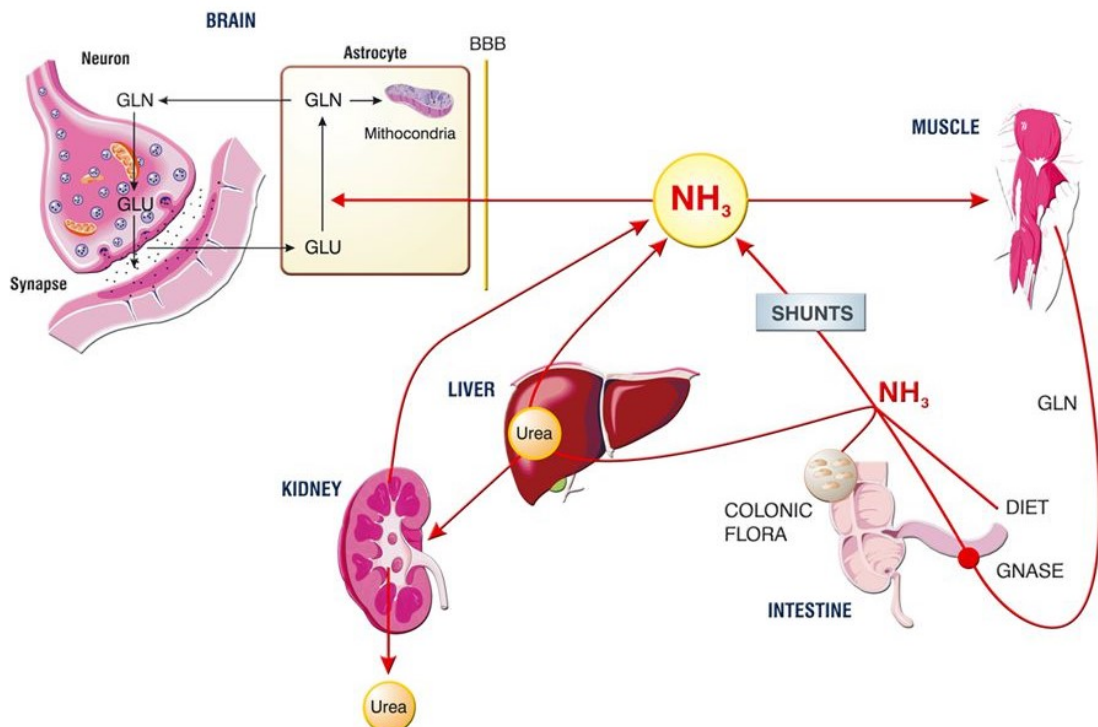


Figura 01: Fisiopatologia da encefalopatia hepática (adaptado de Córdoba, J., e Mínguez, B., 2008. Hepatic encephalopathy. *Seminars in Liver Disease*, 28: 70-80).

A amônia causa alterações celulares que desencadeiam diversas reações prejudiciais ao funcionamento normal das organelas celulares (NORENBERG, *et al.*, 2003). Tem sido relatado que a amônia afeta negativamente a função de várias enzimas responsáveis pelo metabolismo energético nas mitocôndrias. Alguns estudos têm mostrado os efeitos fisiológicos e farmacológicos de um aminoácido bastante abundante no corpo humano, a taurina. Esse antioxidante regula o pH e preserva o potencial de membrana mitocondrial (HANSEN, *et al.*, 2010). Recentemente, foi verificado que a administração de taurina em condições de lesão hepática aguda e crônica impediu o aumento nos níveis de amônia plasmática e cerebral (HEIDARI, *et al.*, 2016). O grupo observou edema cerebral pronunciado em animais com lesão hepática aguda induzida por acetaminofeno e lesão crônica por ligadura do ducto biliar. Quando se administrou a taurina, os níveis de amônia foram significativamente reduzidos. As alterações histopatológicas induzidas pela lesão hepática foram também menores nos animais tratados com taurina (HEIDARI, *et al.*, 2016). Outros estudos investigaram o papel da taurina nos eventos inflamatórios, apoptóticos e de estresse oxidativo em modelo animal de ratos com acidente vascular cerebral (NIU *et al.*, 2018). Os autores mostraram que a taurina reduziu os déficits neurológicos, edema cerebral e eventos de morte celular. Além disso, produziu melhora significativa da função mitocondrial, potencializando a síntese de proteínas na mitocôndria. Dessa maneira, esse potente antioxidante desponta como um alvo terapêutico no tratamento da EH (NIKNAHAD, *et al.*, 2017; NIU *et al.*, 2018).

O papel da inflamação no contexto da EH vem sendo cada vez mais discutido. Acredita-se que, associados à hiperamonemia, outros fatores como a liberação de mediadores inflamatórios estejam intimamente implicados na patogênese da EH (WRIGHT & JALAN, 2007; SHAWCROSS *et al.*, 2007; AVRAHAM *et al.*, 2006; STEWART & CERHAN, 2005; SHAWCROSS & JALAN, 2005B; SHAWCROSS & JALAN, 2004). A alta produção de citocinas pró-inflamatórias durante quadros de insuficiência e cirrose hepática está diretamente relacionada à lesão hepática (MARTINEZ-ESPARZA *et al.*, 2015).

Em estudo prévio, Shawcross e Jalan (2004), por meio da administração oral de uma solução composta por aminoácidos que mimetizam a hemoglobina, induziram a hiperamonemia em pacientes com cirrose hepática que apresentavam uma resposta inflamatória sistêmica. Esses autores demonstraram que a presença do processo inflamatório sistêmico associado à hiperamonemia acarretou uma piora significativa na função neurológica dos pacientes com cirrose. Esse achado indica que os mediadores inflamatórios sistêmicos podem atuar como moduladores dos efeitos neuropsicológicos decorrentes da hiperamonemia,

corroborando a hipótese de que a inflamação é importante para a patogênese da EH (SHAWCROSS & JALAN, 2004).

Em consequência da hiperamonemia, os eventos neuroinflamatórios são estimulados ao longo da EH. Ocorre ativação de células gliais e consequente liberação de citocinas, quimiocinas e lipopolissacarídeos (JAYAKUMAR, *et al.*, 2015). Em 1971, GANS e colaboradores sugeriram, pela primeira vez, uma relação entre infecções periféricas e inflamação em EH. Posteriormente, vários autores detectaram aumento nos níveis de IL-1 β , IL-6, TNF e outras citocinas e verificaram que, na ausência de alguns receptores para moléculas inflamatórias, o edema cerebral característico na EH era significativamente diminuído (FALEIROS *et al.*, 2014; WIGMORE *et al.*, 1998; WRIGHT *et al.*, 2007; CHASTRE A. *et al.*, 2012). Adicionalmente, Jiang *et al.*, 2009 e Chung *et al.*, 2001 mostraram atenuação dos sintomas de EH e redução ou ausência de edema após a administração de drogas anti-inflamatórias. Em cultura de astrócitos expostos a uma combinação de citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF), o NF- κ B foi fortemente ativado e, na presença de amônia, o evento foi potencializado. No entanto, o bloqueio de NF- κ B impediu o edema astrocitário (RAMA RAO *et al.*, 2010; FRANK-CANNON *et al.*, 2009).

Estudos anteriores mostram níveis aumentados de IL-6 e TNF associados a várias doenças hepáticas (PRYSTUPA *et al.*, 2015). Um recente estudo mostra que, associada à gravidade da lesão hepática, os níveis de citocinas pró-inflamatórias, TNF e IL-6, estão aumentados no modelo experimental de ratos deficientes para ECA2. E o dano hepático foi mais rápido do que nos animais controle. Ou seja, ECA2 exibiu papel protetor no modelo de camundongos com lesão hepática induzida por TAA (WU *et al.*, 2017). Outro aspecto que tem ganhado destaque nos estudos de EH é a participação de citocinas pró e anti-inflamatórias. As citocinas são classificadas de acordo com seu papel principal na resposta imune, podendo desempenhar diversas funções conforme o estímulo antigênico. Dessa forma, atuam na comunicação entre as células, regulando a resposta imune. As células do sistema imune possuem receptores específicos para as citocinas, ativando assim a resposta imunológica (LARRUBIA *et al.*, 2009). É comum, em pacientes com cirrose, quadros de inflamação sistêmica, que induzem o fígado ao processo de fibrose. Assim, a lesão hepática está associada a altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (DIRCHWOLF & RUF, 2015; MARTÍNEZ-ESPARZA *et al.*, 2015).

Em pacientes cirróticos descompensados, os níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias são significativamente aumentados (TILG *et al.*, 1992). Os níveis séricos de TNF e IL-6 estão relacionados com a gravidade da EH em pacientes cirróticos. Pacientes com

hepatopatias e EH apresentam níveis mais elevados de IL-6. Enquanto os níveis de IL-23 são diminuídos nesses pacientes (REY & EFFENDI-YS, 2021). Alguns estudos mostram que TNF, IL-6 e IL-1 β podem influenciar na permeabilidade da barreira hematoencefálica (WU *et al.*, 2016; LICINIO & WONG, 1997). É conhecido que, na condição de doença hepática alcoólica (principal causa da cirrose), há aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6 e TNF. Nessa condição, foi verificada uma associação entre o aumento e a gravidade da doença hepática com a desregulação imunológica dos pacientes (MC CLAIN & COHEN, 1989; DEVIERE *et al.*, 1989).

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina pró-inflamatória responsável por desencadear uma série de eventos celulares relacionados à inflamação, morte e diferenciação celular (BEUTLER *et al.*, 1985). É o principal mediador da resposta inflamatória desencadeada principalmente pela presença de lipopolissacarídeos, presente na membrana de bactérias gram-negativas e outros patógenos (BEUTLER *et al.*, 1985). Foi descrito inicialmente, em 1975, por um grupo de pesquisadores que estudavam a necrose hemorrágica e, mais tarde, foram definidas suas ações em diferentes processos imunológicos e inflamatórios (CARSWELL *et al.*, 1975; BEUTLER *et al.*, 1985; PENNICA *et al.*, 1985). Sua produção ocorre por meio de macrófagos ativados, linfócitos ou monócitos e é caracterizado como uma proteína transmembrana do tipo II (KRIEGLER *et al.*, 1988). Pode ligar-se aos receptores do tipo I e II (TNFR1 e TNFR2), sinalizando assim eventos de recrutamento de células do sistema imune, respostas inflamatórias e apoptóticas (CROFT, 2009). Ao todo são reconhecidos dezenove tipos de ligantes e vinte e nove diferentes receptores da superfamília de TNF, constituindo-se na maior família de citocinas (WIENS & GLENNEY, 2011). Os ligantes são expressos em sua maioria por células do sistema imune, como linfócitos, monócitos células dendríticas e células natural killers (NK). Já os receptores são expressos por uma variedade de tipos celulares (CABL-HIERRO E LAZZO, 2012; ZHAI, *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 1994). Dependente da ligação a proteínas ativadoras de vias intracelulares, a superfamília de receptores de TNF é dividida em dois grandes grupos: um primeiro, contendo domínio de morte e o segundo conhecido pelo domínio TIM, o qual induz sobrevivência (CABL-HIERRO & LAZZO, 2012). Em baixas concentrações, TNF estimula células endoteliais a promoverem vasodilatação e consequente secreção de quimiocinas, recrutando leucócitos e desencadeando um processo inflamatório local. No fígado, aumenta a síntese de proteínas séricas (BEUTLER *et al.*, 1985).

Especialmente no SNC e devido à sua atividade pleiotrópica, essa citocina é capaz de induzir uma cascata de reações que se contrastam entre neuroproteção e morte neuronal

(CROFT, 2009; O'CALLAGHAN, 2008). TNFR1 (também chamado de TNFR1, p55 e TNFRSF1A) é uma proteína de 55kDa e a ação do TNF via esse receptor promove ativação de caspases e consequente morte celular. O receptor do tipo 1 pode ser expresso por variados tipos celulares e seus efeitos citotóxicos despertam bastante interesse de estudo. Além disso, TNFR1 parece ser o receptor de alta afinidade para TNF solúvel (GRELL *et al.*, 1998; WAJANT *et al.*, 2003; BRENNER *et al.*, 2015; CABAL-HIERRO E LAZZO, 2012). A ativação de TNF via TNFR1 está implicada na ativação de dois complexos distintos. O complexo I, que desencadeia eventos antiapoptóticos e o complexo II, que promove morte celular. Estudos com animais deficientes para o receptor TNFR1 mostram que suas células B primárias apresentam defeitos morfofuncionais e que a angiogênese é intensificada nesses animais, diferentemente do que é encontrado nos animais *knockout* para o TNFR2. TNFR1 também está envolvido com a resposta contra microrganismos na medida em que ativa a toxicidade de TNF (PASPARAKIS *et al.*, 1996; PASPARAKIS *et al.*, 2000; LUO *et al.*, 2006; CABAL-HIERRO & LAZZO, 2012). Wiang *et al.* (2010) também mostraram que a interação de TNF com TNFR1 estimula células endoteliais cerebrais à angiogênese induzida por eritropoietina.

TNFR2 (ou TNF-R2, p75, TNFRSF1B) é uma proteína com 75kDa e sua ativação vem sendo descrita por desencadear respostas pró-sobrevivência, promovendo regeneração e neuroproteção (WARD-KAVANAGH *et al.*, 2016; BRENNER *et al.*, 2015; ETEMADI *et al.*, 2013; AGGARWAL, 2003). Este receptor é expresso principalmente por células do sistema imune, como os linfócitos (CABAL-HIERRO E LAZZO, 2012; LOCKSLEY *et al.*, 2001). Sua sinalização ativa proteínas adaptadoras, TRAF1 e TRAF2, e também a via de NF- κ B. Além disso, alguns estudos mostram que pode haver uma sinalização cruzada entre TNFR1 e TNFR2, exercendo efeitos diversos (RAO *et al.*, 1995; NAUDÉ *et al.*, 2011). Assim como na EH, a neuroinflamação está implicada em uma série de doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas. Assim, os efeitos de TNF têm despertado cada vez mais interesse. Em revisão e com o intuito de relatar os efeitos dos receptores I e II de TNF na Doença de Alzheimer, Ortí-Casañ *et al.* (2019) corroboraram a hipótese de que a expressão aumentada de TNFR1 acelera a doença de Alzheimer, enquanto que TNFR2 exerce efeitos contrários, representando assim um forte alvo terapêutico para o tratamento da doença.

Recentemente, Dong *et al.* (2016) inibiram a sinalização de TNFR1 e ativaram a sinalização seletiva de TNFR2, objetivando uma resposta neuroprotetora e regenerativa de TNF em um modelo murino para neurodegeneração aguda. Assim como TNF, seus receptores também exercem efeitos variados em diferentes regiões cerebrais. Estudos avaliando os

potenciais terapêuticos das diferentes vias ativadas por esses dois receptores vêm sendo cada vez mais realizados (STACEY *et al.*, 2017). Sabe-se que em um contexto de EH, os níveis de citocinas pro-inflamatórias, como é o caso do TNF, estão constantemente elevados. As células endoteliais do SNC expressam receptores para TNF e IL-6 e sua ativação está relacionada com processos de sinalizações celulares importantes no desenvolvimento da doença (D'MELLO e SWAIN, 2014 e 2017; CAPURON E MILLER, 2011). Ainda, TNF pode influenciar a produção de prostaglandinas e óxido nítrico nas células endoteliais cerebrais, as quais podem induzir alterações cerebrais importantes (AZHARI E SWAIN, 2018; D'MELLO e SWAIN, 2017; DANTZER *et al.*, 2008). Associado à inflamação sistêmica descrita ao longo da EH, é possível verificar também, elevados níveis de TNF circulante (HADIJHAMBHI *et al.*, 2018; LUO *et al.*, 2015; COLART *et al.*, 2013). Ademais, em experimentos *in vivo* e *in vitro* foi demonstrado que citocinas pro-inflamatórias estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (GÖRG *et al.*, 2006). Especificamente em FHA, associado ao edema cerebral, foi visto que, *in situ*, houve aumento da expressão de RNA mensageiro para IL-1 β , IL-6 e TNF (JIANG *et al.*, 2009b). Associado à falência hepática fulminante (FHF), foi demonstrado que os níveis séricos de TNF estavam aumentados. Além disso, a expressão de seus receptores em células mononucleares e hepatócitos também estava muito acima do que o encontrado em condições normais, corroborando o envolvimento direto de TNF na patogênese da doença (STREETZ *et al.*, 2000).

Já em animais deficientes para os receptores dessas mesmas citocinas, o edema cerebral foi diminuído, bem como o tempo para o surgimento do coma foi maior (BÉMEUR *et al.*, 2010c). Em modelo de rato para lesão hepática aguda induzida por tetracloreto de carbono (CCL4), Dong e colaboradores (2016) mostraram que o TNF foi capaz de exibir efeitos protetores e ao mesmo tempo prejudiciais. Os autores acreditam que os efeitos deletérios foram mais marcantes do que os protetores (DONG *et al.*, 2016).

Identificados como transportadores de amônia em mamíferos, Rhbg e Rhcg (glicoproteína B Rh) são expressos pelo rim, fígado e outros órgãos (MERHI *et al.*, 2000; HUANG E LIU, 2001). Em um estudo inédito, Wang e colaboradores (2018) mostraram que a expressão dos transportadores de amônia em camundongos com IHA encontrava-se aumentada, bem como os níveis de amônia. No grupo tratado com anti-TNF, foi observada redução significativa nos níveis de amônia, o que os autores sugerem como uma participação de TNF na regulação da expressão de Rhcg (WANG *et al.*, 2018).

Interferons (IFN) são importantes citocinas, classificadas de acordo com seu receptor específico. Os IFN- α e IFN- β são classificados como tipo I e se ligam ao receptor IFNAR. O

IFN- γ é classificado como tipo II e se liga ao receptor IFNGR (SCHRODER *et al.*, 2004). O IFN- γ é produzido por diversos tipos celulares, como células NK, linfócitos B e, mais abundantemente, por linfócitos T (YOUNG *et al.*, 1996). Durante a resposta inflamatória inicial, as células apresentadoras de antígenos induzem a produção de algumas citocinas, como IL-12 e IL-18 que, por sua vez, estimulam a produção de IFN- γ pelas células NK e linfócitos, amplificando cada vez mais a resposta inflamatória (MUNDER *et al.*, 1998; BOEHM *et al.*, 1997). Além de regular a função imune do organismo, o IFN- γ também pode regular a função endócrina (GROOLMAN *et al.*, 1978). Alguns genes envolvidos com eventos pró-apoptóticos, produção de óxido nítrico e efeitos antiproliferativos são modulados positivamente pelo IFN- γ (SCHRODER *et al.*, 2004).

No fígado de camundongos com fibrose hepática induzida, o IFN- γ excita a citotoxicidade de células NK e também estimula a apoptose de células estreladas hepáticas ativadas (JEONG *et al.*, 2008; RADAIEVA *et al.*, 2006). A ativação de células estreladas hepáticas é importante no desenvolvimento da fibrose hepática e pode ser iniciada por uma variedade de citocinas, fatores de crescimento e angiotensina II (BATALLER & BRENNER, 2005).

As citocinas da família IL-12 apresentam conexões e interações funcionais únicas entre as citocinas. Nesta família, estão as citocinas heterodiméricas, IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35. IL-12 e IL-23, que exercem, predominantemente, efeitos pró-inflamatórios (VIGNALI & KUCHROO, 2012; JONES & VIGNALI, 2011). Além disso, IL-12 pode induzir a produção de IFN- γ por células NK e células T ativadas (VIGNALI & KUCHROO, 2012). IL-12 é uma proteína de 70kDa envolvida nas respostas Th1. Sua forma bioativa é conhecida como IL-12p70, uma forma composta por duas subunidades unidas por dissulfetos (ZHANG & WANG, 2008). Em pacientes com insuficiência hepática decorrente do vírus da hepatite B, os níveis de IL-12p70 estão aumentados (XUE *et al.*, 2020). El-Emshty e colaboradores (2015) mostraram que pacientes com doença hepática crônica apresentam níveis elevados de IL-10 e IL-12 e sugeriram que essas citocinas podem estar envolvidas na progressão da inflamação crônica presente nesses casos. Dessa forma, o estudo das citocinas como possíveis biomarcadores do grau de inflamação devem ser mais explorado. Em estudo que comparou pacientes portadores de hepatite viral e não viral, os níveis séricos de IL-12 não apresentaram diferença estatística (REY & EFFENDI-YS, 2021). Interessantemente, IL-12 estimula a liberação de TNF pelas células T e NK, enquanto o TNF modula o estímulo ou inibição de IL-12. A ativação de TNFR1 inibe a produção de IL-12 por macrófagos (ZAKHAROVA & ZIEGLER, 2005). Em camundongos, Kaneda *et al.* (2003) mostraram que a administração de

IL-12 e IL-18 foi capaz de mediar esteatose hepática inflamatória, com comprometimento microcirculatório, levando à disfunção mitocondrial nos hepatócitos.

A IL-6 é composta por 212 aminoácidos e tem efeitos pleiotrópicos na inflamação, regulando processos neurais, regenerativos e metabólicos. É produzida por diversos tipos celulares, como macrófagos, células endoteliais e fibroblastos. Está envolvida tanto na resposta imune inata quanto adaptativa. No fígado, participa da síntese de substâncias de fase aguda (AKIRA, 1993; KISHIMOTO, 1989; HIRANO *et al.*, 1980). O aumento dessa citocina já foi observado em ratos com IHA e EH induzidas por TAA (WANG *et al.*, 2011). Em pacientes, os níveis de IL-6 foram associados à gravidade da cirrose hepática. A regulação positiva dessa citocina estimula a ativação de células estreladas hepáticas, que por sua vez, induzem à fibrose (REY & EFFENDI-YS, 2021). Ainda, neste mesmo estudo, os autores mostraram que os níveis de IL-23 foram mais baixos nos pacientes com EH em comparação com os que não apresentaram tal complicação, sugerindo que IL-23 não seria um bom marcador para prever EH. Luo e colaboradores (2012) mostraram que a não depuração da amônia em quadros de EH torna a barreira hematoencefálica mais permeável à IL-6, induzindo o edema astrocitário. Em um modelo de EH por ligadura do ducto biliar, os níveis de IL-6 no hipocampo também estavam aumentados, corroborando a hipótese de que essa citocina pró-inflamatória também interaja com o estresse oxidativo presente no SNC durante a EH (PIERZCHALA *et al.*, 2021). O uso terapêutico de tranilast, um medicamento anti-inflamatório, foi capaz de reduzir os níveis séricos de IL-6 em modelo de EH induzida por TAA. Luo e colaboradores (2012) mostraram que houve correlação positiva entre os níveis séricos de IL-6 e de amônia plasmática em pacientes com cirrose. Além disso, IL-6 foi implicada no comprometimento de funções do hipocampo (memória e aprendizagem) em camundongos (SPARKMAN *et al.*, 2006). Foi também descrito aumento nos níveis cerebrais de IL-6 em amostras *post-mortem* de tecido cerebral de pacientes alcoólatras com EH (DENNIS *et al.*, 2014).

A CCL2 é uma quimiocina com peso molecular entre 13 e 15 kDa, pertencente à subfamília CC. É expressa em linfócitos T, células NK e monócitos. Seu principal receptor é CCR2, presente em vários órgãos, incluindo o fígado (LAZENNEC & RICHMOND, 2010). CCL2 é capaz de regular citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF e também recruta macrófagos para os sítios de lesão (LU *et al.*, 1998; JIANG *et al.*, 1992). Bautista *et al.* (2002) mostraram que, em situação de intoxicação alcoólica, as células endoteliais e de Kupffer são preparadas para uma maior produção de quimiocinas. Além disso, a intoxicação crônica por álcool pode suprimir a função imune inata de células do fígado (BAUTISTA *et al.*, 2002).

Outros estudos mostram ainda uma importante participação de CCL2 em eventos inflamatórios no fígado. Kanda e colaboradores (2006) mostraram que, em camundongos, o aumento na expressão de CCL2 no tecido adiposo contribuiu para a esteatose hepática associada à obesidade, promovendo a infiltração de macrófagos. Além disso, em animais com superexpressão de CCL2 no tecido adiposo, foram detectados resistência à insulina e conteúdo de triglicerídeos hepáticos aumentados (KANDA *et al.*, 2006). Similarmente, em cultura de hepatócitos, Clément e colaboradores (2008) evidenciaram que CCL2 pode induzir o acúmulo de lipídeos. De maneira interessante, Mandrekar e colaboradores (2012) demonstraram que a ausência de CCL2 protege os animais contra a lesão hepática alcoólica, a partir da inibição de citocinas pró-inflamatórias (MANDREKAR *et al.*, 2012).

Avaliando a participação das quimiocinas em modelo experimental de EH associada à IHA, Faleiros e colaboradores (2014) mostraram aumento dos níveis encefálicos de CCL2, CX3CL1, CCL3 e CCL5 durante o surgimento dos sintomas na doença (FALEIROS *et al.*, 2014). Em modelo experimental de EH induzida por azoximetano, um estudo revelou que o aumento de CCL2 no córtex, fígado e soro está intimamente ligado à ativação da micróglia e consequente declínio neurológico durante a EH. Nesse mesmo estudo, os autores utilizaram inibidor do receptor 2 ou 4 de quimiocina e verificaram que houve redução das lesões hepáticas e neurológicas (ZHANG *et al.*, 2017; MCMILLIN *et al.*, 2016). Assim como relatado em diversos estudos, a inflamação sistêmica presente na EH ocasiona a neuroinflamação, que, por sua vez, altera padrões de neurotransmissão e prejudica funções cognitivas e motoras. Altos níveis de CX3CL1 e CCL20 são encontrados em pacientes com neuroinflamação e com EH. Além disso, há intensa ativação microglial e astrocitária, resultando em morte de células de Purkinje (CABRERA-PASTOR *et al.*, 2019; MANGAS-LOSADA *et al.*, 2017).

Os fatores neurotróficos formam um grupo heterogêneo de polipeptídeos que, por meio de receptores específicos, exercem importante papel no desenvolvimento, diferenciação, sobrevivência, manutenção e regeneração do sistema nervoso em mamíferos (MARKUS, *et al.*, 2002; LANNI *et al.*, 2010). São descritas três famílias de fatores neurotróficos. A família das neurotrofinas inclui o Fator de Crescimento Neural (NGF), o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e as Neurotrofinas 3 (NT3) e 4/5 (NT4/5). Neurotrofinas compreendem uma família de fatores neurotróficos relacionados, que apresentam estrutura altamente homóloga. Possuem grande similaridade na seqüência de aminoácidos e quando se associam aos seus receptores formam homodímeros, por ligação não covalente (MCDONALDS & CHAO, 1995; WARD-KAVANAGH *et al.*, 2016; LAI *et al.*, 1996; HALLBÖÖK, 1999;

TERENGI, 1999). Assim como muitos outros polipeptídeos ativos, neurotrofinas são sintetizadas como precursores, pró-neurotrofinas, as quais são posteriormente clivadas para darem origem às formas maduras. A clivagem da pró-neurotrofina pode ocorrer na via secretória ou após sua secreção, de forma que os receptores podem ser expostos tanto à pró-neurotrofina quanto à neurotrofina madura (HEMPSTEAD, 2006; TENG *et al.*, 2010). A especificidade da ação de cada neurotrofina ocorre pela sua interação seletiva com membros da família de receptores do tipo tirosina cinase (Trk). Assim, o NGF liga-se especificamente a TrkA (KAPLAN *et al.*, 1991; KLEIN *et al.*, 1991), enquanto BDNF e NT 4/5 ligam-se ao TrkB. A família do Fator Neurotrófico Derivado da Glia (GDNF) é composta pelo próprio GDNF, pela Neurturina (NTN), pela Persefina (PSP) e pela Artemina (ART) (AIRAKSINEN *et al.*, 2002). A expressão de fatores neurotróficos e de seus receptores em processos de degeneração nervosa é diferencialmente regulada, de forma que os mesmos podem agir cooperativamente para promover a regeneração das fibras nervosas (FUNAKOSHI *et al.*, 1993; MARCOL *et al.*, 2007; NISHI, 1994; LEWIN & BARDE, 1996; BOYD; GORDON, 2003).

O BDNF é o segundo membro da família das neurotrofinas, que foi purificado do cérebro de porco em 1982 (BARDE *et al.*, 1982). O gene que codifica o BDNF é constituído por pelo menos oito promotores distintos, que iniciam a transcrição de múltiplos RNA mensageiros (RNAm). Embora até 18 transcritos possam ser produzidos, todos codificam uma única proteína madura de BDNF, de forma que é sugerido que esta complexa organização transcricional deva estar relacionada com diferentes níveis de regulação ou diferentes localizações subcelulares do BDNF ou de seus RNAm. Assim como o NGF, BDNF é secretado tanto na sua forma precursora, pró-BDNF, como na sua forma madura (PRUUNSILD *et al.*, 2007; GREENBERG *et al.*, 2009; BEGNI *et al.*, 2016). A investigação dos fatores neurotróficos como potencial tratamento para doenças neurodegenerativas muito comuns, como as Doenças de Parkinson e de Alzheimer, está em crescente ascensão (ALLEN *et al.*, 2013).

O BDNF, juntamente com seu receptor TrkB, é a neurotrofina mais amplamente expressa no SNC. O BDNF é produzido principalmente por neurônios, sendo mais abundante no hipocampo e córtex cerebral, mas também está presente no tálamo e hipotálamo, bulbo olfatório, amígdala, cerebelo e medula espinhal (CONNER *et al.*, 1997). As funções do BDNF no SNC estão bem definidas, incluindo ações nos processos de diferenciação neuronal a partir de células tronco, indução de crescimento axonal e dendrítico de neurônios, formação

e maturação de sinapses glutamatérgicas e GABAérgicas e o refinamento de conexões sinápticas, como potenciação de longo termo (LTP). Tais funções se relacionam com aprendizagem e formação de memória (BRAMHAM; MESSAOUDI, 2005); GOTTMANN; MITTMANN; LESSMANN, 2009; MINICHIELLO, 2009; EDELMANN *et al.*, 2013; PARK & POO, 2013). Alterações na expressão e função de BDNF estão relacionadas a uma série de distúrbios psiquiátricos, tais como estresse, depressão e esquizofrenia, além de distúrbios neurodegenerativos, como as Doenças de Parkinson e de Alzheimer, entre outras. Em função de seu envolvimento nessas doenças, o BDNF tem sido apontado como possível alvo para tratamentos farmacológicos e não farmacológicos das mesmas (HE *et al.*, 2013; BEGNI; RIVA; CATTANEO, 2016; TANILA, 2016). O BDNF também pode ser produzido por células inflamatórias, tais como monócitos, linfócitos e eosinófilos (KERSCHENSTEINER *et al.*, 1999); NOGA *et al.*, 2003; CHAN *et al.*, 2015).

Além de várias funções neuroprotetoras bem definidas, o BDNF desempenha papel fundamental nos processos de aprendizagem e memória (ZHANG, *et al.*, 2016). Nesse sentido, entender o papel dessa neurotrófica no contexto da EH pode mostrar novos alvos terapêuticos que previnam os déficits cognitivos apresentados ao longo da doença. Em recentes estudos, foi visto que a expressão de BDNF no córtex, hipocampo e corpo estriado foi significativamente diminuída em ratos com ligação do ducto biliar como modelo de EH. Os autores ressaltaram que a expressão de BDNF parece ser negativamente regulada pela neuroinflamação (DHANDA *et al.*, 2018; GALLAND *et al.*, 2017). Um estudo recente sugere que o BDNF esteja envolvido na fisiopatologia de EH e possa ser utilizado como um potencial biomarcador da doença (STAWICKA *et al.*, 2021). Em sinapses ativas, o BDNF induziu alterações morfológicas em astrócitos mediadas pelo receptor tirosina quinase B (TrkB). A senescência de astrócitos correlaciona-se diretamente com o estresse oxidativo, como é observado em diversas doenças neurodegenerativas. Em cultura de astrócitos, Görg e colaboradores (2018) verificaram que a toxicidade da amônia na EH pode estar associada à senescência precoce dos astrócitos. Assim, pode-se inferir que o envelhecimento de astrócitos, principalmente ocasionado pela hiperamonemia, seja capaz de interferir na estabilidade das conexões sinápticas (GÖRG *et al.*, 2018).

O Fator de Crescimento Neural (NGF) foi descrito por LEVI-MONTALCINI E HAMBURGER (1953), tendo sido, a partir daí, estabelecido seu papel no desenvolvimento, diferenciação e manutenção de neurônios (LEVI-MONTALCINI & ANGELETI, 1968; THOENEN & BARDE, 1980; LEVI-MONTALCINI, 1987). NGF foi primeiramente

purificado da glândula salivar do camundongo e descrito como um complexo de três polipeptídeos, designados como subunidades α , β e γ . Entretanto esse complexo não ocorre em outros tecidos do camundongo e nem em outras espécies, que expressam somente a subunidade β , responsável pela atividade biológica do NGF. As funções das subunidades α e γ na glândula salivar de camundongos ainda não estão esclarecidas, mas parecem relacionar-se com o metabolismo de calicreínas no órgão (MCDOLNAD et al., 1991; BRADSHAW et al., 1994).

O NGF tem ação bem determinada no SNC, agindo sobre os neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal, do núcleo caudado e do putamen. NGF é produzido no SNC tanto durante o desenvolvimento quanto na vida adulta, principalmente por neurônios do hipocampo, córtex e regiões olfatórias, alvos de neurônios colinérgicos. No entanto, células gliais, incluindo astrócitos e micróglia, também contribuem para essa produção. A expressão de NGF nessas regiões é marcadamente aumentada em situações de isquemia, hipoglicemia e lesão tecidual (LINDVALL et al., 1994; SOFRONIEW; HOWE; MOBLEY, 2001; Barry *et al.*, 2011). As ações do NGF sobre neurônios incluem ativação, indução de diferenciação, sobrevivência e proliferação, regulação da sinapse e da síntese de neurotransmissores; além de possuir papel protetor em condições de degeneração. Além de suas ações originalmente definidas no sistema nervoso, vários outros papéis têm sido atribuídos ao NGF, entre eles participação em processos de proliferação e ativação celular (NICO *et al.*, 2008; BLAIS *et al.*, 2013), balanço energético (FARGALI *et al.*, 2012) gametogênese (LINHER-MELVILLE; LI, 2013) e, de maneira notável, o papel de promover comunicação entre os sistemas nervoso e imune (ALOE; SIMONE; PROPERZI, 1999; SCURI *et al.*, 2010; KRITASL *et al.*, 2014; ALOE *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2017). O declínio cognitivo observado em diversas doenças tem sido associado às alterações de NGF, como nas Doenças de Alzheimer e de Parkinson, por exemplo (BARBOSA *et al.*, 2012).

Descoberto bem depois de NGF e BDNF, o GDNF tem efeito sobre o crescimento, proteção e regeneração de neurônios e células nervosas. Foi inicialmente descoberto em neurônios dopaminérgicos embrionários do mesencéfalo de ratos. Logo depois, verificou-se que seu efeito neuroprotetor estendia-se a outros tipos de células nervosas, como por exemplo os astrócitos (LIN *et al.*, 1993; AIRAKSINEN, *et al.*, 1999 e 2002). O GDNF pertence à família de fatores de crescimento e transformação do tipo β (TGF β) e está intimamente ligado à regeneração de nervos periféricos, promovendo crescimento e alongamento axonal (SCHERER *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2001). O GDNF atua por meio dos receptores

extracelulares GFR α 1-4, sendo que possui maior afinidade para GFR α 1 (SARIOLA e SAARMA, 2003).

Sabe-se que o GDNF é produzido por células nervosas (BURKE, 2006). Na Doença de Parkinson, exerce forte efeito sobre a restauração de neurônios dopaminérgicos (PASCUAL *et al.*, 2011). Alguns estudos têm mostrado que o GDNF exibe efeito protetor e homeostático tanto na barreira hematoencefálica, como também em neurônios GABAérgicos (IBANEZ e ANDRESSO, 2016; IGARASHI *et al.*, 2000). Além disso, exerce efeitos na ativação microglial e diminuição da inflamação neuronal (SUN *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2012). Por isso, tem sido amplamente estudado como um alvo terapêutico nas doenças neurodegenerativas (ALLEN *et al.*, 2013). Em contrapartida, existem relatos da participação desse fator neurotrófico em processos de envelhecimento e vários distúrbios e doenças neuropsiquiátricas (revisão em POPOVA *et al.*, 2017).

Poucos são os estudos que avaliam a participação do GDNF nas hepatopatias. GDNF e seu receptor cognato são expressos no fígado e desempenham importante papel no metabolismo lipídico (MWANGI, *et al.*, 2014). Além disso, promove diferenciação e regeneração de neurônios dopaminérgicos (LIN *et al.*, 1993). Vakili *et al.* (2016) mostraram redução de gordura de até 60% em fígados de animais com esteatose. Os fígados foram perfundidos com GDNF, o que estimulou a lipólise nesses órgãos. Além disso, Mwangi e colaboradores (2014) mostraram que camundongos transgênicos que superexpressavam GDNF foram resistentes ao ganho de peso e esteatose induzidos por dieta hipercalórica. Em modelo experimental para isquemia cerebral, o GDNF administrado via intravenosa exibiu melhora no desempenho comportamental dos animais e aumento dos níveis desse fator neurotrófico no hemisfério cerebral infartado (HORITA *et al.*, 2006). No contexto da EH, GDNF parece ainda não ter sido estudado.

1.5 Sistema renina-angiotensina e encefalopatia hepática

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um conjunto peptídico-enzimático envolvido no processo de vasoconstrição, que regula o volume de líquidos extracelulares e pressão arterial, objetivando, assim, uma homeostase circulatória (SPARKS *et al.*, 2014). Este sistema influencia amplamente as funções cardiovasculares, cerebrais e renais por meio de múltiplos mediadores, receptores e mecanismos de sinalização intracelular (CAREY & SIRAGY, 2003; CHAPPELL *et al.*, 2004; SIMÕES E SILVA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2008). O eixo clássico do SRA é constituído pela enzima conversora de angiotensina (ECA), angiotensina II (Ang II) e seu receptor do tipo 1 (AT1), por meio do qual a Ang II exerce a maior parte de

seus efeitos (ORO *et al.*, 2007; WOLF, 2006). A fisiologia do eixo clássico de SRA inicia-se com a renina, que é uma enzima proteolítica encontrada nos tecidos ou circulação sob a forma ativa ou inativa (pró-renina). A concentração de renina circulante está relacionada com a velocidade de formação da Ang II. Nos seres humanos, um único gene localizado no cromossomo 1 codifica a renina. Sua forma ativa é capaz de clivar o angiotensinogênio (uma glicoproteína plasmática, sintetizada principalmente no fígado) para a formação de angiotensina I, que, na sequência, é clivada pela ECA para a formação de Ang II, que é o principal peptídeo ativo do SRA (SPARKS *et al.*, 2014; A.J., MARIAN, 2013; CRACKOWER, *et al.*, 2002). Sabe-se que seu receptor AT1 é altamente expresso em células endoteliais cerebrovasculares, neurônios e astrócitos. A ação de Ang II via receptor AT1 ativa as células da glia e neurônios dopaminérgicos, o complexo NADPH-oxidase, que é uma das fontes intracelulares de espécies reativas de oxigênio (BABIOR, 2004; SESHIAH, *et al.*, 2012). Além disso, foi verificado acúmulo de ferro em órgãos como fígado, rim e coração em estudos com a administração de Ang II em ratos (SAITO *et al.*, 2005; ISHIZAKA *et al.*, 2002). Alguns estudos mostraram que a ativação em excesso do eixo clássico do sistema SRA no SNC potencializa a resposta inflamatória da micróglia e promove o estresse oxidativo e degeneração do tecido nervoso (GARRIDO-GIL *et al.*, 2013; JOGLAR *et al.*, 2009; RODRIGUEZ-PALLARES *et al.*, 2008).

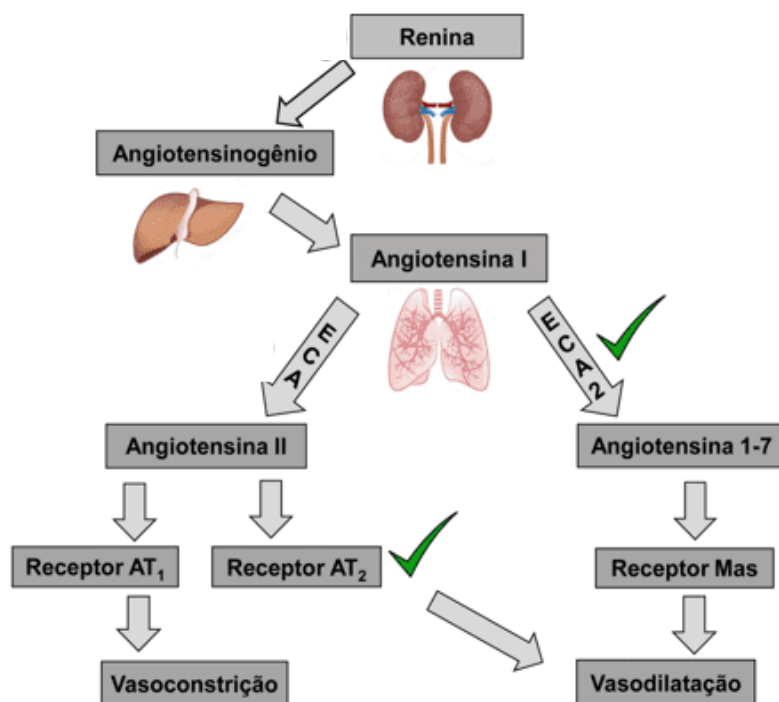


Figura 02: Sistema renina-angiotensina – eixo clássico (adaptado de Simões e Silva, AC *et al.*, 2017; Sônia Villapol, 2015).

Vários trabalhos têm sugerido que os bloqueadores dos receptores AT1 da Ang II são neuroprotetores e potenciais alvos terapêuticos em diferentes doenças neurológicas (SÔNIA VILLAPOL, 2015). Atualmente, existem diversos tipos de bloqueadores clinicamente disponíveis. Tais bloqueadores estão associados à redução das respostas inflamatórias e da apoptose induzida pelo glutamato. Estes bloqueadores entram no encéfalo, protegendo o fluxo sanguíneo cerebral, mantendo a função da barreira hematoencefálica e reduzindo a inflamação excessiva e as alterações neuronais em modelos experimentais de isquemia e reperfusão cerebral, e nas Doenças de Alzheimer e de Parkinson (SÔNIA VILLAPOL, 2015).

Em doenças hepáticas, são comuns os eventos neuroinflamatórios e fibróticos (LUBEL *et al.*, 2008). Alguns estudos defendem a participação ativa do eixo clássico do SRA na fibrose hepática. A Ang II promove diferenciação e proliferação de miofibroblastos no fígado (BATALLER & BRENNER, 2001). Além disso, a maioria dos efeitos mediados pela ação de Ang II no fígado parecem acontecer via receptor AT1 (KANNO *et al.*, 2003). No que diz respeito ao envolvimento do SRA no sistema nervoso e à ação de TNF, sabe-se que os neurônios dopaminérgicos apresentam alta sensibilidade aos efeitos dessa citocina (MOGI *et al.*, 1994). Borrajo e colaboradores (2014) demonstraram a existência de uma interação entre Ang II e TNF microglial. Tal relação exerce influência sobre a degeneração de neurônios dopaminérgicos (BORRAJO *et al.*, 2014).

A identificação de novos componentes do SRA ampliou sua complexidade. Atualmente, admite-se a existência no SRA de um eixo contrarregulatório intrínseco ou alternativo, formado pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (TIPNIS *et al.*, 2000; DONOGHUE *et al.*, 2000), que cliva Ang II em angiotensina Ang-(1-7) que, por sua vez, atua em seu receptor específico, o receptor Mas (SANTOS *et al.*, 2003). As funções desse novo eixo são, na maioria das vezes, opostas às funções atribuídas ao eixo clássico do SRA (SANTOS *et al.*, 2008; MASCOLO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2018). Em estudo recente sobre a ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas, Kangussu *et al.* (2015) mostraram que efeitos cardioprotetores foram obtidos em resposta ao aumento dos níveis circulantes de Ang-(1-7). Houve redução de hipertrofia e lesões cardíacas (KANGUSSU *et al.*, 2015). No cérebro de animais hipertensos, a infusão de Ang-(1-7) reduziu a concentração de Ang II e a expressão de seu receptor AT1, aumentando a sensibilidade do barorreflexo. Além disso, a administração dessa angiotensina está implicada na redução do estresse oxidativo e morte neuronal no cérebro de ratos hipertensos (JIANG *et al.*, 2013; KAR *et al.*, 2011). Prestes e colaboradores (2017) revisaram dados de vários trabalhos que mostram o efeito inibitório do eixo ECA2/Ang-(1-7) / receptor Mas sobre a liberação de citocinas e ativação de vias de

sinalização envolvidas em processos inflamatórios e fibróticos de várias doenças, tais como doença renal crônica, doenças hepáticas e asma. (PRESTES *et al.*, 2017).

O papel do SRA nas doenças neurodegenerativas tem sido amplamente investigado (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2017). Na Doença de Parkinson, verificou-se que os níveis de Ang II são mais elevados no cérebro do que na circulação. Além disso, especula-se sobre o envolvimento do SRA na fisiopatologia da morte neuronal que ocorre na Doença de Parkinson, visto que o bloqueio do SRA atenuou as lesões e os sintomas da doença (MERTENS *et al.*, 2010; VALENZUELA *et al.*, 2010). Utilizando fármaco inibidor de ECA, Hariharan *et al.* (2014) mostraram significativa melhora dos padrões neurocomportamentais, redução das ações enzimáticas prejudiciais e também do estresse oxidativo ocasionados pela Ang II em modelo experimental de Doença de Huntington. Em estudos sobre esclerose múltipla em camundongos, a Ang II também foi relacionada à inflamação do SNC, à medida em que atua sobre a regulação de TGF- β (LANZ *et al.*, 2010). Dessa forma, os efeitos deletérios do eixo ECA/Ang II/ receptor AT1 têm sido cada vez mais relacionados às lesões celulares presentes nas doenças neurodegenerativas.

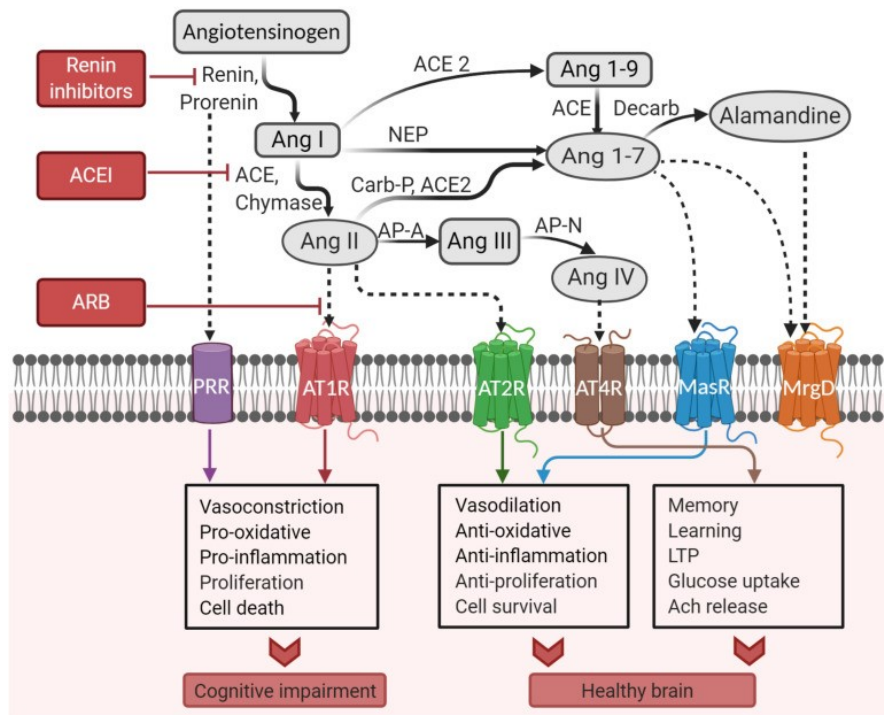


Figura 03: Sistema renina-angiotensina no sistema nervoso central - Efeitos via receptor AT1 e AT2 (adaptado de Cosarderelioglu *et al.*, 2020).

Estudos clínicos e experimentais sugerem que o eixo clássico do SRA (ECA/Ang II/ receptor AT1) acentua a neuroinflamação em diferentes doenças neurológicas. A ação de Ang

II via receptor AT1 é capaz de ativar a produção de espécies reativas de oxigênio em células da glia e neurônios dopaminérgicos (BABIOR, 2004; SESHIAH, *et al.*, 2012). A hiperativação neuronal de Ang II e ECA tem sido associada ao aumento da morte celular e neurodegeneração desencadeadas por processos inflamatórios em diferentes doenças neurológicas (LABANDEIRA-GARCIA *et al.*, 2017). Recentemente, demonstramos a interação entre o SRA e o óxido nítrico na fase aguda da infecção por *T. cruzi* em ratos. Os animais infectados e tratados com L-NAME, um inibidor da enzima NO sintase apresentaram maior parasitemia, parasitismo cerebral e neuroinflamação associados à redução dos níveis teciduais de ECA2 (RACHID *et al.*, 2019). Por outro lado, a Ang-(1-7) quando se liga ao receptor Mas promove efeitos neuroprotetores, antiapoptóticos e anti-inflamatórios (JIANG *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2018). Os efeitos benéficos da infusão intraventricular de Ang-(1-7) também foram demonstrados em ratos com isquemia cerebral permanente. A Ang-(1-7) melhorou os déficits neurológicos, reduziu o volume do infarto e de citocinas pró-inflamatórias no encéfalo (JIANG *et al.*, 2012). Outro possível mecanismo de neuroproteção induzido pela redução da atividade do eixo clássico e aumento da expressão dos componentes do eixo alternativo do SRA está associado à elevação dos níveis dos fatores neurotróficos no encéfalo, especialmente do BDNF (FOUDA *et al.*, 2017; ISHRAT *et al.*, 2015). Candesartan, um antagonista de receptores AT1, promoveu aumento da neuroplasticidade e da concentração de BDNF no cérebro de ratos submetidos à isquemia e reperfusão (ISHRAT *et al.*, 2015).

No entanto, não existem estudos sobre a participação dos eixos clássico e alternativo do SRA na EH experimental. Acredita-se que a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e da participação do SRA na EH auxilie na busca por futuros alvos terapêuticos que possam atuar como neuroprotetores e anti-inflamatórios nesta grave complicação da FHA ou da FHC. Para essa finalidade, o presente estudo avaliou as concentrações de moléculas das duas vias do SRA, de CCL2, de citocinas e de fatores neurotróficos no hipocampo e no córtex pré-frontal de camundongos com EH induzida por TAA.

1. OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Avaliar os componentes das vias clássica e alternativa do SRA e dos parâmetros inflamatórios e neuroquímicos no córtex pré-frontal e no hipocampo de camundongos com EH induzida por TAA.

2.2 - Objetivos específicos

Nos grupos controle e nos animais submetidos à indução da EH com TAA:

- 2.1.1 Avaliar a atividade locomotora através do teste de campo aberto;
- 2.1.2 Verificar as alterações histopatológicas no fígado;
- 2.1.3 Medir as concentrações dos componentes do SRA (Ang II, Ang 1-7, ACE e ACE2) no córtex pré-frontal e no hipocampo;
- 2.1.4 Quantificar os níveis de TNF, IFN- γ , IL-6, IL-12 p70 e da quimiocina CCL2 no córtex pré-frontal e hipocampo;
- 2.1.5 Mensurar as concentrações dos fatores neurotróficos (BDNF, NGF e GDNF) no córtex pré-frontal e hipocampo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e grupos experimentais

No presente estudo, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, machos e fêmeas com oito a doze semanas de idade, obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB-UFMG). Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum*. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG e aprovado (protocolo 341/2018). Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle, que recebeu apenas salina via intraperitoneal e grupo com EH induzida via administração de TAA, conforme descrito previamente pelo nosso grupo de pesquisa (FALEIROS *et al.*, 2014).

3.2 Indução da insuficiência hepática

A insuficiência hepática foi induzida por meio da administração intraperitoneal de dose única de 600 mg/kg de TAA (CH_3CSNH_2), conforme padronizado previamente pelo nosso grupo de pesquisa (Miranda *et al.*, 2010; Faleiros *et al.* 2014). Os animais receberam aplicações de soro glicosado diárias para evitar a desidratação e hipoglicemia causadas pelo fármaco. Após 1, 3 e 7 dias, os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal em sobredose de xilazina e cetamina, com posterior remoção dos encéfalos e fígados para análise. Fragmentos do lobo lateral esquerdo do fígado foram coletados e armazenados em formol tamponado a 10%. Os encéfalos de cada animal foram devidamente retirados, acondicionados e estocados no freezer -20°C até o processamento para realização de ensaio imunoenzimático (ELISA) e *cytometric bead array* (CBA).

3.3 Análise de parâmetros comportamentais

Os parâmetros comportamentais foram avaliados por meio do teste de Campo Aberto (*Open Field*). O teste comportamental denominado Campo Aberto é utilizado em estudos experimentais para investigar simultaneamente a atividade locomotora e exploratória, bem como níveis de ansiedade (PODHORNA & BROWN, 2002). É um método válido e amplamente empregado na avaliação de parâmetros comportamentais em modelos experimentais de diversas doenças humanas (TAKAHASHI *et al.*, 2006). Antes do teste, os animais foram conduzidos ao local do experimento para minimizar os efeitos da transferência sobre o resultado dos testes. Os aparelhos foram devidamente limpos após a avaliação de cada animal, para evitar a influência de odores durante o teste (TAKAHASHI *et al.*, 2006). Um

sistema de captação de imagem foi utilizado para registrar o comportamento dos animais, com intuito de facilitar a avaliação dos parâmetros investigados. Para análise dos testes realizados foi utilizado o software Anymaze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

3.4 Avaliação histopatológica do fígado

Fragmentos do lobo lateral esquerdo do fígado foram fixados em formol tamponado a 10% ou armazenados em freezer a -20°C. Em seguida, foram feitos cortes do tecido obtendo-se fatias de 1 mm de espessura. Posteriormente, as fatias foram desidratadas em séries crescentes de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cada amostra foi cortada e processada em micrótomo para obter-se secções de 4 µm de espessura em intervalos de 70 µm e coradas em hematoxilina-eosina. Cortes seriados de 4 µm foram obtidos a partir dos blocos de parafina, transferidos para lâminas gelatinizadas e posteriormente desparafinizados e reidratados. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris.

3.5 Dosagem dos componentes do Sistema Renina Angiotensina [ACE, Ang II, ACE2 and Ang-(1-7)] por ensaio imunoenzimático

As concentrações dos componentes do SRA no córtex e no hipocampo foram avaliadas por meio de kits de ELISA, conforme instruções do fabricante (MyBioSource, San Diego, CA, USA). As amostras foram cuidadosamente homogeneizadas em solução de extração. (100 mg de tecido por mL), contendo 0.4M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, juntamente com os inibidores de proteases fluoreto de fenilmetilsufonila 0.1 mM, 0.1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA and 20 KIU aprotinina, usando Ultra-Turrax. O tecido foi então macerado por um homogeneizador ultrassônico. Após a maceração, o homogeneizado resultante foi centrifugado a 13,000g por 10 min at 4°C. O sobrenadante foi recolhido, aliquotado e estocado em freezer -70° C até utilização para o ensaio imunoenzimático. A técnica utilizada foi ELISA sanduíche, exceto para ECA, onde aplicamos o método ELISA competitivo. As avaliações bioquímicas foram realizadas por pesquisa cega. Os resultados foram expressos em pg/100mg de tecido. A sensibilidade dos ensaios foi de 1,0pg/mL para ECA e ECA2; 2,0 pg/ml para Ang-(1-7) e 18,75 pg/mL para Ang II.

3.6 Mensuração dos fatores neurotróficos NGF, BDNF e GDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo

As concentrações dos fatores neurotróficos (BDNF, GDNF e NGF) foram detectadas no homogenato do córtex pré-frontal e do hipocampo de cada animal, por ELISA, utilizando-se

anticorpos (R&D Systems, DuoSet) e de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. As amostras foram pesadas e trituradas em tampão de lise por um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125, Fisher Scientific). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 14.000 RPM por 20min, a 4°C, e o sobrenadante colhido, aliquotado e estocado a -80°C. Posteriormente, placas de 96 poços (Maxisorb) foram sensibilizadas com anticorpos de captura específicos (diluídos em solução de PBS 1x e BSA 0,1%) e incubadas overnight a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% Tween-20 e então bloqueadas por 2 horas com solução de PBS 1x e BSA 1% à temperatura ambiente. As amostras e o padrão para citocinas foram diluídos (em PBS 1x e BSA 0,1%) e incubados overnight a 4°C. No dia seguinte, as placas foram novamente lavadas três vezes (com PBS contendo Tween-20) e incubadas à temperatura ambiente com anticorpos de detecção (biotinilados) durante duas horas. Adicionou-se uma solução contendo streptavidina ligada à peroxidase (Pharmingen), mantendo o sistema em repouso por 20 minutos. Posteriormente, as placas foram lavadas novamente e adicionou-se solução substrato contendo tampão citrato, ortofenildiamina (OPD, Sigma) e peróxido de hidrogênio (Merck). A reação foi interrompida adicionando-se solução de ácido sulfúrico 1M (Merck). A densidade óptica foi quantificada com o uso do espectrofotômetro (Status - labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) no comprimento de onda de 490 nm (nanômetro). Os resultados foram expressos em pg/100mg de tecido.

3.7 Detecção dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IFN- γ , IL-6, IL-12p70) e da quimiocina CCL2 no córtex pré-frontal e no hipocampo

Fragmentos de córtex pré-frontal e do hipocampo foram homogeneizados em uma solução de extração PBS contendo um coquetel inibidor de protease (100 mg de tecido por mililitro) contendo NaCl, 20mM Tris-Hcl, 10 % glycerol, 1mM PMSF, 1 μ M Pepstatina A, 10mM EDTA, 10 μ M E-64 e 0,5 mM vanadato de sódio. Em seguida, os lisados foram centrifugados a 13.000g, durante 10min a 4°C e armazenados a -70°C. O sobrenadante foi coletado. As concentrações das citocinas TNF, INF- γ , IL-6, IL-12p70 e da quimiocina CCL2 foram mensuradas usando o kit BD™ CBA Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences, San Diego, CA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração dos mediadores inflamatórios foi determinada por FACSCanto (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). O limite de detecção do ensaio CBA foi de cerca de 0,2 pg/mL.

3.8 Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram avaliados com relação ao tipo de distribuição, usando-se o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. As diferenças foram comparadas usando o teste t de Student. Todas as análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Atividade locomotora e alterações histopatológicas

Os animais que receberam TAA apresentaram redução significativa da atividade locomotora comparados aos seus controles ($p < 0,0001$) (Fig. 1 A). Além disso, os animais com EH apresentaram lesão hepática grave, caracterizada por necrose hemorrágica de distribuição centrolobular a médio zonal de todos os animais avaliados (Fig. 1 B-G).

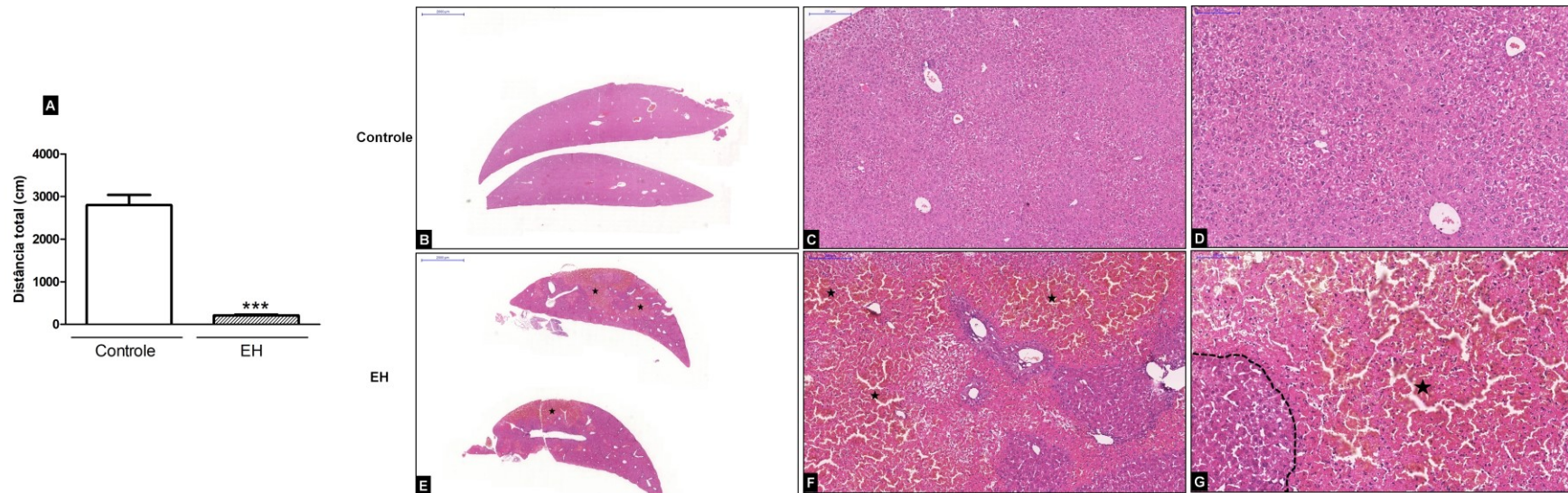


Figura 4. Redução da atividade locomotora e histopatologia do fígado após encefalopatia hepática induzida pelo TAA. Os camundongos foram submetidos ao teste de campo aberto 24 horas após a administração do TAA. (A) A atividade motora foi reduzida em camundongos tratados com TAA, em comparação com animais controles (***) $p < 0,001$. $n=7$ por grupo. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Fotomicrografias das secções do fígado coradas em H&E. Animal controle - fígado com aspecto histológico normal (B-D). Camundongo tratado com TAA (E-G) exibiu necrose hemorrágica maciça (estrelas) com distribuição

4.2 Níveis dos componentes do SRA (Ang II, Ang 1-7, ACE e ACE2) no córtex pré-frontal e no hipocampo

Os níveis de Ang II tanto no córtex pré-frontal (A) quanto no hipocampo (Fig. 2B) foram similares nos grupos controle e EH (n=5 por grupo). A EH promoveu redução da expressão de Ang (1-7) em ambas as regiões avaliadas (*p<0,05) (Fig. 2 C e D). Além disso, houve aumento da razão Ang II/Ang (1-7) no córtex pré-frontal de camundongos com HE (*p<0,001) (Fig. 2 E), quando comparado com animais controle.

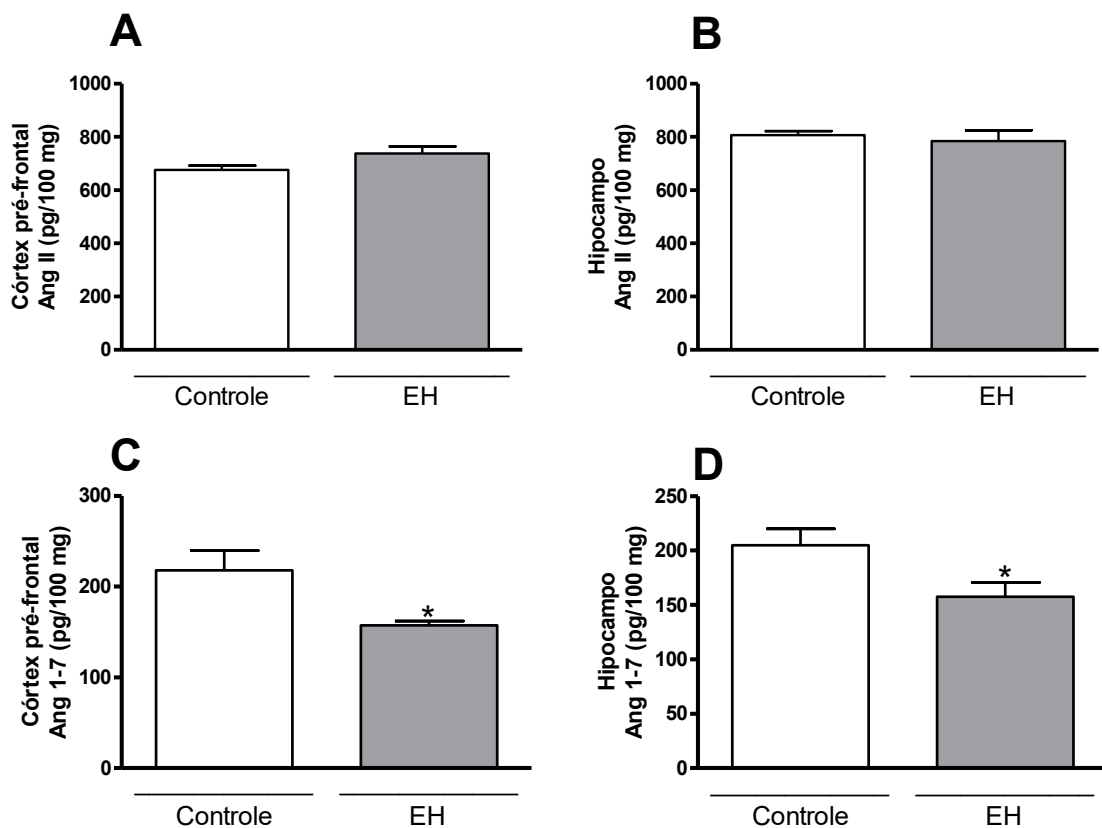


Figura 5. Expressão de Ang II, Ang (1-7) e Ang II/Ang (1-7) no córtex pré-frontal e hipocampo após 24 horas de administração de TAA em camundongos. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. N=5 por grupo.

TAA induziu aumento da expressão ACE no córtex pré-frontal (*p<0,05) (Fig. 3 A). Esta diferença não foi observada no hipocampo (Fig. 3 B). Níveis semelhantes de ACE2 (C e D), bem como da razão ACE/ACE2 (Fig. 3 E e F) foram similares em ambos os grupos e regiões avaliadas (n=5, por grupo).

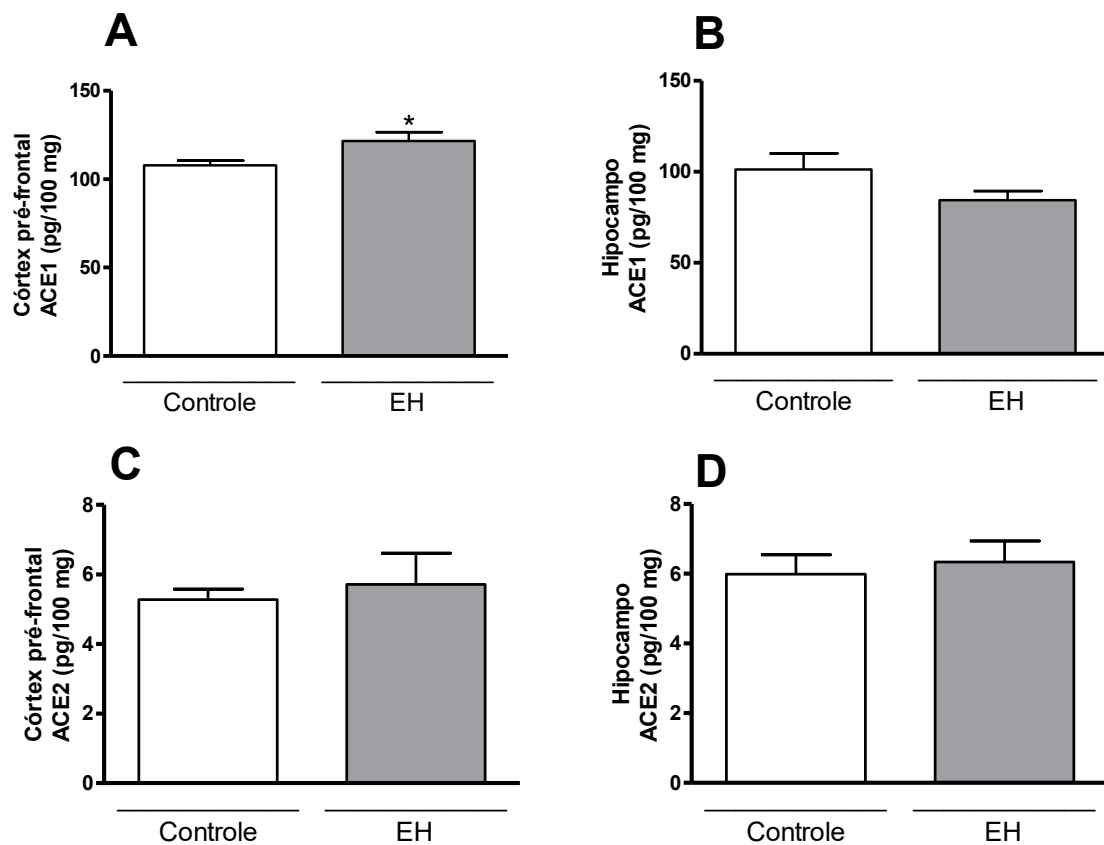


Figura 6. Expressão de ACE e de ACE2 no córtex pré-frontal e no hipocampo, 24 horas após indução com TAA em camundongos. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. N=5 por grupo.

4.3 Concentrações de TNF, IFN- γ , IL-6, IL-12 p70 e da quimiocina CCL2 no córtex pré-frontal e hipocampo

Os animais com EH apresentaram aumento dos níveis IFN-gama (** $p < 0,005$) no córtex pré-frontal (Fig. 4 B) e TNF (* $p < 0,02$) (Fig. 4 A), IL-6 (** $p < 0,002$) (Fig. 4 C) e IL-12 p70 (* $p < 0,05$) (Fig. 4 D) no hipocampo. Níveis mais elevados de CCL2 foram detectados no córtex pré-frontal (* $p < 0,05$) e no hipocampo (** $p < 0,0002$) dos animais com EH, em comparação com animais de controle.

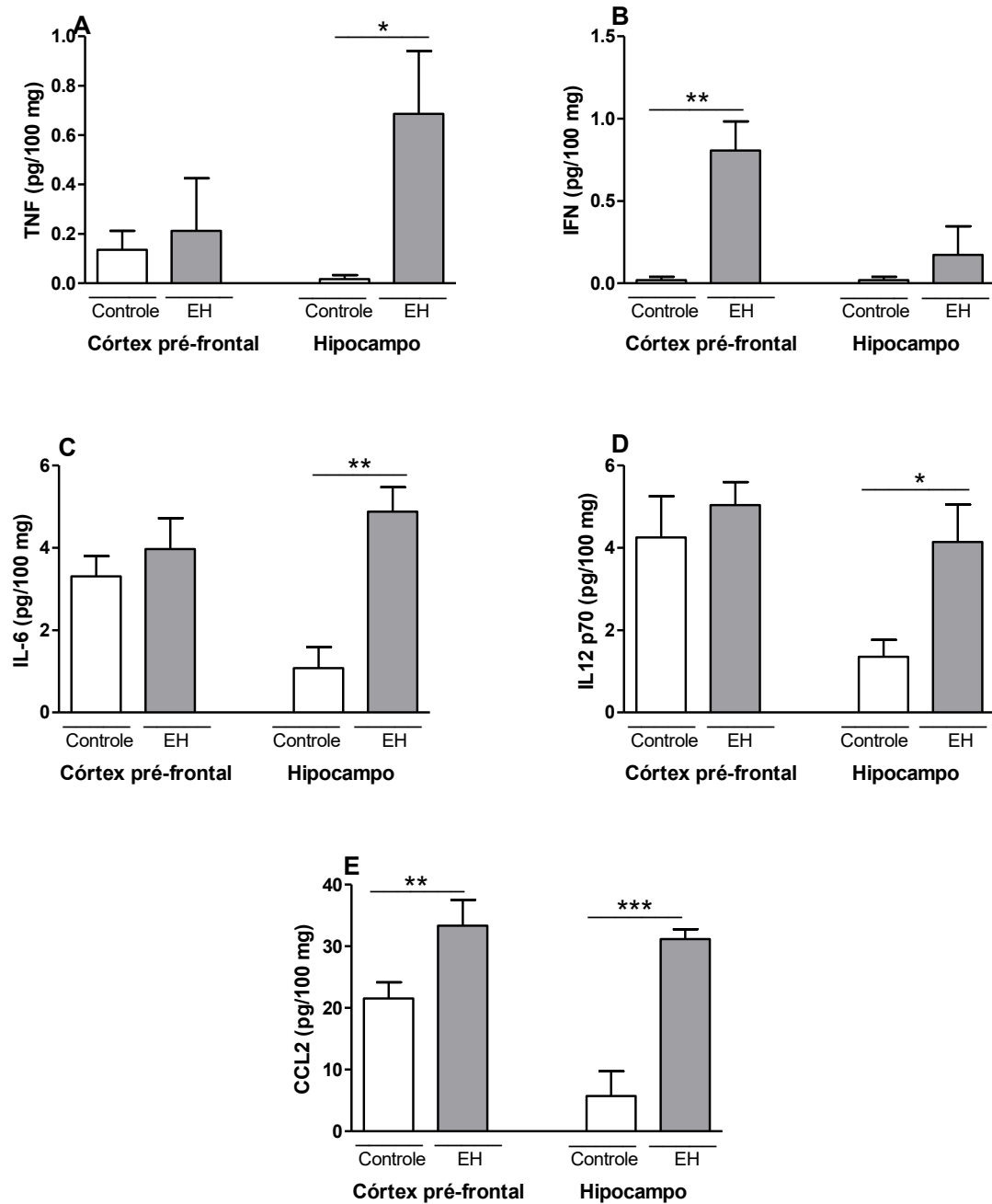


Figura 7. Níveis de citocinas TNF, IFN-gama, IL-6, IL12 p70 e da quimiocina CCL2 no córtex pré-frontal e no hipocampo 24 horas após a administração de TAA em camundongos. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. N=5 por grupo.

4.4 Dosagem dos fatores neurotróficos (BDNF, NGF e GDNF) no córtex pré-frontal e hipocampo

As concentrações dos fatores neurotróficos BDNF (Fig. 5 A-B) e GDNF (Fig. 5 E -F) não foram alteradas após a administração do TAA em ambas as regiões encefálicas avaliadas. Os níveis de NGF no córtex pré-frontal foram significativamente maiores nos animais com EH (** $p < 0,01$), comparado com os animais controles (Fig. 5 C). Ambos os grupos apresentaram níveis similares de NGF no hipocampo (Fig. 5 D).

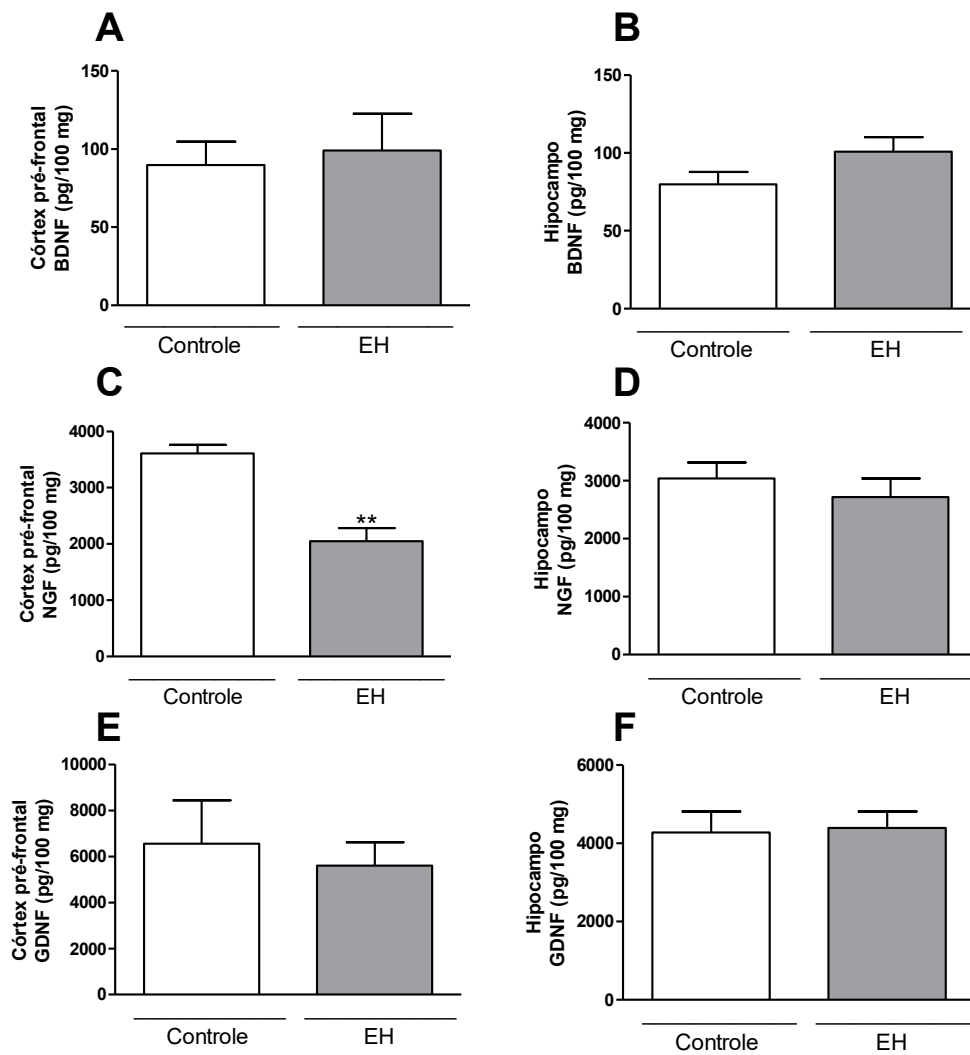


Figura 8. Níveis dos fatores neurotróficos BDNF, NGF e GDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo 24 horas após a administração de TAA em camundongos. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média. N=5 por grupo.

5. DISCUSSÃO

Resultante da FHA ou FHC e acarretando comprometimentos neuropsiquiátricos leves a sérios, tais como déficit de atenção e alterações psicomotoras, a EH exerce importante influência na qualidade de vida dos pacientes (VILSTRUP *et al.*, 2014; FELIPO, 2013). Afeta milhares de pessoas e o único tratamento definitivo ainda é o transplante de fígado. Estima-se que após um ano, a taxa de sobrevida do transplantado esteja em torno de 79% (GERMANI *et al.*, 2012). O diagnóstico e tratamento precoces elevam não só as taxas da expectativa de vida como também melhoram a qualidade de vida do paciente (FELIPO, 2013). Atualmente, existem várias classificações disponíveis e muito ainda se tem discutido sobre os tratamentos para EH e a importância de novos alvos terapêuticos (AMODIO, 2018; MONTAGNESE, *et al.*, 2018; NUSRAT *et al.*, 2014). Vários modelos experimentais para estudo da doença têm sido desenvolvidos e testados (CITTOLIN-SANTOS *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2019; DETRY *et al.*, 2013; BUTTERWORTH *et al.*, 2009).

A IHA é uma síndrome clínica com risco de vida, caracterizada por uma rápida perda de função dos hepatócitos em um paciente sem doença hepática pré-existente (O'GRADY, 2005). A causa mais comum de IHA nos Estados Unidos da América (EUA) e Reino Unido é overdose de paracetamol. No Brasil, um estudo recente revelou que aproximadamente 26% dos casos de IHA foram causados por lesão hepática induzida por drogas (SANTOS *et al.*, 2021). Vários agentes químicos como acetaminofeno, galactosamina, lipopolissacarídeo e TAA têm sido utilizados para a indução da lesão hepática aguda em roedores. Estes agentes químicos, dependendo da dose e do período de administração, têm sido aplicados para induzir lesão hepática aguda, fibrose hepática e cirrose em camundongos, ratos e *Macaca fascicularis* (MANGIPUDY *et al.*, 1995; MATSUO *et al.*, 2020; MIRANDA *et al.*, 2010). No presente estudo, os animais que receberam a administração de TAA exibiram áreas de necrose hemorrágica e presença de inflamação associada com aumento de marcadores de lesão hepática (ALT) e da atividade dos neutrófilos e macrófagos. Foi observado aumento dos níveis de ALT e piora da função de depuração do ICG, parâmetros usados para monitorar doenças hepáticas graves em humanos (BAUER *et al.*, 2004) e em animais (LUEDDE *et al.*, 2014). A morte celular e consequente disfunção hepática induzida pela TAA estão presentes em modelos experimentais com ratos e camundongos (BATALLER E BRENNER, 2005; BARKER E SMUCKLER, 1973). Dados similares foram descritos em ratos Sprague-Dawley. A TAA levou à necrose hepatocelular e infiltração de células inflamatórias (CZARNECKA *et al.*, 2020).

De maneira inédita, este trabalho avaliou a concentração de moléculas do eixo clássico do SRA, formado pela ECA, Ang II e seu receptor AT1, e do eixo contrarregulatório, constituído pela ECA2, Ang-(1-7) e seu receptor Mas (ORO *et al.*, 2007; WOLF, 2006; TIPNIS *et al.*, 2000; DONOGHUE *et al.*, 2000). Nossos dados sugerem que a formação de Ang(1-7) diminui no SNC de camundongos com EH induzida por TAA. Além disso, fornecemos evidências de que o eixo alternativo do SRA pode estar associado a efeitos neuroprotetores mediado por fatores neurotróficos. O SRA desempenha papel importante nos processos cognitivos e de diferenciação neuronal (JIANG *et al.*, 2013), bem como na fisiopatologia de doenças neurológicas, como a Doença de Alzheimer, acidente vascular cerebral isquêmico e Doença de Parkinson (KANGUSSU *et al.*, 2019b; LABANDEIRA-GARCIA *et al.*, 2017).

No presente estudo, verificamos a redução dos níveis de Ang-(1-7), bem como um aumento na concentração de ECA e na razão Ang II/Ang-(1-7) no encéfalo de camundongos com EH, um dia após a administração de TAA. Esses resultados sugerem que a redução da Ang-(1-7) possa ter contribuído para o processo neuroinflamatório que ocorre durante a EH experimental. No encéfalo, a Ang (1-7) é produzida principalmente a partir da clivagem da Ang II pela enzima ECA2. Sabe-se que as ações da Ang-(1-7) são opostas aos efeitos mediados pela ligação de Ang II ao seu receptor AT1 (SANTOS *et al.*, 2018).

Ang II, atuando via receptor AT1, exerce efeitos deletérios no cérebro, causando neurotoxicidade, inflamação e rompimento da barreira hematoencefálica (FARAG, *et al.*, 2017). Alguns trabalhos utilizando bloqueadores dos receptores AT1 mostraram redução significativa e proteção contra lesões ao SNC (LI *et al.*, 2008). Em doenças neurodegenerativas, como as Doenças de Parkinson e de Alzheimer, a estimulação de Ang II promoveu aumento na produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio, potencializando as chances de morte neuronal (JOGLAR *et al.*, 2009). O eixo ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas age em sentido oposto aos efeitos da Ang II. Esse eixo controla processos inflamatórios em várias doenças hepáticas e renais, reduzindo a liberação de citocinas e inibindo vias de sinalização envolvidas em processos fibróticos (revisão em PRESTES *et al.*, 2017; SILVEIRA *et al.*, 2013). As ações benéficas exercidas pela Ang-(1-7) ocorrem, em sua maioria, a partir da ativação do receptor Mas. No entanto, em escala bem menor, a Ang-(1-7) também pode agir via receptor AT2 (HELLNER, *et al.*, 2005). Esse eixo promove ação antioxidante, o que ajuda a manter a homeostase no endotélio vascular cerebral (VERMA, *et al.*, 2012; VAAJANEN *et al.*, 2008).

Vários trabalhos relatam que a Ang-(1-7) inibe diversos mecanismos neurodegenerativos, como estresse oxidativo e morte neuronal no cérebro de ratos hipertensos (JIANG *et al.*, 2013; KAR *et al.*, 2011). A infusão dessa angiotensina promoveu redução da concentração de Ang II e da expressão do receptor AT1. Prestes e colaboradores (2017) relataram os efeitos pro-inflamatórios e pro-fibróticos da Ang II que estão presentes em várias doenças humanas, como doença renal crônica, colite, aterosclerose dentre outras.

As citocinas desempenham papel chave na regulação dos processos inflamatórios (KELSO, 1998). IL-10, por exemplo, é uma citocina com poder anti-inflamatório, que inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias. Em presença de ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas houve maior produção de IL-10 durante a inflamação pulmonar (RODRIGUES-MACHADO *et al.*, 2013; SHENOY *et al.*, 2010; MOORE *et al.*, 2001). Estudos prévios realizados por nosso grupo mostraram aumento dos níveis séricos e cerebrais de citocinas (TNF, CXCL1/KC e CCL3/MIP-1 α) 24hs e 36hs pós-indução da EH. Acredita-se que a ativação microglial na EH estimule a produção de citocinas pró-inflamatórias, que ativam a neuroinflamação e acabam prejudicando o funcionamento cerebral (FALEIROS *et al.*, 2014).

Nossos resultados mostraram aumento de citocinas pró-inflamatórias tanto no córtex pré-frontal quanto no hipocampo de animais com EH. Esses dados reforçam o conhecimento descrito na literatura sobre a associação entre os elevados níveis de citocinas em pacientes e modelos experimentais de EH (REY & EFFENDI-YS, 2021; WU *et al.*, 2016; LICINIO & WONG, 1997). No presente estudo, avaliamos a expressão das citocinas IL-12p70, IL-6, TNF e IFN- γ , e da quimiocina CCL2. Dessa forma, ampliamos nossas investigações ao avaliarmos outros mediadores na patogênese da EH. As ações do TNF, citocina pró-inflamatória, ainda não são totalmente compreendidas no contexto da EH. No entanto, sabe-se que o TNF pode induzir a produção de prostaglandinas e óxido nítrico em células endoteliais cerebrais, além de se apresentar em níveis aumentados nas condições de FHC e EH (HADIJHAMBHI *et al.*, 2018; AZHARI E SWAIN, 2018; D'MELLO *et al.*, 2017; LUO *et al.*, 2015; COLART *et al.*, 2013; DANTZER *et al.*, 2008). Neste trabalho, confirmamos o aumento de TNF no hipocampo dos animais com EH. Estudos mostram que o bloqueio de TNF com etanercepte promoveu redução da inflamação periférica e encefálica e atraso na progressão da doença em camundongos com EH induzida por azoximetano. Além disso, houve redução da atividade microglial, do estresse oxidativo e dos níveis plasmáticos de amônia, além de normalização das concentrações de IL-6 (CHASTRE, *et al.*, 2012).

Sobre IL-6 e IL-12p70, verificamos aumento dos seus níveis no hipocampo de animais com EH. Diversos estudos mostraram a associação da gravidade da EH com níveis elevados de citocinas em modelos experimentais e em seres humanos, ou seja, a inflamação está intimamente ligada à piora do quadro de EH (REY & EFFENDI-YS, 2021; WU *et al.*, 2016; LICINIO & WONG, 1997). Níveis elevados de IL-6 são achados comuns em pacientes com EH. Alguns autores justificam que a hiperamonemia contribui para o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica para IL-6, o que induz edema astrocitário e consequente agravamento do quadro de EH. Além disso, IL-6 parece se relacionar com a indução de apoptose via ativação de STAT3.

No que diz respeito à quimiocina CCL2, esta esteve aumentada tanto no córtex pré-frontal quanto no hipocampo dos camundongos com EH. CCL2 exibe um papel importante no contexto inflamatório, pois pode regular citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF. Além disso, essa quimiocina está ligada à ativação da micróglia. Kanda e colaboradores (2006) observaram que o aumento na expressão de CCL2 contribui para a infiltração de macrófagos durante a esteatose hepática associada à obesidade em camundongos. Além disso, em animais com superexpressão de CCL2 no tecido adiposo, foi vista resistência à insulina e aumento dos triglicerídeos hepáticos (KANDA *et al.*, 2006). O aumento de CCL2 foi detectado sistemicamente após lesão hepática aguda induzida por azoximetano. Além disso, esta quimiocina foi envolvida na ativação da micróglia e no declínio neurológico associado à EH (MCMILLIN *et al.*, 2014). A ativação das células cerebrais se deve a sinais estimulantes promovidos por algumas quimiocinas. A CCL2, por exemplo, já foi estudada na condição de EH e foi verificado que seus níveis se encontram elevados em neurônios, o que também contribuiu para o aumento de IL-1 β e IL-6. A micróglia possui receptores específicos para as quimiocinas e citocinas, que certamente estão envolvidas na modulação da neuroinflamação (ZHANG *et al.*, 2017; MCMILLIN *et al.*, 2014). McMillin e colaboradores (2016) relataram expressão reduzida do receptor CX3CR1 na micróglia de camundongos com EH induzida por azoximetano. Os autores sugerem que a expressão de CX3CL1 (fraquitalquina) e seu receptor sejam negativamente regulados durante o déficit neurológico na EH e que, ao aumentarem os níveis de fraquitalquina por meio de uma infusão solúvel no cérebro de animais tratados com azoximetano, houve diminuição não só da ativação microglial, como também da lesão hepática e da expressão de IL-6, TNF- α e CX3CR1, reduzindo a neuroinflamação e se destacando como potencial alvo terapêutico. Além disso, a expressão da quimiocina pró-inflamatória CCL2, que também está envolvida na ativação da micróglia, foi reduzida nesse modelo de EH descrito pelos autores (MCMILLIN, *et al.*, 2016).

Em nosso trabalho, observamos níveis aumentados de IFN- γ no córtex pré-frontal. IFN- γ desempenha importante papel nas respostas inflamatórias, participando de várias vias de sinalização. Um estudo mostra que, no fígado de camundongos com fibrose hepática induzida, IFN- γ estimula a citotoxicidade de células NK e a apoptose de células estreladas hepáticas ativadas (JEONG *et al.*, 2008; RADAIEVA *et al.*, 2006). Em ratos com EH induzida por ligação do ducto biliar, os níveis de IFN- γ também estavam aumentados (HSU *et al.*, 2021).

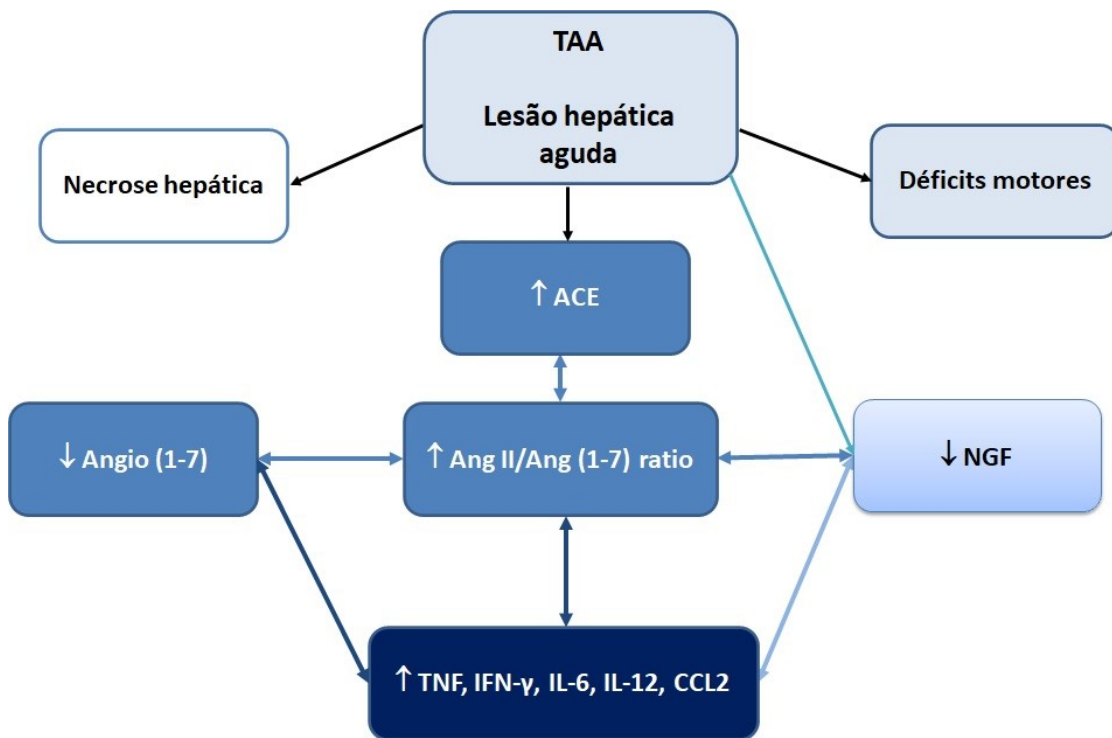
Sobre os fatores neurotróficos, sabemos que esses polipeptídeos são capazes de promover não só a manutenção, como também diferenciação, sobrevivência e manutenção neuronal (MARKUS, *et al.*, 2002; LANNI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.* 2000). Em nosso estudo, a redução de Ang-(1-7) e aumento da razão Ang II/ Ang-(1-7) ocorreu concomitantente à diminuição dos níveis de NGF no córtex pré-frontal de camundongos com EH. Da mesma forma, o aumento na expressão de Ang II e baixos níveis de NGF foram observados nos gânglios da raiz dorsal lombar ipsilateral de ratos com lesão de constrição crônica do nervo ciático. Os autores observaram a co-localização do receptor AT2 com NGF, mostrando uma potencial interação entre este fator neurotrófico e a sinalização aumentada do receptor AT2 (KHAN *et al.*, 2017). Em outro trabalho, o pré-tratamento com NGF atenuou efeitos induzidos por Ang II em neurônios do núcleo do trato solitário (ENDOHO *et al.*, 2008). Além disso, a expressão de ECA foi diminuída em células neuronais de ratos e camundongos quando cultivadas com NGF (KOSHYA *et al.*, 1985).

Similar ao nosso trabalho, outros estudos também observaram que a expressão de fatores neurotróficos pode ser negativamente regulada pela neuroinflamação (DHANDA *et al.*, 2018; GALLAND *et al.*, 2017). No entanto, em condições de isquemia e hipoglicemia, alguns autores relataram aumento da expressão de NGF (LINDVALL *et al.*, 1994; SOFRONIEW; HOWE; MOBLEY, 2001; BARRY *et al.*, 2011). Atualmente, são escassos os estudos sobre NGF no contexto da EH. Nosso estudo é pioneiro nesse sentido e análises posteriores serão necessárias para a elucidação da participação dessa neurotrofina na EH.

Por outro lado, não observamos modificações nas concentrações de GDNF e BDNF no córtex e hipocampo em nenhum dos grupos experimentais. Taba e colaboradores (2016) mostraram que a administração de GDNF estimulou a lipólise em animais acometidos por esteatose hepática. Além disso, sabe-se que assim como os demais fatores neurotróficos, o GDNF exerce papel neuroprotetor e reduz a neuroinflamação (SUN *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2012).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Nossos dados apontam para a possível participação dos componentes do SRA na fisiopatologia da EH induzida por tioacetamida. A redução encontrada nas concentrações de Ang-(1-7) pode ter contribuído para os efeitos deletérios associados ao aumento dos mediadores inflamatórios e menor ação neuroprotetora de NGF na encefalopatia hepática.



Sugere-se investigação mais detalhada dos possíveis mecanismos envolvidos durante o curso da doença, possibilitando perspectivas para pesquisas futuras com tratamento da encefalopatia hepática.

Infelizmente, devido ao cenário de pandemia estabelecido nos anos de 2020 e 2021, parte de nossa proposta inicial não foi realizada, visto que as atividades laboratoriais foram suspensas em caráter emergencial e sem data fixa para retorno.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS R. D., AND J. M. FOLEY. 1949b. **Neurological changes in more common types of severe liver disease.** *Transactions of the American Neurological Association* 74:217–19.

AGGARWAL BB. **Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword.** *Nat Rev Immunol.* 2003 Sep;3(9):745-56. doi: 10.1038/nri1184. PMID: 12949498.

AHBOUCHA S, BUTTERWORTH RF. **The neurosteroid system: implication in the pathophysiology of hepatic encephalopathy.** *Neurochem Int.* 2008; 52(4-5):575-87.

AIRAKSINEN, M. S., SAARMA, M., **The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value.** *Nat. Rev. Neurosci.*, 3, (2002), 383– 394.

AKIRA S, TAGA T, KISHIMOTO T. **Interleukin-6 in biology and medicine.** *Adv Immunol.* 1993;54:1-78. doi: 10.1016/s0065-2776(08)60532-5. PMID: 8379461.

ALDRIDGE, D. R., TRANAH, E. J., SHAWCROSS, D. L. **Pathogenesis of hepatic encephalopathy: role of ammonia and systemic inflammation;** *J. Clin.Exp. Hepatol.*, 5 (Suppl. 1) (2015), pp. S7-S20.

ALMEIDA-SANTOS AF, KANGUSSU LM, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ. **The Renin-Angiotensin System and the Neurodegenerative Diseases: A Brief Review.** *Protein Pept Lett.* 2017 Nov 17;24(9):841-853. doi: 10.2174/0929866524666170822120258. PMID: 28828974.

ALOE, L.; SIMONE, M. D.; PROPERZI, F. **Nerve growth factor: a neurotrophin with activity on cells of the immune system.** *Microscopy Research and Technique*, v. 45, n. 4–5, p. 285–291, 1999.

ALOE L, ROCCO ML, BALZAMINO BO, MICERA A. **Nerve Growth Factor: A Focus on Neuroscience and Therapy.** *Curr Neuropharmacol.* 2015;13(3):294-303. doi: 10.2174/1570159x13666150403231920. PMID: 26411962; PMCID: PMC4812798.

AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES; EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. **Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 practice guideline by the European Association for the Study of the Liver and the American Association for the Study of Liver Diseases.** *J Hepatol.* 2014 Sep;61(3):642-59. doi: 10.1016/j.jhep.2014.05.042. Epub 2014 Jul 8. Erratum in: *J Hepatol.* 2015 Oct;63(4):1055. PMID: 25015420.

AMODIO P, DEL PICCOLO F, PETTENÒ E, MAPELLI D, ANGELI P, IEMMOLO R, MURACA M, MUSTO C, GERUNDA G, RIZZO C, MERKEL C, GATTA A. **Prevalence and prognostic value of quantified electroencephalogram (EEG) alterations in cirrhotic patients.** *J Hepatol.* 2001 Jul;35(1):37-45. doi: 10.1016/s0168-8278(01)00129-5. PMID: 11495040.

AMODIO, P., MONTAGNESE, S., GATTA, A., MORGAN, Y. M. **Characteristics of Minimal Hepatic Encephalopathy.** *Metab Brain Dis* **19**, 253–267 (2004).

AMODIO, P. **Current Diagnosis and Classification of Hepatic Encephalopathy. the Liver.** Elsevier B.V. Journal of Clinical and Experimental Hepatology; December 2018; Vol. 8; No. 4; 432–437.

ASRANI SK, DEVARBHAVI H, EATON J, KAMATH PS. **Burden of liver diseases in the world.** *J Hepatol.* 2019 Jan;70(1):151-171. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30266282.

AVRAHAM Y, ISRAELI E, GABBAY E, OKUN A, ZOLOTAREV O, SILBERMAN I, GANZBURG V, DAGON Y, MAGEN I, VOROBIA L, PAPPO O, MECHOULAM R, ILAN Y, BERRY EM. **Endocannabinoids affect neurological and cognitive function in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in mice.** *Neurobiol Dis.* 2006 Jan;21(1):237-45. Epub 2005 Aug 15.

AVRAHAM Y, GRIGORIADIS N, POUTAHIDIS T, VOROBIEV L, MAGEN I, ILAN Y, MECHOULAM R, BERRY E. **Cannabidiol improves brain and liver function in a fulminant hepatic failure-induced model of hepatic encephalopathy in mice.** *Br J Pharmacol.* 2011 Apr;162(7):1650-8.

AZHARI, H., SWAIN, M. G. **Role of Peripheral Inflammation in Hepatic.** Journal of Clinical and Experimental Hepatology; September 2018; Vol. 8; No. 3; 281–285.

BABIOR BM. **NADPH oxidase.** *Curr Opin Immunol.* 2004 Feb;16(1):42-7. doi: 10.1016/j.coi.2003.12.001. PMID: 14734109.

BAI Y, WANG Y, YANG Y. **Hepatic encephalopathy changes mitochondrial dynamics and autophagy in the substantia nigra.** *Metab Brain Dis.* 2018 Oct;33(5):1669-1678. doi: 10.1007/s11011-018-0275-6. Epub 2018 Jul 11. PMID: 29998403.

BARBOSA I G. 2012. **Avaliação de fatores neurotróficos e marcadores imunológicos em indivíduos com transtorno bipolar.** Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais.

BARDE, Y. A.; EDGAR, D.; THOENEN, H. **Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain.** *The EMBO journal*, v. 1, n. 5, p. 549–53, 1982.

BARROSO, LC., SILVEIRA, KD., LIMA, CX., BORGES, V., BADER, M., RACHID, M., SANTOS, R.A. S. SOUZA, DG., SIMÕES E SILVA, AC., TEIXEIRA, MM. **Renoprotective Effects of AVE0991, a NonpeptideMas Receptor Agonist, in Experimental Acute Renal Injury.** *International Journal of Hypertension* Volume 2012, Article ID 808726, 8.

BATALLER, R., & BRENNER, D. A. (2005). **Liver fibrosis.** *The Journal of clinical investigation*, 115(2), 209-218.

BATALLER R, BRENNER DA. **Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis.** *Semin. Liver Dis.* 2001; 21: 437–51.

BARKER EA, SMUCKLER EA. **Nonhepatic thioacetamide injury. I. Thymic cortical necrosis.** *Am J Pathol.* 1973 Jun;71(3):409-18. PMID: 4541442; PMCID: PMC1903935.

BAUER M, HAMM AC, BONAUS M, JACOB A, JAEKEL J, SCHORLE H, PANKRATZ MJ, KATZENBERGER JD. **Starvation response in mouse liver shows strong correlation with life-span-prolonging processes.** *Physiol Genomics*. 2004 Apr 13;17(2):230-44. doi: 10.1152/physiolgenomics.00203.2003. PMID: 14762175.

BEGNI, V.; RIVA, M. A.; CATTANEO, A. **Cellular and molecular mechanisms of the brain-derived neurotrophic factor in physiological and pathological conditions.** *Clinical Science*, v. 131, n. 2, p. 123–138, 2016.

BÉLANGER M, CÔTÉ J, BUTTERWORTH RF. **Neurobiological characterization of an azoxymethane mouse model of acute liver failure.** *Neurochem Int* 2006;48:434-440.

BERNAL W, AUZINGER G, DHAWAN A, WENDON J. **Acute liver failure.** *Lancet*. 2010 Jul 17;376(9736):190-201. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60274-7.

BERNAL, W. AND WENDON, J., **Acute Liver Failure.** The new England Journal of Medicine, 369 (26) (2013), páginas 2525 – 2534.

BÉMEUR C, QU H, DESJARDINS P, BUTTERWORTH RF. **IL-1 or TNF receptor gene deletion delays onset of encephalopathy and attenuates brain edema in experimental acute liver failure.** *Neurochem Int*. 2010c Jan;56(2):213-5.

BEUTLER B, MILSARK IW, CERAMI AC. **Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin.** *Science*. 1985 Aug 30;229(4716):869-71. doi: 10.1126/science.3895437. PMID: 3895437.

BLEI, A. T., OLAFSSON, S., THERRIEN, G., BUTTERWORTH, R. F.. **Ammonia-induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis.** *Hepatology*, 19(6), 1994. 1437-1444.

BOEHM, U., KLAMP, T., GROOT, M., HOWARD, JC. **Cellular responses to interferon-gamma.** *Annu Rev Immunol*.1997;15:749-95. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.749. PMID: 9143706.

BORRAJO A, RODRIGUEZ-PEREZ AI, DIAZ-RUIZ C, GUERRA MJ, LABANDEIRA-GARCIA JL. **Microglial TNF- α mediates enhancement of dopaminergic degeneration by brain angiotensin.** *Glia*. 2014 Jan;62(1):145-57. doi: 10.1002/glia.22595. PMID: 24272709.

BOSOI, C. R. & ROSE, C. F. **Oxidative stress: a systemic factor implicated in the pathogenesis of hepatic encephalopathy.** *Metab Brain Dis* (2013) 28:175–178.

BOYD, J. G.; GORDON, T. **Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury.** *Molecular neurobiology*, v. 27, n. 3, p. 277–324, 2003.

BRAINE ME, COOK N. **The Glasgow Coma Scale and evidence-informed practice: a critical review of where we are and where we need to be.** *J Clin Nurs*. 2017 Jan;26(1-2):280-293. doi: 10.1111/jocn.13390. PMID: 27218835.

BRENNER, D., BLASER, H. T.W. **MakRegulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die.** *Nat. Rev. Immunol.*, 15 (2015), pp. 362-374.

BRUSILOW, S. W., KOEHLER, R. C., TRAYSTMAN, R. J., COOPER, A. J. **Astrocyte glutamine synthetase: importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy;** *Neurotherapeutics*, 7 (4) (2010), pp. 452-470.

BRÜCK J, GÖRG B, BIDMON HJ, ZEMTSOVA I, QVARTSKHAVA N, KEITEL V, KIRCHEIS G, HÄUSSINGER D. **Locomotor impairment and cerebrocortical oxidative stress in portal vein ligated rats in vivo.** *J Hepatol.* 2011 Feb;54(2):251-7.

BURWELL RD, SADDORIS MP, BUCCI DJ, WIIG KA. **Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning.** *J Neurosci.* 2004 Apr 14;24(15):3826-36.

BUTTERWORTH R. F. **Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis: Pathology and Pathophysiology.** *Drugs*, 2019, 79(Suppl 1), 17–21.

BUTTERWORTH, R.F., NOREMBERG, M.D., FELIPO, V., FERENCI, P., ALBRECHT, J., BLEI, A. T. **Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines.** *Liver International*; 2009; ISSN 1478-3223.

BUTTERWORTH R. **Neuronal cell death in hepatic encephalopathy.** *Metab Brain Dis.* 2007 Dec;22(3-4):309-20. doi: 10.1007/s11011-007-9072-3. PMID: 17851742.

BUTTERWORTH R. F. **Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia.** *Metab Brain Dis.* 2002 Dec;17(4):221-7.

BUTTERWORTH R. F, GIGUÈRE JF, MICHAUD J, LAVOIE J, LAYRARGUES GP. **Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy.** *Neurochem Pathol.* 1987 Feb-Apr;6(1-2):1-12. doi: 10.1007/BF02833598. PMID: 3306479.

CABAL-HIERRO L, LAZO PS. **Signal transduction by tumor necrosis factor receptors.** *Cell Signal.* 2012 Jun;24(6):1297-305. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.02.006. Epub 2012 Feb 20. PMID: 22374304.

CABRERA-PASTOR, A ARENAS, Y.M., TAORO-GONZALEZ, L., MONTOLIU, C., FELIPO, V. **Chronic hyperammonemia alters extracellular glutamate, glutamine and GABA and membrane expression of their transporters in rat cerebellum. Modulation by extracellular Cgmp.** *Elsevier. Neuropharmacology.* October 2018. doi.org/10.1016/j.neuropharm.

CABRERA-PASTOR A, LLANSOLA M, MONTOLIU C, MALAGUARNERA M, BALZANO T, TAORO-GONZALEZ L, GARCÍA-GARCÍA R, MANGAS-LOSADA A, IZQUIERDO-ALTAREJOS P, ARENAS YM, LEONE P, FELIPO V. **Peripheral inflammation induces neuroinflammation that alters neurotransmission and cognitive and motor function in hepatic encephalopathy: Underlying mechanisms and therapeutic implications.** *Acta Physiol (Oxf).* 2019 Jun;226(2):e13270. doi: 10.1111/apha.13270. Epub 2019 Mar 22. PMID: 30830722.

CAPURON, L. MILLER, A. H. **Immune System to Brain Signaling: Neuropsychopharmacological Implications.** *Pharmacol Ther.* 2011 May ; 130(2): 226–238.

CAREY R. M., SIRAGY H. M. **Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation.** *Endocr Rev.* 2003 Jun;24(3):261-71.

CARSWELL EA, OLD LJ, KASSEL RL, GREEN S, FIORE N, WILLIAMSON B. **An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975 Sep;72(9):3666-70. doi: 10.1073/pnas.72.9.3666. PMID: 1103152; PMCID: PMC433057.

CC FENG, WANG DE PH, Q. DING, M. GUAN, YF ZHANG, HW JIANG, H. WEN, Z. WU. **Oncológica Urológica**, 2011.

CITTOLIN-SANTOS, G. F., GUAZZELLI, P. A., NONOSE, Y., ALMEIDA, R. F., FONTELLA, F. U., PASQUETTI, M. V., FERREIRA-LIMA F. J., LAZZAROTO, G., BERLEZI R. M., OSVALDT, A. B., CALCAGNOTTO, M. E., DE ASSIS, A. M., SOUZA. D. O. **Behavioral, Neurochemical and Brain Oscillation Abnormalities in an Experimental Model of Acute Liver Failure.** *Neuroscience*; NSC 18807 No. of Pages 13; 22 January 2019.

COLTART, I., TRANAH, T.H., SHAWCROSS, D.L. **Inflammation and hepatic encephalopathy.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 536 (2013) 189–196.

COOPER, A. J.; STEPHANI, R. A.; MEISTER, A. **Enzymatic reactions of methionine sulfoximine. Conversion to the corresponding alpha-imino and alpha-keto acids and to alpha-ketobutyrate and methane sulfinimide.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 251, n. 21, p. 6674-6682, 1976.

COSARDERELIOGLU C, NIDADAVOLU LS, GEORGE CJ, OH ES, BENNETT DA, WALSTON JD, ABADIR PM. **Brain Renin-Angiotensin System at the Intersect of Physical and Cognitive Frailty.** *Front Neurosci.* 2020 Sep 30;14:586314. doi: 10.3389/fnins.2020.586314. PMID: 33117127; PMCID: PMC7561440.

CHAPPELL M.C, MODRALL J. G, DIZ D.I, FERRARIO C.M. **Novel aspects of the renal renin-angiotensin system: angiotensin-(1-7), ACE2 and blood pressure regulation.** *Contrib Nephrol.* 2004;143:77-89.

CHARMAINE A. STEWART, JANE CERHAN. **Hepatic encephalopathy: A dynamic or static condition.** *Psychiatry and Psychology.* 2005.

CHASTRE, A., BE'LANGER, M., BEAUCHESNE, E., NGUYEN, B. N. N, DESJARDINS, P., BUTTERWORTH, R. F., **Inflammatory Cascades Driven by Tumor Necrosis Factor Alpha Play a Major Role in the Progression of Acute Liver Failure and Its Neurological Complications.** *PLOS ONE*; November 2012; Volume 7; Issue 11; e49670.

CHEN, Z. Y., CHAI, YF., CAO, L., HUANG, AJ., CUI,R.Y., LU, C.L., HE, C. **Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes survival and induces differentiation through the phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathway respectively in pc12 cells.** 2014. *Neuroscience* Vol. 104, No. 2, pp. 593±598, 2.

CHURCHYARD, A.; DONNAN, G.A.; HUGHES, A.; HOWELLS, D.W.; WOODHOUSE, D.; WONG, J.Y.; KALNINS, R.M.; MENDELSON, F.A.; PAXINOS, G. Dopa resistance in multiple-system atrophy: Loss of postsynaptic D2 receptors. *Ann. Neurol.*, **1993**, *34*(2), 219-226.

CRACKOWER MA, SARA O R, OUDIT GY, YAGIL C, KOZIERADZKI I, SCANGA SE, OLIVEIRA-DOS-SANTOS AJ, DA COSTA J, ZHANG L, PEI Y, SCHOLEY J, FERRARIO CM, MANOUKIAN AS, CHAPPELL MC, BACKX PH, YAGIL Y, PENNINGER JM. **Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function.** *Nature*. 2002 Jun 20;417(6891):822-8. doi: 10.1038/nature00786. PMID: 12075344.

CROFT, M.: **The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases.** *Nature Rev. Immunol.* 2009; 9: 271-285.

DANTZER, R., O'CONNOR, J.C., FREUND, G.G, JOHNSON, R.W., KELLEY, K.W. **From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain.** *Nat Rev Neurosci.* 2008 January; 9(1): 46–56. doi:10.1038/nrn2297.

DANBOLT, N. C., **Glutamate uptake.** *Progress in Neurobiology* 65 (2001) 1–105.

DÁVALOS, M. M, BUSTIOS, S. C. **The burden of hepatic encephalopathy in Latin America.** *Ann Hepatol.* 2011 Jun;10 Suppl 2:S31-5.

DELAY JM, DE JONG A, PAUGAM-BURTZ C, WEISS E. **Acute liver failure: Running fast between the traps.** *Anaesth Crit Care Pain Med.* 2019 Feb;38(1):9-10. doi: 10.1016/j.accpm.2018.12.012. Epub 2019 Jan 8. PMID: 30635100.

DENNIS, C.V., SHEAHAN, P.J., GRAEBER, M.B. *ET AL.* **Microglial proliferation in the brain of chronic alcoholics with hepatic encephalopathy.** *Metab Brain Dis* **29**, 2014. 1027–1039.

DETRY, O. GASPAR, Y., CHERAMY-BIEN, J. P., DRION, P., MEURISSE, M., DEFRAIGNE, J.O. **Modified surgical model of fulminant hepatic failure in the rat.** *Journal of surgical research*, 181, 2013, 85e90.

DEVIERE J, CONTENT J, DENYS C, ET AL. **High interleukin-6 serum levels and increased production by leucocytes in alcoholic liver cirrhosis. Correlation with IgA serum levels and lymphokines production.** *Clin Exp Immunol.* 1989;77(2):221-225.

DHANDA, S., GUPTA, S., HALDER, A., SUNKARIA, A., SANDHIR, R. **Systemic inflammation without gliosis mediates cognitive deficits through impaired BDNF expression in bile duct ligation model of hepatic encephalopathy.** *Brain, Behavior, and Immunity*; S0889-1591(18)30046-1.

DHAREL, N., BAJAJ, J. S., **Definition and Nomenclature of Hepatic Encephalopathy.** *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 2015;| Vol. 5; No. S1; S37–S41.

D'MELLO C, SWAIN MG. **Immune-to-brain communication pathways in inflammation-associated sickness and depression.** *Curr Top Behav Neurosci.* 2017;31:73–94. 7.

DIRCHWOLF M, RUF AE. **Role of systemic inflammation in cirrhosis: From pathogenesis to prognosis.** *World J Hepatol.* 2015 Aug 8;7(16):1974-81. doi: 10.4254/wjh.v7.i16.1974. PMID: 26261687; PMCID: PMC4528271.

DÍAZ-GÓMEZ D, JOVER M, DEL-CAMPO JA, GALINDO A, ROMERO-GÓMEZ M. **Experimental models for hepatic encephalopathy.** *Rev Esp Enferm Dig.* 2011 Oct;103(10):536-41. English, Spanish. doi: 10.4321/s1130-01082011001000006. PMID: 22054269.

D'MELLO, C., SWAIN, M.G. **Liver-brain interactions in inflammatory liver diseases: Implications for fatigue and mood disorders.** *Brain, Behavior, and Immunity* 35 (2014) 9–20.

DONG, Y., FISCHERB, R., NAUDÉA, P. J.W., MAIER, O., NYAKASA, C., DUFFEY, M., VAN DER ZEEA, E. A., DEKENSE, D., DOUWENGAA, W., HERRMANNE, A., GUENZIE, E., KONTERMANNB, R. E., PFIZENMAIERB, K., EISEL, U. L. M. **Essential protective role of tumor necrosis factor receptor 2 in neurodegeneration.** *PNAS.* vol. 113 | no. 43. 2016.

DONOGHUE M, HSIEH F, BARONAS E, GODBOUT K, GOSSELIN M, STAGLIANO N, DONOVAN M, WOOLF B, ROBISON K, JEYASEELAN R, BREITBART RE, ACTON S. **A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9.** *Circ Res.* 2000 Sep 1;87(5):E1-9.

DOS SANTOS MELLO, M., SCHMITT, M. R., WAYHS, C. A. Y., HAMMERSCHMIDT, T., GUERREIRO, G. B. B FAVENZANI, J. L., SITTA, A., COELHO, D. M., WAJNER, M., VARGAS, C. **Increased oxidative stress in patients with 3-hydroxy-3- methylglutaric aciduria.** *Mol Cell Biochem* (2015) 402:149–155.

EL-MARASY SA, EL AWDAN SA, ABD-ELSALAM RM. **Protective role of chrysin on thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in rats.** *Chem Biol Interact.* 2019 Feb 1;299:111-119.

EUSTON DR, GRUBER AJ, MCNAUGHTON BL. **The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making.** *Neuron.* 2012 Dec 20;76(6):1057-70. doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.002. PMID: 23259943; PMCID: PMC3562704.

EL-EMSHATY HM, NASIF WA, MOHAMED IE. **Serum Cytokine of IL-10 and IL-12 in Chronic Liver Disease: The Immune and Inflammatory Response.** *Dis Markers.* 2015;2015:707254.

ETEMADI, N., HOLIEN, J. K., CHAU, D., DEWSON, G., MURPHY, J. M., ALEXANDER, W. S., PARKER, M. W., SILKE, J., NACHBUR, U. **Lymphotoxin α induces apoptosis, necroptosis and inflammatory signals with the same potency as tumour necrosis factor.** *FEBS J.*, 280 (2013), pp. 5283-5297.

FALEIROS, B. E.; MIRANDA, A. S.; CAMPOS, A. C.; GOMIDES, L. F.; KANGUSSU, L. M.; GUATIMOSIM, C.; CAMARGOS, E. R. S.; MENEZES, G. B.; RACHID, M. A.; TEIXEIRA, A. L. **Up-regulation of brain cytokines and chemokines mediates**

neurotoxicity in early acute liver failure by a mechanism independent of microglial activation. *Brain research*, I 578, 2014, 49-59.

FARAG, E., SESSLER, D. I., EBRAHIM, Z., KURZ, A., MORGAN, J., AHUJA, S., MAHESHWARI, K., DOYLE, J. **The renin angiotensin system and the brain: New developments.** *Journal of Clinical Neuroscience* 46 (2017) 1–8.

FELIPO V. **Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function.** *Nat Rev Neurosci.* 2013 Dec;14(12):851-8. doi: 10.1038/nrn3587. Epub 2013 Oct 23. PMID: 24149188.

FELIPO V, BUTTERWORTH RF. **Neurobiology of ammonia.** *Prog Neurobiol.* 2002 Jul;67(4):259-79.

FERENCI, P., ZOLLNER, G., TRAUNER, M. **Hepatic transport systems.** *J Gastroenterol Hepatol.* 2002 Feb;17 Suppl:S105-12.

FERENCI, P., LOCKWOOD, A., MULLEN, K., TARTER, R., WEISSENBORN, K., BLEI, A. T., AND THE MEMBERS OF THE WORKING PARTY. **Hepatic Encephalopathy—Definition, Nomenclature, Diagnosis, and Quantification: Final Report of the Working Party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998.** *Hepatology*, vol. 35, no. 3, 2002.

FONTANA L, MOREIRA E, TORRES MI, FERNÁNDEZ MI, RÍOS A, SÁNCHEZ DE MEDINA F, GIL A. **Serum amino acid changes in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis.** *Toxicology.* 1996 Jan 8;106(1-3):197-206.

FOUDA AY, ALHUSBAN A, ISHRAT T, PILLAI B, ELDAHSHAN W, WALLER JL, ERGUL A, FAGAN SC. **Brain-Derived Neurotrophic Factor Knockdown Blocks the Angiogenic and Protective Effects of Angiotensin Modulation After Experimental Stroke.** *Mol Neurobiol.* 2017 Jan;54(1):661-670. doi: 10.1007/s12035-015-9675-3. Epub 2016 Jan 12. PMID: 26758277; PMCID: PMC4940333.

FERRAGUTI, F., SHIGEMOTO, R., **Metabotropic glutamate receptors.** *Cell Tissue Res* (2006) 326:483–504.

FRANK-CANNON, T.C., ALTO, L. T., MCALPINE, F. E., TANSEY, M. G. **Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases?** *Molecular Neurodegeneration* 2009, 4:47.

FREDERICK, R.T., 2011. **Current concepts in the pathophysiology and management of hepatic encephalopathy.** *Gastroenterol. Hepatol.* (n y) 7, 222–233.

FUNAKOSHI H, FRISÉN J, BARBANY G, TIMMUSK T, ZACHRISSON O, VERGE VM, PERSSON H. **Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve.** *J Cell Biol.* 1993 Oct;123(2):455-65. doi: 10.1083/jcb.123.2.455. PMID: 8408225; PMCID: PMC2119843.

GALLAND F, NEGRI E, DA RÉ C, FRÓES F, STRAPAZZON L, GUERRA MC, TORTORELLI LS, GONÇALVES CA, LEITE MC. **Hyperammonemia compromises**

glutamate metabolism and reduces BDNF in the rat hippocampus. *Neurotoxicology*. 2017 Sep;62:46-55.

GANS H, MORI K, LINDSEY E, KASTER, B., RICHTER, D., QUINLAN, R., DINEEN, P.A., TAN, B.H. **Septicemia as a manifestation of acute liver failure.** *Surg Gynecol Obstet*. 1971;132:783–790.

GARCÍA-GARCÍA R, CRUZ-GÓMEZ AJ, URIOS A, MANGAS-LOSADA A, FORN C, ESCUDERO-GARCÍA D, KOSENKO E, TORREGROSA I, TOSCA J, GINER-DURÁN R, SERRA MA, AVILA C, BELLOCH V, FELIPO V, MONTOLIU C. **Learning and Memory Impairments in Patients with Minimal Hepatic Encephalopathy are Associated with Structural and Functional Connectivity Alterations in Hippocampus.** *Sci Rep*. 2018 Jun 25;8(1):9664.

GARRIDO-GIL P, RODRIGUEZ-PALLARES J, DOMINGUEZ-MEIJIDE A, GUERRA MJ, LABANDEIRA-GARCIA JL. **Brain angiotensin regulates iron homeostasis in dopaminergic neurons and microglial cells.** *Exp Neurol*. 2013 Dec;250:384-96. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.10.013. Epub 2013 Oct 30. PMID: 24184051.

GD. WIENS, G.W. GLENNEY. **Developmental and comparative immunology**, 35 (12), 2011, pp. 1324-1335.

GEGELASHVILI, G., SCHOUSBOE, A., **Cellular Distribution and Kinetic Properties of High-Affinity Glutamate Transporters.** *Brain Research Bulletin*, Vol. 45, No. 3, pp. 233–238, 1998.

GERMANI G, TSOCHATZIS E, PAPASTERGIOU V, BURROUGHS AK. **HCV in liver transplantation.** *Semin Immunopathol*. 2013 Jan;35(1):101-10. doi: 10.1007/s00281-012-0329-5. Epub 2012 Jul 25. PMID: 22829333.

GREK, A., ARASI, L. **Acute Liver Failure.** *AACN Advanced Critical Care* Volume 27, Number 4, 2016; pp. 420-429.

GÖRG B, BIDMON HJ, KEITEL V, FOSTER N, GOERLICH R, SCHLISS F, HÄUSSINGER D. **Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes.** *Arch Biochem Biophys*. 2006 May 15;449(1-2):104-14. doi: 10.1016/j.abb.2006.02.012. Epub 2006 Mar 9. PMID: 16579953.

GÖRG, B., KARABABA, A., SHAFIGULLINA, A., BIDMON, H. J., HÄUSSINGER, D. **Ammonia-induced senescence in cultured rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy;** *Glia*, 63 (1) (2015), pp. 37-50.

GÖRG B, KARABABA A, HÄUSSINGER D. **Hepatic Encephalopathy and Astrocyte Senescence.** *J Clin Exp Hepatol*. 2018 Sep;8(3):294-300.

GREENBERG ME, XU B, LU B, HEMPSTEAD BL. **New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function.** *J Neurosci*. 2009 Oct 14;29(41):12764-7.

GRELL M, WAJANT H, ZIMMERMANN G, SCHEURICH P. **The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jan 20;95(2):570-5. doi: 10.1073/pnas.95.2.570. PMID: 9435233; PMCID: PMC18461.

GREWER C, RAUEN T. **Electrogenic Glutamate Transporters in the CNS: Molecular Mechanism, Pre-steady-state Kinetics, and their Impact on Synaptic Signaling.** *J Membr Biol.* 2005; 203(1):1-20.

GROLLMAN EF, LEE G, RAMOS S, LAZO PS, KABACK HR, FRIEDMAN RM, KOHN LD. **Relationships of the structure and function of the interferon receptor to hormone receptors and establishment of the antiviral state.** *Cancer Res.* 1978 Nov;38(11 Pt 2):4172-85.

GUTTERIDGE, C. J. M., AND HALLIWELL, B. **Comments on review of free radicals in biology and medicine, second edition.** *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 12, pp. 93-95, 1992.

HADJIHAMBİ A, ARIAS N, SHEIKH M, ET AL. **Hepatic encephalopathy: a critical current review.** *Hepatol Int.* 2018;12:135–147. 2.

HAIPOUR S, FARBOOD Y, DIANAT M, RASHNO M, KHORSANDI LS, SARKAKI A. **Thymoquinone improves behavioral and biochemical deficits in hepatic encephalopathy induced by thioacetamide in rats.** *Neurosci Lett.* 2021 Feb 6;745:135617. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135617. Epub 2021 Jan 6. PMID: 33421492.

HALLBÖÖK, F. **Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families.** *Current Opinion in Neurobiology*, v. 9, n. 5, p. 616–621, 1999.

HARIHARAN, A.; SHETTY, S.; SHIROLE, T.; JAGTAP, A.G. **Potential of protease inhibitor in 3-nitropropionic acid induced Huntington's disease like symptoms: Mitochondrial dysfunction and neurodegeneration.** *Neurotoxicology*, 2014, 45139-45148.

HASSAN AZHARI, MARK G. SWAIN. **Role of Peripheral Inflammation in Hepatic Encephalopathy** *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* | September 2018 | Vol. 8 | No. 3 | 281–285.

HARRISON, J. K., IANG, Y., CHEN, S., XIA, Y., MACIEJEWSKI, D., MCNAMARA, R. K., STREIT, W. J., SALAFRANCA, M. N., ADHIKARI, DARREN, S., THOMPSON, A., BOTTI, P., BACON, K. B., FENG, L. **Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; Vol. 95, pp. 10896–10901, September 1998.

HÄUSSINGER D, GÖRG B. **Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010 Jan;13(1):87-92.

HEIDARI R, JAMSHIDZADEH A, NIKNAHAD H, ET AL. **Effect of taurine on chronic and acute liver injury: Focus on blood and brain ammonia.** *Toxicol Report.* 2016;3:870–879.

HANSEN, S.H ANDERSEN, M. L., CORNETT, C., GRADINARU, R., GRUNNET, N., **A role for taurine in mitochondrial function.** *Journal of Biomedical Science* 2010, 17(Suppl 1):S23.

HELLNER, K., WALTHER, T., SCHUBERT, M., ALBRECHT, D. **Angiotensin-(1–7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas.** *Mol. Cell. Neurosci.* 29 (2005) 427 – 435.

HEMPSTEAD, B. L. **The many faces of p75NTR.** *Current Opinion in Neurobiology*, v. 12, n. 3, p. 260–267, 2002

HERNÁNDEZ-RABAZA, V. A., CABRERA-PASTOR, L., TAORO-GONZÁLEZ, M., MALAGUARNERA, A., AGUSTÍ, M. LLANSOLA, V. FELIPO. **Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by sulforaphane;** *J. Neuroinflamm.*, 13 (2016), p. 41.

HIBA, O. E., ELGOT, A., AHBOUCHA, S., GAMRANI, H. **Differential regional responsiveness of astroglia in mild hepatic encephalopathy: an immunohistochemical approach in bile duct ligated rat;** *Acta Histochem.*, 118 (4) (2016), pp. 338-346.

HIRANO T, AKIRA S, TAGA T, KISHIMOTO T. **Biological and clinical aspects of interleukin 6.** *Immunol Today.* 1990 Dec;11(12):443-9. doi: 10.1016/0167-5699(90)90173-7. PMID: 2127356.

HORITA Y, HONMOU O, HARADA K, HOUKIN K, HAMADA H, KOCSIS JD. **Intravenous administration of glial cell line-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat.** *J Neurosci Res.* 2006 Nov 15;84(7):1495-504.

HSU SJ, ZHANG C, JEONG J, LEE SI, MCCONNELL M, UTSUMI T, IWAKIRI Y. **Enhanced Meningeal Lymphatic Drainage Ameliorates Neuroinflammation and Hepatic Encephalopathy in Cirrhotic Rats.** *Gastroenterology.* 2021 Mar;160(4):1315-1329.e13. doi: 10.1053/j.gastro.2020.11.036. Epub 2020 Nov 20. PMID: 33227282; PMCID: PMC7956141.
HUANG CH, LIU PZ. **New insights into the Rh superfamily of genes and proteins in erythroid cells and nonerythroid tissues.** *Blood Cells Mol Dis.* 2001 Jan-Feb;27(1):90-101. doi: 10.1006/bcmd.2000.0355. PMID: 11358367.

JAYAKUMAR, A. R., NORENBURG, M. D., **Hyperammonemia in Hepatic Encephalopathy.** *Journal of Clinical and Experimental Hepatology;* September 2018; Vol. 8; No. 3; 272–280.

IBANEZ, CF, AND ANDRESSOO, JO. **Biology of GDNF and its receptors —Relevance for disorders of the central nervous system.** *Neurobiol. Dis.*, Doi: 101016 / j.nbd.2016.01.021.

IGARASHI, Y., CHIBA, H., UTSUMI, H., MIYAJIMA, H., ISHIZAKI, T., GOTOH, T., KUWAHARA, K., TOBIOKA, H., SATOH, M., MORI, H AND SAWADA, N. **Expression of Receptors for Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor (GDNF) and Neurturin in the Inner Blood-retinal Barrier of Rats Cell Struct.** *Func.* 25237-241.

INOUE T, ISHIZAKA Y, SASAKI E, LU J, MINESHIGE T, YANASE M, SASAKI E, SHIMODA M. **Thioacetamide-induced hepatic fibrosis in the common marmoset.** *Exp Anim.* 2018 Jul 30;67(3):321-327. doi: 10.1538/expanim.17-0156. Epub 2018 Mar 22. PMID: 29467352; PMCID: PMC6083030.

ISHIZAKA N, MITANI H, NAGAI R. **Angiotensin II regulates klotho gene expression.** *Nihon Rinsho.* 2002 Oct;60(10):1935-9. Japanese. PMID: 12397687.

ISHRAT T, PILLAI B, SOLIMAN S, FOUADA AY, KOZAK A, JOHNSON MH, ERGUL A, FAGAN SC. **Low-dose candesartan enhances molecular mediators of neuroplasticity and subsequent functional recovery after ischemic stroke in rats.** *Mol Neurobiol.* 2015;51(3):1542-53. doi: 10.1007/s12035-014-8830-6. Epub 2014 Aug 2. PMID: 25084762; PMCID: PMC4677667.

JANSSEN, A. B., VUGTS, D. J., FUNKE, U., MOLENAAR, B. G. T., PERRY, S.K., BART, N.M., VAN BERCKEL, ADRIAAN, L., ALBERT, D. W. **Imaging of neuroinflammation in Alzheimer's disease, multiple sclerosis and stroke: Recent developments in positron emission tomography.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1862 (2016) 425–44.

JAYAKUMAR AR, NOREMBERG MD. **Hyperammonemia in Hepatic Encephalopathy.** *J Clin Exp Hepatol.* 2018 Sep;8(3):272-280. doi: 10.1016/j.jceh.2018.06.007. Epub 2018 Jun 20. PMID: 30302044; PMCID: PMC6175739.

JAYAKUMAR, A R., RAOY, K. V. R., NOREMBERG, M. D. **Neuroinflammation in Hepatic Encephalopathy: Mechanistic Aspects.** *Journal of Clinical and Experimental Hepatology.* March 2015; Vol. 5; No. S1; S21–S28.

JEONG, W. I, PARK, O., GAO, B. **Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis.** *Gastroenterology.* 2008 Jan;134(1):248-58. doi: 10.1053/j.gastro.2007.09.034. Epub 2007 Sep 29. PMID: 18166357; PMCID: PMC2923436.

JEPSEN, P., OTT, ANDERSEN, P. K., SORENSEN, H., T. S., VILSTRUP, H. **Clinical Course of Alcoholic Liver Cirrhosis: A Danish Population-Based Cohort Study.** *HEPATOLOGY,* Vol. 51, No. 5, 2010.

JIANG, T., XUE1, L.J., YANG, Y., WANG, Q.G., XUE, X., OU1, Z., GAO, Q., SHI, J. Q., WU1, L., ZHANG, Y.D. **AVE0991, a nonpeptide analogue of Ang-(1-7), attenuates aging-related neuroinflammation.** *Anging,* 2018 V 10, n^o4.

JIANG T, GAO L, SHI J, LU J, WANG Y, ZHANG Y. **Angiotensin-(1-7) modulates renin-angiotensin system associated with reducing oxidative stress and attenuating neuronal apoptosis in the brain of hypertensive rats.** *Pharmacol Res.* 2013 Jan;67(1):84-93. doi: 10.1016/j.phrs.2012.10.014. Epub 2012 Nov 2. PMID: 23127917.

JIANG W, DESJARDINS P, BUTTERWORTH RF. **Direct evidence for central proinflammatory mechanisms in rats with experimental acute liver failure: protective effect of hypothermia.** *J Cerebr Blood Flow Metabolism* 2009b;29:944-952.

JOGLAR, B., RODRIGUEZ-PALLARES, J., RODRIGUEZ-PEREZ, A. I., REY, P., GUERRA, M.J., LABANDEIRA-GARCIA, J. L. **The inflammatory response in the MTP**

modelo of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: relevance to progression of the disease. International Society for Neurochemistry, *J. Neurochem.* (2009) 109, 656–669.

JONES LL, VIGNALI DA. **Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily.** *Immunol Res.* 2011 Oct;51(1):5-14. doi: 10.1007/s12026-011-8209-y. PMID: 21553332; PMCID: PMC3529148.

JUZA, R. M., PAULI, E. M. **Clinical and surgical anatomy of the liver: A review for clinicians.** *Clinical Anatomy* (2014) Volume 27, Issue 5 p. 764-769

KANEDA M, KASHIWAMURA S, UEDA H, SAWADA K, SUGIHARA A, TERADA N, KIMURA-SHIMMYO A, FUKUDA Y, SHIMOYAMA T, OKAMURA H. **Inflammatory liver steatosis caused by IL-12 and IL-18.** *J Interferon Cytokine Res.* 2003 Mar;23(3):155-62. doi: 10.1089/107999003321532493. PMID: 12716488.

KANGUSSU LM, DE ALMEIDA TCS, PRESTES TRR, DE ANDRADE DE MARIA ML, DA SILVA FILHA R, VIEIRA MAR, SILVA ACSE, FERREIRA AJ. **Beneficial Effects of the Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activator Dize in Renovascular Hypertension.** *Protein Pept Lett.* 2019;26(7):523-531. doi: 10.2174/0929866526666190405123422. PMID: 30950337.

KANNO K, TAZUMA S, CHAYAMA K. **AT1A-deficient mice show less severe progression of liver fibrosis induced by CCI(4).** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 308: 177–83.

KAPLAN, D. R. et al. **The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor.** *Science (New York, N.Y.),* v. 252, n. 5005, p. 554–558, 1991.

KAR, S., GAO, L., BELATTI, D. A., CURRY, P. M., ZUCKER, I. H. **Central Angiotensin (1-7) Enhances Baroreflex Gain in Conscious Rabbits With Heart Failure.** *Hypertension.* 2011;58:627-634.

KELSO A. **Cytokines: principles and prospects.** *Immunol Cell Biol* 1998; 76: 300-17.

KISHIMOTO T. **The biology of interleukin-6.** *Blood.* 1989 Jul;74(1):1-10. PMID: 2473791.

KLEIN, R. et al. **The MB Tyrosine Protein Kinase Is a Receptor for Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3.** v. 66, 1991a.

KLEIN, R. et al. **The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3.** *Cell,* v. 66, n. 2, p. 395–403, 1991.

KOSENKO, E. A., BELOUSHKO, E. E., KAMINSKIĬ, I. G. **Differences between cerebellum and hippocampus in antioxidant system;** *Biomed. Khim.,* 60 (4) (2014), pp. 469-472.

KOSENKO, E. A., TIKHONOVA, L. A., REDDY, V. P., ALIEV, G., KAMINSKY, y. G. **Differential up-regulation of ammonia detoxifying enzymes in cerebral cortex,**

cerebellum, hippocampus, striatum and liver in hyperammonemia. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 13 (6) (2014), pp. 1089-1095.

KRIEGLER, M., PEREZ, C., DEFAY, K., ALBERT, I., LU, S. D. **A Novel Form of TNF/Cachectin Is a Cell Surface Cytotoxic Transmembrane Protein: Ramifications for the Complex Physiology of TNF.** *Cell*. vol. 53 (1), 1988, pp. 45-53.

KRIL JJ, BUTTERWORTH RF. **Diencephalic and cerebellar pathology in alcoholic and nonalcoholic patients with end-stage liver disease.** *Hepatology*. 1997 Oct;26(4):837-41. doi: 10.1002/hep.510260405. PMID: 9328301.

KRUEPUNGA N, HAKVOORT TBM, HIKSPOORS JPJM, KÖHLER SE, LAMERS WH. **Anatomy of rodent and human livers: What are the differences?** *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019 May 1;1865(5):869-878. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.05.019. Epub 2018 May 26. PMID: 29842921.

LABANDEIRA-GARCIA JL, RODRÍGUEZ-PEREZ AI, GARRIDO-GIL P, RODRIGUEZ-PALLARES J, LANCIEGO JL, GUERRA MJ. **Brain Renin-Angiotensin System and Microglial Polarization: Implications for Aging and Neurodegeneration.** *Front Aging Neurosci*. 2017 May 3;9:129. doi: 10.3389/fnagi.2017.00129. PMID: 28515690; PMCID: PMC5413566.

LAI KO, GLASS DJ, GEIS D, YANCOPOULOS GD, IP NY. **Structural determinants of Trk receptor specificities using BDNF-based neurotrophin chimeras.** *J Neurosci Res*. 1996 Dec 1;46(5):618-29. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19961201)46:5<618::AID-JNR10>3.0.CO;2-T. PMID: 8951673.

LANNI C, STANGA S, RACCHI M, GOVONI S. **The expanding universe of neurotrophic factors: therapeutic potential in aging and age-associated disorders.** *Curr Pharm Des*. 2010;16(6):698-717. doi: 10.2174/138161210790883741. PMID: 20388080.

LANZ, T.V.; DING, Z.; HO, P.P.; LUO, J.; AGRAWAL, A.N.; SRINAGESH, H.; AXTELL, R.; ZHANG, H.; PLATTEN, M.; WYSS-CORAY, T.; STEINMAN, L. **Angiotensin II sustains brain inflammation in mice via TGF-beta.** *J. Clin. Invest.*, 2010, 120(8), 2782-2794.

LANZ, B., RACKAYOVA, V., BRAISSANT, O., CUDALBU, C. **MRS studies of neuroenergetics and glutamate/glutamine exchange in rats: Extensions to hyperammonemic models.** *Analytical Biochemistry* 529 (2017) 245,269.

LARRUBIA, J.; BENITO-MARTÍNEZ, S., MIQUEL-PLAZA, J.; SANZ-DEVILLALOBOS, E.; GONZÁLEZ-MATEOS, F.; PARRA, T. **Cytokines – their pathogenic and therapeutic role in chronic viral hepatitis.** *Revista Española de Enfermedades*, v. 101, n.5, p. 343-351, 2009.

LAZENNEC G, RICHMOND A. **Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation.** *Trends Mol Med*. 2010 Mar;16(3):133-44. doi: 10.1016/j.molmed.2010.01.003. Epub 2010 Feb 15. PMID: 20163989; PMCID: PMC2840699.

LEE, W. M. **Acute liver failure.** *Semin Respir Crit Care Med*. 2012 Feb;33(1):36-45.

LEVI-MONTALCINI R, ANGELETTI PU. **Nerve growth factor.** *Physiol Rev.* 1968 Jul;48(3):534-69. doi: 10.1152/physrev.1968.48.3.534. PMID: 4875350.

LEVI-MONTALCINI R. **The nerve growth factor 35 years later.** *Science.* 1987 Sep 4;237(4819):1154-62. doi: 10.1126/science.3306916. PMID: 3306916.

LEWIN GR, BARDE YA. **Physiology of the neurotrophins.** *Annu. Rev. Neurosci.* v. 19; 289–317. 1996.

LICINIO J, WONG ML. **Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system.** *J Clin Invest.* 1997 Dec 15;100(12):2941-7. doi: 10.1172/JCI119846. PMID: 9399938; PMCID: PMC508504.

LIN, W., CHEN, X., GAO, YQ. *et al.* **Hippocampal atrophy and functional connectivity disruption in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy.** *Metab Brain Dis* **34**, 1519–1529 (2019).

LINHER-MELVILLE, K.; LI, J. **The roles of glial cell line-derived neurotrophic factor, 96 brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor during the final stage of folliculogenesis: a focus on oocyte maturation.** *Reproduction (Cambridge, England)*, v. 145, n. 2, p. R43-54, 2013.

LIMA, L., MIRANDA, A. S., FERREIRA, R. N., RACHID, M. A., & SIMÕES E SILVA, A. C. (2019). **Hepatic encephalopathy: Lessons from preclinical studies.** *World journal of hepatology*, *11*(2), 173–185.

LIN L.F, DOHERTY D.H, LILE J.D, BEKTESH S., COLLINS F. **GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons.** *Science.* 1993 May 21;260(5111):1130-2.

LLANSOLA, M. A., MONTOLIU, C. B. , AGUSTI, A. A. , HERNANDEZ-RABAZA, V. A. , CABRERA-PASTOR, A. A. , GOMEZ-GIMENEZ, B. A. , MALAGUARNERA, M. A. , DADSETAN, S. A. , BELGHITI, M. A., GARCIA-GARCIA, R. A., BALZANO, T. A., TAORO, L. A. , FELIPO, V. **Interplay between glutamatergic and GABAergic neurotransmission alterations in cognitive and motor impairment in minimal hepatic encephalopathy.** *Neurochemistry International* **88** (2015) 15–19.

LOCKSLEY RM, KILLEEN N, LENARDO MJ. **The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology.** *Cell.* 2001 Feb 23;104(4):487-501. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00237-9. PMID: 11239407.

LONGO N, FRIGENI M, PASQUALI M. **Carnitine transport and fatty acid oxidation.** *Biochim Biophys Acta.* 2016 Oct;1863(10):2422-35. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.01.023. Epub 2016 Jan 29. PMID: 26828774; PMCID: PMC4967041.

LUBEL JS, HERATH CB, BURRELL LM, ANGUS PW. **Liver disease and the renin-angiotensin system: Recent discoveries and clinical implications.** *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Sep;23(9):1327-38. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05461.x. Epub 2008 Jun 28. PMID: 18557800; PMCID: PMC7166336.

LUEDDE T, KAPLOWITZ N, SCHWABE RF. **Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance.** *Gastroenterology*. 2014 Oct;147(4):765-783.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2014.07.018. Epub 2014 Jul 18. PMID: 25046161; PMCID: PMC4531834.

LUO M, GUO JY, CAO WK. **Inflammation: a novel target of current therapies for hepatic encephalopathy in liver cirrhosis.** *World J Gastroenterol*. 2015;21:11815–11824. 3. LUO M, LI L, YANG EN, DAI CY, LIANG SR, CAO WK. **Correlation between interleukin-6 and ammonia in patients with overt hepatic encephalopathy due to cirrhosis.** *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2013 Sep;37(4):384-90. doi: 10.1016/j.clinre.2012.08.007. Epub 2012 Oct 16. PMID: 23084463.

LUO, D., LUO, Y., HE, Y., ZHANG, H., ZHANG, R., LI, X., DOBRUCKI, W. L., SINUSAS, A. J., SESSA, W. C., MIN, W. **Differential Functions of Tumor Necrosis Factor Receptor 1 and 2 Signaling in Ischemia-Mediated Arteriogenesis and Angiogenesis.** *American Journal of Pathology* 169 (5) (2006) 1886–1898.

MANDREKAR P, AMBADE A, LIM A, SZABO G, CATALANO D. **An essential role for monocyte chemoattractant protein-1 in alcoholic liver injury: regulation of proinflammatory cytokines and hepatic steatosis in mice.** *Hepatology*. 2011 Dec;54(6):2185-97. doi: 10.1002/hep.24599. PMID: 21826694; PMCID: PMC3342822.

MANGAS-LOSADA A, GARCÍA-GARCÍA R, URIOS A, ESCUDERO-GARCÍA D, TOSCA J, GINER-DURÁN R, SERRA MA, MONTOLIU C, FELIPO V. **Minimal hepatic encephalopathy is associated with expansion and activation of CD4+CD28-, Th22 and Tfh and B lymphocytes.** *Sci Rep*. 2017 Jul 27;7(1):6683. doi: 10.1038/s41598-017-05938-1. PMID: 28751644; PMCID: PMC5532287.

MARIAN AJ. **The discovery of the ACE2 gene.** *Circ Res*. 2013 May 10;112(10):1307-9. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301271. PMID: 23661710.

MARKUS, A.; PATEL, T. D.; SNIDER, W. D. **Neurotrophic factors and axonal growth.** *Current Opinion in Neurobiology*, v. 12, n. 5, p. 523–531, 2002.

MARTÍNEZ-ESPARZA M, TRISTÁN-MANZANO M, RUIZ-ALCARAZ AJ, GARCÍA-PEÑARRUBIA P. **Inflammatory status in human hepatic cirrhosis.** *World J Gastroenterol*. 2015 Nov 7;21(41):11522-41. doi: 10.3748/wjg.v21.i41.11522. PMID: 26556984; PMCID: PMC4631958.

MASCOLO A, SESSA M, SCAVONE C, DE ANGELIS A, VITALE C, BERRINO L, ROSSI F, ROSANO G, CAPUANO A. **New and old roles of the peripheral and brain renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS): Focus on cardiovascular and neurological diseases.** *Int J Cardiol*. 2017 Jan 15;227:734-742. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.10.069. Epub 2016 Oct 27. PMID: 27823897.

MATSUO M, MURATA S, HASEGAWA S, HATADA Y, OHTSUKA M, TANIGUCHI H. **Novel liver fibrosis model in *Macaca fascicularis* induced by thioacetamide.** *Sci Rep*. 2020 Feb 12;10(1):2450. doi: 10.1038/s41598-020-58739-4. PMID: 32051422; PMCID: PMC7016167.

MCARDLE P, PENNING DH, DEXTER F, REYNOLDS JD. **Flumazenil does not affect the increase in rat hippocampal extracellular glutamate concentration produced during thioacetamide-induced hepatic encephalopathy.** *Metab Brain Dis* 1996;11:329-342.

MCCLAIN CJ, COHEN DA. **Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis.** *Hepatology*. 1989 Mar;9(3):349-51. doi: 10.1002/hep.1840090302. PMID: 2920991.

McDONALDS, N.Q.; CHAO, M.V. 1995. **Structural determinants of neurotrophin action.** *J.Biol. Chem.*, 270: 19669-19672.

MCMILLIN, M., GRANT1, S., FRAMPTON, G., ANDRY, S., BROWN, A., DEMORROW, S. **Fractalkine suppression during hepatic encephalopathy promotes neuroinflammation in mice.** *Journal of Neuroinflammation* (2016) 13:198.

MCMILLIN, M., FRAMPTON, G., THOMPSON, M., GALINDO, C., STANDEFORD, H., WHITTINGTON, E., ALPINI, G., DEMORROW, S. **Neuronal ccl2 is upregulated during hepatic encephalopathy and contributes to microglia activation and neurological decline.** *Journal of neuroinflammation* 2014, 11:121.

MERHI A, DE MEES C, ABDO R, VICTORIA ALBEROLA J, MARINI AM. **Wnt/ β -Catenin Signaling Regulates the Expression of the Ammonium Permease Gene RHBG in Human Cancer Cells.** *PLoS One*. 2015 Jun 1;10(6):e0128683. doi: 10.1371/journal.pone.0128683. PMID: 26029888; PMCID: PMC4452261.

MELO, AP. S., FRANÇA, E. B., MALTA, D. C., GARCIA, L. P., V, MOONEY, M., NAGHAVI, M. **Mortality due to cirrhosis, liver cancer, and disorders attributed to alcohol use: Global Burden of Disease in Brazil, 1990 and 2015.** *Rev bras epidemiol maio* 2017; 20 SUPPL 1: 61-74.

MÉNDEZ, M., MÉNDEZ-LÓPEZ, M., LOPZ, L., ÁNGELES, M. S., ÁRIAS, J., CIMADEVILLA, J. M., ÁRIAS, J. **Spatial memory alterations in three models of hepatic encephalopathy.** *Behavioural Brain Research*, Volume 188, Issue 1, 17, Pages 32-40, 2008.

MERTENS, B.; VANDERHEYDEN, P.; MICHOTTE, Y.; SARRE, S. **The role of the central renin-angiotensin system in Parkinson's disease.** *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, 2010, 11(1), 49-56.

MICHALAK A, ROSE C, BUTTERWORTH J, BUTTERWORTH RF. **Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure.** *Hepatology*. 1996 Oct;24(4):908-13.

MIRANDA A.S., RODRIGUES DH, VIEIRA LB, LIMA CX, RACHID MA, VIDIGAL PV, GOMEZ MV, REIS HJ, GUATIMOSIM C, TEIXEIRA AL. **A thioacetamide-induced hepatic encephalopathy model in C57BL/6 mice: a behavioral and neurochemical study.** *Arq Neuropsiquiatr*. 2010 Aug;68(4):597-602.

MIRANDA A.S., QUEIROZ-LACERDA, N., VILELA, M. C., RODRIGUES DH, RACHID, M.A., QUEVEDOC, J., TEIXEIRA, A.L. **Anxiety-like behavior and proinflammatory cytokine levels in the brain of C57BL/6 mice infected with Plasmodium berghei (strain ANKA),** *Neuroscience Letters* 491, 2011, 202–206.

MIRANDA, A.S., BRANT F., CAMPOS A.C., VIEIRA L.B, ROCHA N.P., CISALPINO D., BINDA N. S., RODRIGUES D.H., RANSOHOFF R.M., MACHADO F.S., RACHID M.A, TEIXEIRA A. L. **Evidence for the contribution of adult neurogenesis and hippocampal cell death in experimental cerebral malaria cognitive outcome.** *Neuroscience*. 2015 Jan 22;284:920-33.

MIZUNO, T. KAWANOKUCHI, J., NUMATA, K., SUZUMURA, A. **Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system.** *Brain Research* 979 (2003) 65–70.

MOGI M, HARADA M, RIEDERER P, NARABAYASHI H, FUJITA K, NAGATSU T. **Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients.** *Neurosci Lett*. 1994 Jan 3;165(1-2):208-10. doi: 10.1016/0304-3940(94)90746-3. PMID: 8015728.

MOORE KW, DE WAAL MALEFYT R, COFFMAN RL, O'GARRA A. **Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.** *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765.

MONTAGNESE, S., RUSSO, F. P., AMODIO, P., BURRA, P., GASBARRINI, A., LOGUERCIO, MARRCHESINI, G., MERLIF, M., PONZIANI, F. R., RIGGIOF, O., SCARPIGNATO, C. **Hepatic encephalopathy 2018: A clinical practice guideline by the Italian Association for the Study of the Liver (AISF).** Elsevier. 29 October 2018. YDL-3946; No. of Pages16.

M. PASPARAKIS, L. ALEXOPOULOU, E. DOUNI, G. KOLLIAS. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 7 (3) (1996), pp. 223-229.

M. PASPARAKIS, S. KOUSTENI, J. PESCHON, G. KOLLIAS. **Cellular Immunology**, 201 (1) (2000) , pp. 33 – 41.

MORALES, I., FARÍAS, G., MACCIONI, R. C. **Neuroimmunomodulation in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease.** *Neuroimmunomodulation* 2010;17:202–204.

MORONI F, LOMBARDI G, MONETI G, CORTESINI C. **The release and neosynthesis of glutamic acid are increased in experimental models of hepatic encephalopathy.** *J Neurochem* 1983;40:850-854.

MOURI S, TRIPON S, RUDLER M, MALLET M, MAYAUX J, THABUT D, WEISS N. **FOUR score, a reliable score for assessing overt hepatic encephalopathy in cirrhotic patients.** *Neurocrit Care*. 2015 Apr;22(2):251-7. doi: 10.1007/s12028-014-0078-5. PMID: 25330754.

MUNOZ, S.J., **Hepatic Encephalopathy.** *Med Clin N Am* 92 (2008) 795–812.

MUNDER, M., M., MALLO, EICHMANN, K., MODOLELL, M. **Murine Macrophages Secrete Interferon γ upon Combined Stimulation with Interleukin (IL)-12 and IL-18: A Novel Pathway of Autocrine Macrophage Activation .** *J Exp Med* 15 June 1998; 187 (12): 2103–2108.

MWANGI SM, NEZAMI BG, OBUKWELU B, ANITHA M, MARRI S, FU P, EPPERSON MF, LE NA, SHANMUGAM M, SITARAMAN SV, TSENG YH, ANANIA FA, SRINIVASAN S. **Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against high-fat diet-induced obesity.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014 Mar;306(6):G515-25.

NARDONE, R., TAYLOR, A. C., HOLLEN, Y., BRIGO, F., LOCHNER, P., TRINKA, E. **Minimal hepatic encephalopathy: A review.** *Neuroscience Research* 111 (2016) 1–12.

NAUDE, P. J. W., DEN BOER, J. A., LUITEN, P. G. M., EISEL, U. L. M. **Tumor necrosis factor receptor cross-talk.** *FEBS Journal* 278 (2011) 888–898.

NISHI, R. **Target-derived molecules that influence the development of neurons in the avian ciliary ganglion.** *Journal of Neurobiology*, v. 25, n. 6, p. 612–619, 1994.

NIKNAHAD, H., JAMSHIDZADEH, A., HEIDARI, R., ZAREI, M., OMMATI, M. M., **Ammonia-induced mitochondrial dysfunction and energy metabolism disturbances in isolated brain and liver mitochondria, and the effect of taurine administration: relevance to hepatic encephalopathy treatment.** *Clinical and Experimental Hepatology* 2017; 3, 3: 141–151.

NIU, X., ZHENG, S., LIU, H., LI, S. **Protective effects of taurine against inflammation, apoptosis, and oxidative stress in brain injury.** *Molecular medicine reports* 18: 4516-4522, 2018.

NORENBERG, M. D., RAMA, K. V., RAO, A.R. JAYAKUMAR. **Signaling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity;** *Metab. Brain Dis.*, 24 (1) (2009), pp. 103-117.

NORENBERG M. **Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity.** *Hepatology.* 2003;37:245–248.

NORENBERG, M. D., & BENDER, A. S. **Astrocyte swelling in liver failure: role of glutamine and benzodiazepines.** In *Brain edema IX, 1994*, (pp. 24-27). Springer, Vienna.

NUSRAT, S., KHAN, M. S., FAZILI, J., MADHOUN, M. F. **Cirrhosis and its complications: Evidence based treatment.** *World J Gastroenterol* 2014 May 14; 20(18): 5442-5460.

NORRIS KL, HAO R, CHEN LF, LAI CH, KAPUR M, SHAUGHNESSY PJ, CHOU D, YAN J, TAYLOR JP, ENGELENDER S, WEST AE, LIM KL, YAO TP. **Convergence of Parkin, PINK1, and α -Synuclein on Stress-induced Mitochondrial Morphological Remodeling.** *J Biol Chem.* 2015 May 29;290(22):13862-74. doi: 10.1074/jbc.M114.634063. Epub 2015 Apr 10. PMID: 25861987; PMCID: PMC4447961.

O'CALLAGHAN JP, SRIRAM K, MILLER DB. **Defining "neuroinflammation".** *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Oct;1139:318-30. doi: 10.1196/annals.1432.032. PMID: 18991877.

O'CARROL, R. E. **Neuropsychological Aspects of Liver Disease and its Treatment.** *Neurochemical Research*, April 2008, Volume 33, Issue 4, pp 683–690.

ODEH M. **Pathogenesis of hepatic encephalopathy: the tumour necrosis factor-alpha theory.** *Eur J Clin Invest.* 2007 Apr;37(4):291-304. doi: 10.1111/j.1365-2362.2007.01778.x. PMID: 17373965.

O'GRADY JG, **Acute liver failure.** *Med J* 2005; 81:148–154. doi: 10.1136/pgmj.2004.026005.

O'GRADY JG, SCHALM SW, WILLIAMS R. **Acute liver failure: redefining the syndromes.** *Lancet* 1993;342:273-75.

OLYUINKA OO, BRANDT ML. 2007. **Growth and development.** In: JP O'Leary, A Tabuenca, editors. *The Physiologic Basis of Surgery.* 4th Ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.

ORO, C., QIAN, H., THOMAS, W. G. **Type 1 angiotensin receptor pharmacology: Signaling beyond G proteins.** *Pharmacology & Therapeutics* 113 (2007) 210–226.

ORTÍ-CASAÑ, N., WU, Y., NAUDÉ, P J. W., DE DEYN, P. P., ZUHORN, I. S., EISEL, U. L. M. **Targeting TNFR2 as a Novel Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease.** *Frontiers in Neuroscience.* volume 13 | Article 49. 2019.

PABON, M. M., BACHSTETTER, A. D., HUDSON, C. E., GEMMA, C., BICKFORD, P. C. **CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease.** *Journal of Neuroinflammation.* 8: 9. 2011.

PASCUAL, A., HIDALGO-FIGUEROA, M., GOMEZ-DIAZ, R., AND LOPEZ-BARNEO, J. **GDNF and protection of adult central catecholaminergic neurons.** *Journal of Molecular Endocrinology* (2011) 46, R83–R92.

PASPARAKIS M, ALEXOPOULOU L, EPISKOPOU V, KOLLIAS G. **Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response.** *J Exp Med.* 1996 Oct 1;184(4):1397-411. doi: 10.1084/jem.184.4.1397. PMID: 8879212; PMCID: PMC2192824.

PASPARAKIS M, KOUSTENI S, PESCHON J, KOLLIAS G. **Tumor necrosis factor and the p55TNF receptor are required for optimal development of the marginal sinus and for migration of follicular dendritic cell precursors into splenic follicles.** *Cell Immunol.* 2000 Apr 10;201(1):33-41. doi: 10.1006/cimm.2000.1636. PMID: 10805971.

PENNICA D, NEDWIN GE, HAYFLICK JS, SEEBURG PH, DERYNCK R, PALLADINO MA, KOHR WJ, AGGARWAL BB, GOEDDEL DV. **Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin.** *Nature.* 1984 Dec 20-1985 Jan 2;312(5996):724-9. doi: 10.1038/312724a0. PMID: 6392892.

PIERZCHALA K, SIMICIC D, SIENKIEWICZ A, SESSA D, MITREA S, BRAISSANT O, MCLIN VA, GRUETTER R, CUDALBU C. **Central nervous system and systemic oxidative stress interplay with inflammation in a bile duct ligation rat model of type C**

hepatic encephalopathy. *Free Radic Biol Med.* 2022 Jan;178:295-307. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.011. Epub 2021 Dec 8. PMID: 34890769.

PODHORNA J, BROWN R. E. **Strain differences in activity and emotionality do not account for differences in learning and memory performance between C57BL/6 and DBA/2 mice.** *Genes Brain Behav.* 2002 May;1(2):96-110.

PRADO M. A, GUATIMOSIM C, GOMEZ M.V., DINIZ C.R., CORDEIRO M.N., ROMANO-SILVA M. A. **A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider Phoneutria nigriventer.** *Biochemistry. Journal.* 1996; 314:145-150.

PRESTES, T. R. R., ROCHA, N. P., MIRANDA, A. S., TEIXEIRA, A. L., SILVA, AC. S. **The Anti-Inflammatory Potential of ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas Receptor Axis: Evidence from Basic and Clinical Research.** *Current Drug Targets,* 2017, 18, 1301-1313.

PRUUNSILD P, KAZANTSEVA A, AID T, PALM K, TIMMUSK T. **Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters.** *Genomics.* 2007 Sep;90(3):397-406. doi: 10.1016/j.ygeno.2007.05.004. Epub 2007 Jul 12. PMID: 17629449; PMCID: PMC2568880.

PRYSTUPA A, KICIŃSKI P, SAK J, BOGUSZEWSKA-CZUBARA A, TORUŃ-JURKOWSKA A, ZAŁUSKA W. **Proinflammatory Cytokines (IL-1 α , IL-6) and Hepatocyte Growth Factor in Patients with Alcoholic Liver Cirrhosis.** *Gastroenterol Res Pract.* 2015;2015:532615. doi: 10.1155/2015/532615. Epub 2015 Aug 20. PMID: 26448742; PMCID: PMC4558446.

RACHID MA, DA SILVA CAMARGOS ER, MARZANO LAS, DA SILVA OLIVEIRA B, FERREIRA RN, MARTINELLI PM, TEIXEIRA AL, MIRANDA AS, SIMÕES E SILVA AC. **Effect of blockade of nitric oxide in heart tissue levels of Renin Angiotensin System components in acute experimental Chagas disease.** *Life Sci.* 2019 Feb 15;219:336-342. doi: 10.1016/j.lfs.2019.01.033. Epub 2019 Jan 23. PMID: 30684542.

RADAEVA, S., SUN R., JARUGA, B., NGUYEN, V.T., TIAN, Z., GAO, B. **Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners.** *Gastroenterology.* 2006 Feb;130(2):435-52. doi: 10.1053/j.gastro.2005.10.055. PMID: 16472598.

RAJARAM, P., SUBRAMANIAN, R. **Management of Acute Liver Failure in the Intensive Care Unit Setting.** *Clin Liver Dis* 22 (2018) 403–408.

RANSOHOFF, R. M., PERRY, V. H. **Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses.** *Annu. Rev. Immunol.* 2009. 27:119–45.

RAMA RAO KV, JAYAKUMAR AR, TONG X, ALVAREZ VM, NORENBURG MD. **Marked potentiation of cell swelling by cytokines in ammonia-sensitized cultured astrocytes.** *J Neuroinflammation.* 2010 Oct 13;7:66. doi: 10.1186/1742-2094-7-66. PMID: 20942959; PMCID: PMC2964656.

RAO, S. L. N.; MEISTER, Alton. **In vivo formation of methionine sulfoximine phosphate, a protein-bond metabolite of methionine sulfoximine.** *Biochemistry*, v. 11, n. 7, p. 1123-1127, 1972.

RAO, P., HSU, K. C., CHAO, M. V. **Upregulation of NF-kB-Dependent Gene Expression Mediated by the p75 Tumor Necrosis Factor Receptor.** *Journal of Interferon and Cytokine Research* 15:171-177 (1995).

ROBERTS, E., AND FRANKE, S., **Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid.** *Nov 1950*;187(1):55-63.

ROCHA, SM, CRISTOVÃO, AC, CAMPOS, FL, FONSECA, CP AND BALTAZAR, G. **GDNF derived from astrocytes is a potent inhibitor of microglial activation.** *Neurobiol. Dis.*, 2012, 47, 407-415.

RODRIGUES-MACHADO, M G, MAGALHÃES, G S., CARDOSO, J A., KANGUSSU, L M, MURARI, A, CALIARI, M V, OLIVEIRA, M L., CARA, D C, NOVIELLO, M L M, MARQUES, F D, PEREIRA, LAUTNER, R Q., SANTOS, R. A. S., CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. **AVE 0991, J M a non-peptide mimic of angiotensin-(1-7) effects, attenuates pulmonary remodelling in a model of chronic asthma.** *British Journal of Pharmacology* (2013) 170 835–846 835.

REINEHR R, GÖRG B, BECKER S, QVARTSKHAVA N, BIDMON HJ, SELBACH O, HAAS HL, SCHLISS F, HÄUSSINGER D. **Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices.** *Glia*. 2007 May;55(7):758-71.

REITH FC, VAN DEN BRANDE R, SYNNOT A, GRUEN R, MAAS AI. **The reliability of the Glasgow Coma Scale: a systematic review.** *Intensive Care Med.* 2016 Jan;42(1):3-15. doi: 10.1007/s00134-015-4124-3. Epub 2015 Nov 12. PMID: 26564211.

REUBEN A, KOCH DG, LEE WM; **Acute Liver Failure Study Group. Drug-induced acute liver failure: results of a U.S. multicenter, prospective study.** *Hepatology*. 2010 Dec;52(6):2065-76. Epub 2010 Oct 14. PMID: 20949552; PMCID: PMC3992250.

REUBI, J. C., VAN DER BERGS; CUENOD, M. **Glutamine as precursor for the gaba and glutamate, transmitter pools.** *J.C. Neuroscience letters*, 10 (1978) 171-1.

REY I, EFFENDI-YS R. **Association Between Serum IL-6, IL-10, IL-12, and IL-23 Levels and Severity of Liver Cirrhosis.** *Med Arch.* 2021 Jun;75(3):199-203. doi: 10.5455/medarh.2021.75.199-203. PMID: 34483450; PMCID: PMC8385729.

ROBERTS E, FRANKEL S. **Gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid.** *J Biol Chem.* 1950 Nov;187(1):55-63. PMID: 14794689.

ROCHA SM, CRISTOVÃO AC, CAMPOS FL, FONSECA CP, BALTAZAR G. **Astrocyte-derived GDNF is a potent inhibitor of microglial activation.** *Neurobiol Dis.* 2012 Sep;47(3):407-15. doi: 10.1016/j.nbd.2012.04.014. Epub 2012 May 3. PMID: 22579772.

ROCHA NP, TOLEDO A, CORGOSINHO LTS, DE SOUZA LC, GUIMARÃES HC, RESENDE EPF, BRAZ NFT, GOMES KB, SIMOES E SILVA AC, CARAMELLI P, TEIXEIRA AL. **Cerebrospinal Fluid Levels of Angiotensin-Converting Enzyme Are Associated with Amyloid- β 42 Burden in Alzheimer's Disease.** *J Alzheimers Dis.* 2018;64(4):1085-1090. doi: 10.3233/JAD-180282. PMID: 30040721.

RODRIGO R, CAULI O, GOMEZ-PINEDO U, AGUSTI A, HERNANDEZ-RABAZA V, GARCIA-VERDUGO JM, FELIPO V. **Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy.** *Gastroenterology.* 2010 Aug;139(2):675-84.

RODRIGUES-MACHADO MG, MAGALHÃES GS, CARDOSO JA, et al. **AVE 0991, a non-peptide mimic of angiotensin-(1-7) effects, attenuates pulmonary remodelling in a model of chronic asthma.** *Br J Pharmacol* 2013; 170: 835-46.

RODRIGUEZ-PALLARES J, REY P, PARGA JA, MUÑOZ A, GUERRA MJ, LABANDEIRA-GARCIA JL. **Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS.** *Neurobiol Dis.* 2008 Jul;31(1):58-73. doi: 10.1016/j.nbd.2008.03.003. Epub 2008 Apr 1. PMID: 18499466.

SAITO K, ISHIZAKA N, AIZAWA T, SATA M, ISO-O N, NOIRI E, MORI I, OHNO M, NAGAI R. **Iron chelation and a free radical scavenger suppress angiotensin II-induced upregulation of TGF-beta1 in the heart.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Apr;288(4):H1836-43. doi: 10.1152/ajpheart.00679.2004. Epub 2004 Nov 18. PMID: 15550525.

SANTOS, G., FIGUEIRA, E. R. R., D'ALBUQUERQUE, LA. C., LISBOA, P. B., DE ALMEIDA, M. D., FILGUEIRA, N. A., BOIN, I., PORTA, G., DA SILVA, RC. M. A., VIANA, C. F. G., FARIA, L. C., ALVARES-DA-SILVA, M. R., DE MORAES, A. C. P., MORSOLETO, D. P. G., CODES, L., PARANÁ, R. **Evaluation of drug-induced liver injury as etiology for acute liver failure in Brazil.** *Annals of Hepatology*, Volume 23, 2021, 100310, ISSN 1665-2681.

SANTOS R A., SIMOES E SILVA A.C, MARIC C, SILVA D.M, MACHADO R.P, DE BUHR I, HERINGER-WALTHER S, PINHEIRO S.V, LOPES M.T, BADER M, MENDES E. P, LEMOS V. S, CAMPAGNOLE-SANTOS M.J, SCHULTHEISS H.P, SPETH R, WALTHER T. **Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 8;100(14):8258-63. Epub 2003 Jun 26.

SANTOS S. H., FERNANDES L. R, MARIO E. G, FERREIRA A. V, PÔRTO L. C, ALVAREZ-LEITE J. I, BOTION L. M, BADER M, ALENINA N, SANTOS R. A. **Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism.** *Diabetes.* 2008 Feb;57(2):340-7. Epub 2007 Nov 19.

SARIOLA1, H., AND SAARMA, M. **Novel functions and signalling pathways for GDNF.** *Journal of Cell Science* 116, 3855-3862, 2003.

SCARLATO, M., XU, T., BANNERMAN, P., BEESLEY, J., REDDY, U. R., ROSTAMI, A., SCHERER, S. S., PLEASURE1, D. **Axon-Schwann Cell Interactions Regulate the**

Expression of Fibroblast Growth Factor-5 (FGF-5). *Journal of Neuroscience Research* 66:16–22 (2001).

SCHOUSBOE, A., BAK, L. K., WAAGEPETERSEN, H. S. **Astrocytic control of biosynthesis and turnover of the neurotransmitters glutamate and GABA.** *Frontiers in Endocrinology*. August 2013; Volume 4; Article 102; 2. doi: 10.3389/fendo.2013.00102.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P.; RAVASI, T.; HUME, D. **Interferon-gama an overview of signals, mechanism and functions.** *Journal of Leukocyte*, v. 75, n.2, p. 163-189, 2004.

SCURI, M.; SAMSELL, L.; PIEDIMONTE, G. **The role of neurotrophins in inflammation and allergy.** *Inflamm Allergy Drug Targets*, v. 9, n. 3, p. 173–180, 2010.

SEIFERT G, SCHILLING K, STEINHÄUSER C. **Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective.** *Nat Rev Neurosci*. 2006 Mar;7(3):194-206.

SEPEHRINEZHAD A, SHAHBAZI A, SAHAB NEGAH S, JOGHATAEI MT, LARSEN FS. **Drug-induced-acute liver failure: A critical appraisal of the thioacetamide model for the study of hepatic encephalopathy.** *Toxicol Rep*. 2021;8:962-970. Published 2021 Apr 30.

SESHIAH PN, WEBER DS, ROCIC P, VALPPU L, TANIYAMA Y, GRIENDLING KK. **Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators.** *Circ Res*. 2002 Sep 6;91(5):406-13. doi: 10.1161/01.res.0000033523.08033.16. PMID: 12215489.

SHAWCROSS DL, WENDON JA. **The neurological manifestations of acute liver failure.** *Neurochem Int*. 2012 Jun;60(7):662-71.

SHAWCROSS DL, WRIGHT G, OLDE DAMINK SW, JALAN R. **Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy.** *Metab Brain Dis*. 2007 Mar;22(1):125-38.

SHAWCROSS DL, DAVIES NA, WILLIAMS R, JALAN R. **Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis.** *J Hepatol*. 2004 Feb;40(2):247-54.

SHAWCROSS DL, BALATA S, OLDE DAMINK SW, HAYES PC, WARDLAW J, MARSHALL I, DEUTZ NE, WILLIAMS R, JALAN R. **Low myo-inositol and high glutamine levels in brain are associated with neuropsychological deterioration after induced hyperammonemia.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004 Sep;287(3):G503-9. Epub 2004 May 6.

SHAWCROSS D, JALAN R. **Dispelling myths in the treatment of hepatic encephalopathy.** *Lancet*. 2005 Jan 29-Feb 4;365(9457):431-3.

SHAWCROSS D, JALAN R. **The pathophysiologic basis of hepatic encephalopathy: central role for ammonia and inflammation.** *Cell Mol Life Sci*. 2005 Oct;62(19-20):2295-304.

SHENOY V, FERREIRA AJ, QI Y, ET AL. **The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension.** *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 1065-72.

SILVEIRA KD, BARROSO LC, VIEIRA AT, ET AL. **Beneficial effects of the activation of the angiotensin-(1-7) MAS receptor in a murine model of adriamycin-induced nephropathy.** PLoS One 2013; 8: e66082.

SIMÕES E SILVA A. C., PINHEIRO S.V, PEREIRA R. M, FERREIRA A. J, SANTOS R. A. **The therapeutic potential of Angiotensin-(1-7) as a novel Renin-Angiotensin System mediator.** Mini Rev Med Chem. 2006 May;6(5):603-9.

SMITH, C. A. ET AL. **The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, co-stimulation, and death.** *Cell* 76, 959–962 (1994).

STRAVITZ RT, KRAMER DJ. **Management of acute liver failure.** Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2009 Sep;6(9):542-53. doi: 10.1038/nrgastro.2009.127. Epub 2009.

SMITH CA, FARRAH T, GOODWIN RG. **The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death.** *Cell.* 1994 Mar 25;76(6):959-62. doi: 10.1016/0092-8674(94)90372-7. PMID: 8137429.

SNODGRASS PJ. **Urea cycle enzyme activities are normal and inducible by a high-protein diet in CCl4 cirrhosis of rats.** Hepatology. 1989 Mar;9(3):373-9. doi: 10.1002/hep.1840090306. PMID: 2920993.

SPALDING, K.L. BERGMANN, O. ALKASS, K. BERNARD, S. SALEHPOUR, M. HUTTNER, H.B. BOSTRÖM, E. WESTERLUND, I. VIAL, C. BUCHHOLZ, B.A. **Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans.** *Cell*, 153 (2013), pp. 1219-1227.

SPARKS MA, CROWLEY SD, GURLEY SB, MIROTSOU M, COFFMAN TM. **Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology.** *Compr Physiol.* 2014 Jul;4(3):1201-28. doi: 10.1002/cphy.c130040. PMID: 24944035; PMCID: PMC4137912.

STACEY MA, CLARE S, CLEMENT M, MARSDEN M, ABDUL-KARIM J, KANE L, HARCOURT K, BRANDT C, FIELDING CA, SMITH SE, WASH RS, BRIAS SG, STACK G, NOTLEY G, CAMBRIDGE EL, ISHERWOOD C, SPEAK AO, JOHNSON Z, FERLIN W, JONES SA, KELLAM P, HUMPHREYS IR. **The antiviral restriction factor IFN-induced transmembrane protein 3 prevents cytokine-driven CMV pathogenesis.** *J Clin Invest.* 2017 Apr 3;127(4):1463-1474. doi: 10.1172/JCI84889. Epub 2017 Feb 27. PMID: 28240600; PMCID: PMC5373880.

STEPANOVA M, MISHRA A, VENKATESAN C, YOUNOSSI ZM. **In-hospital mortality and economic burden associated with hepatic encephalopathy in the United States from 2005 to 2009.** Clin Gastroenterol Hepatol. 2012 Sep;10(9):1034-41.e1. Epub 2012 May 27. PMID: 22642955.

STEWART, A. C; CERHAN, J. **Hepatic encephalopathy: A dynamic or static condition.** Psychiatry and Psychology, 2005.

STREETZ K, LEIFELD L, GRUNDMANN D, RAMAKERS J, ECKERT K, SPENGLER U, BRENNER D, MANNS M, TRAUTWEIN C. **Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure.** *Gastroenterology.* 2000 Aug;119(2):446-60. doi: 10.1053/gast.2000.9364. PMID: 10930380.

SUN, XL, CHEN, BY, DUAN, L., XIA, Y., LUO, ZJ, WANG, JJ, RAO, ZR, AND CHEN, LW (2014) **The proform of glial cell line derived neurotrophic factor: a potentially biologically active protein**, *Mol. Neurobiol.* 49, 234-250.

SUREKA B, BANSAL K, PATIDAR Y, RAJESH S, MUKUND A, ARORA A. **Neurologic Manifestations of Chronic Liver Disease and Liver Cirrhosis**. *Curr Probl Diagn Radiol.* 2015 Sep-Oct;44(5):449-61. doi: 10.1067/j.cpradiol.2015.03.004. Epub 2015 Mar 20. PMID: 25908229.

SWANSON, C. J., BURES, M., JOHNSON, M. P., LINDEN, A.M., MONN, J. A., SCHOEPP, D.D. **Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders**. *Nature reviews*. Volume 4; february 2005; pg. 131.

TABA TABA VAKILI S, KAILAR R, RAHMAN K, NEZAMI BG, MWANGI SM, ANANIA FA, SRINIVASAN S. **Glial cell line-derived neurotrophic factor-induced mice liver defatting: A novel strategy to enable transplantation of steatotic livers**. *Liver Transpl.* 2016 Apr;22(4):459-67. doi: 10.1002/lt.24385. PMID: 26714616; PMCID: PMC4809758.

TAKAHASHI, K. A., CASTILLO, P. E. **The CB1 cannabinoid receptor mediates glutamatergic synaptic suppression in the hippocampus**. *Neuroscience*. 2006;139(3):795-802. Epub 2006 Mar 9.

TERENGGHI, G. **Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors**. *Journal of anatomy*, p. 1–14, 1999.

THAWLEY V. **Acute Liver Injury and Failure**. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2017 May;47(3):617-630. doi: 10.1016/j.cvsm.2016.11.010. Epub 2017 Jan 6. PMID: 28065578.

THOENEN H, BARDE YA. **Physiology of nerve growth factor**. *Physiol Rev.* 1980 Oct;60(4):1284-335. doi: 10.1152/physrev.1980.60.4.1284. PMID: 6159658.

THOME, A. D., STANDAERT, D. G., HARMS, A. S. **Fractalkine Signaling Regulates the Inflammatory Response in an α -Synuclein Model of Parkinson Disease** *Journal Plos one*; 0140566; October 15, 2015 1 / 13.

TAKAHASHI, T. **Lobular structure of the human liver from the viewpoint of hepatic vascular architecture**. *Tohoku J. Exp. Med.*, 101 (1970) pp. 119 – 140.

THUMBURU KK, TANEJA S, VASISHTA RK, DHIMAN RK. **Neuropathology of acute liver failure**. *Neurochem Int.* 2012 Jun;60(7):672-5. doi: 10.1016/j.neuint.2011.10.013. Epub 2011 Dec 16. PMID: 22198438.

TILG H, NORDBERG J, VOGEL W, LUGER TA, HEROLD M, AULITZKY WE, MARGREITER R, HUBER C. **Circulating serum levels of interleukin 6 and C-reactive protein after liver transplantation**. *Transplantation.* 1992 Jul;54(1):142-6. doi: 10.1097/00007890-199207000-00025. PMID: 1321519.

TIMMERMANN L, BUTZ M, GROSS J, KIRCHEIS G, HÄUSSINGER D, SCHNITZLER A. **Neural synchronization in hepatic encephalopathy.** *Metab Brain Dis.* 2005 Dec;20(4):337-46.

TIPNIS S. R., HOOPER N.M., HYDE R, KARRAN E, CHRISTIE G, TURNER AJ. **A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase.** *J Biol Chem.* 2000 Oct 27;275(43):33238-43.

TREFTS, E., GANNON, M., WASSERMAN, D., H. **The liver.** *Curr Biol.* 2017 November 06; 27(21): R1147–R1151 (2017).

TROTTER, J. F. & CÁRDENAS, A. **Liver Transplantation,** American Association for the Study of Liver Diseases (2016).22 (8), 1059-1061.

TÚNEZ I, MUÑOZ MC, VILLAVICENCIO MA, MEDINA FJ, DE PRADO EP, ESPEJO I, BARCOS M, SALCEDO M, FEIJÓO M, MONTILLA P. **Hepato- and neurotoxicity induced by thioacetamide: protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide.** *Pharmacol Res.* 2005 Sep;52(3):223-8. doi: 10.1016/j.phrs.2005.03.007. PMID: 15896975.

VAAJANEN, A., VAPAATALO, H., KAUTIAINEN, H., OKSALA, O. **Angiotensin (1-7) Reduces Intraocular Pressure in the Normotensive Rabbit Eye.** *IOVS,* June 2008, Vol. 49, No. 6.

VALENZUELA, R.; BARROSO-CHINEA, P.; VILLAR-CHEDA, B.; JOGLAR, B.; MUNOZ, A.; LANCIEGO, J.L.; LABANDEIRA-GARCIA, J.L. **Location of prorenin receptors in primate substantia nigra: Effects on dopaminergic cell death.** *J. Neuropathol. Exp. Neurol.,* 2010, 69(11), 1130-1142.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T. D., MAZUR, M., TELSER, J. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (2007) 44–84.

VAQUERO J, CHUNG C, BLEI AT. **Brain edema in acute liver failure. A window to the pathogenesis of hepatic encephalopathy.** *Ann Hepatol.* 2003a;2(1),12-22.

VERMA, A., SHAN, Z., LEI, B., YUAN, L. LIU, X., NAKAGAWA, T., GRANT, M. B., LEWIN, A. S., HAUSWIRTH, W. W., RAIZADA, M. K., LI, Q. **ACE2 and Ang-(1-7) Confer Protection Against Development of Diabetic Retinopathy.** *The American Society of Gene & Cell Therapy;* vol. 20 no. 1, 28–36 jan. 2012.

VIGNALI DA, KUCHROO VK. **IL-12 family cytokines: immunological playmakers.** *Nat Immunol.* 2012 Jul 19;13(8):722-8. doi: 10.1038/ni.2366. PMID: 22814351; PMCID: PMC4158817.

VILLAPOL, S; SAAVEDRA, J. M. **Neuroprotective effects of Angiotensin Receptor Blockers.** *American journal of Hypertension,* 28 (3), 2015.

VILSTRUP H, AMODIO P, BAJAJ J, et al., **Hepatic Encephalopathy in Chronic Liver Disease:2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver**

Diseases and the European Association for the Study of the Liver. Journal of Hepatology. April 28, 2014.

VUKOVIC, J., COLDITZ, M. J., BLACKMORE, D. G., RUITENBERG, M.J., BARTLETT, P.F. **Microglia modulate hippocampal neural precursor activity in response to exercise and aging.** J. Neurosci., 32 (2012), pp. 6435-6443.

XU P, CHEN A, LI Y, XING X, LU H. **Medial prefrontal cortex in neurological diseases.** Physiol Genomics. 2019 Sep 1;51(9):432-442. doi: 10.1152/physiolgenomics.00006.2019. Epub 2019 Aug 2. PMID: 31373533; PMCID: PMC6766703.

XUE H, LI H, JU LL, HAN XD, CHENG TC, LUO X, CHEN L, SHAO JG, SHE YJ, BIAN ZL. **Mucosal-associated invariant T cells in hepatitis B virus-related liver failure.** *World J Gastroenterol.* 2020 Aug 21;26(31):4703-4717.

WAJANT H, PFIZENMAIER K, SCHEURICH P. **Tumor necrosis factor signaling.** *Cell Death Differ.* 2003 Jan;10(1):45-65. doi: 10.1038/sj.cdd.4401189. PMID: 12655295.

WANG, W., LU, H., LU, X., WANG, D., WANG, Z., DAI, W., WANG, J., LIU, P. **Effect of tumor necrosis factor- α on the expression of the ammonia transporter Rhcg in the brain in mice with acute liver Failure.** Journal of Neuroinflammation (2018) 15:234.

WANG, L., CHANG, X., SHE, L., XU, D., HUANG, W., POO, M.M. **Autocrine action of BDNF on dendrite development of adult-born hippocampal neurons.** J. Neurosci., 35 (2015), pp. 8384-8393.

WANG HL, MA RH, FANG H, XUE ZG, LIAO QW. **Impaired Spatial Learning Memory after Isoflurane Anesthesia or Appendectomy in Aged Mice is Associated with Microglia Activation.** *J Cell Death.* 2015 Sep 3;8:9-19.

WANG, L., CHOPP, M., TENG, H., BOLZ, M., FRANCISCO, M. A., ALUIGI, D. M., WANG, X. L., ZHANG, R.L., CHRSTENSEN, S., SAGER, T. N., SZALAD, A., ZHANG, Z. G. **Tumor necrosis factor α primes cerebral endothelial cells for erythropoietin-induced angiogenesis.** Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (2011) 31, 640–647.

WARD-KAVANAGH, L. K., LIN, W. W., SEDY, J. R., WARE, C. F. **The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses.** Immunity 44, May 17, 2016.

WATANABE M. **[Emotional and Motivational Functions of the Prefrontal Cortex].** Brain Nerve. 2016 Nov;68(11):1291-1299. Japanese.

WIENS GD, GLENNEY GW. **Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies.** *Dev Comp Immunol.* 2011 Dec;35(12):1324-35. doi: 10.1016/j.dci.2011.03.031. Epub 2011 Apr 19. PMID: 21527275.

WILLARD-MACK CL, KOEHLER RC, HIRATA T, CORK LC, TAKAHASHI H, TRAYSTMAN RJ, BRUSILOW SW. **Inhibition of glutamine synthetase reduces ammonia-induced astrocyte swelling in rat.** *Neuroscience.* 1996 Mar;71(2):589-99.

WOLF, S. L. **Believing in brain and brawn.** J Neurol Phys Ther. 2006 Sep;30(3):117; discussion 118-9.

WOLF RC, SPIESS J, HUBER R. **Lambl's excrescence and cerebral ischemic insult.** *Nervenarzt.* 2006 Dec;77(12):1492-4.

WRIGHT G, JALAN R. **Management of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2007;21(1):95-110.

WU H, LI N, JIN R, MENG Q, CHEN P, ZHAO G, WANG R, LI L, LI W. **Cytokine levels contribute to the pathogenesis of minimal hepatic encephalopathy in patients with hepatocellular carcinoma via STAT3 activation.** *Sci Rep.* 2016 Jan 13;6:18528. doi: 10.1038/srep18528. PMID: 26757951; PMCID: PMC4725946.

WU HT, CHUANG YW, HUANG CP, CHANG MH. **Loss of angiotensin converting enzyme II (ACE2) accelerates the development of liver injury induced by thioacetamide.** *Exp Anim.* 2018 Feb 9;67(1):41-49. doi: 10.1538/expanim.17-0053. Epub 2017 Aug 25. PMID: 28845018; PMCID: PMC5814313.

YOUNG HA. **Regulation of interferon-gamma gene expression.** *J Interferon Cytokine Res.* 1996 Aug;16(8):563-8. doi: 10.1089/jir.1996.16.563. PMID: 8877725.

ZAKHAROVA, M., ZIEGLER, H. K. **Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF- α : inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells.** *J. Immunol.*, 175 (2005), p. 5024.

ZHAI, Y. ET AL. VEGI. **A novel cytokine of the tumor necrosis factor family, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of colon carcinomas *in vivo*.** *FASEB J.* 13, 181–189 (1999).

ZHANG, L., TAN, J., JIANG, X., QIAN, W., YANG, T., SUN, X., CHEN, Z., ZHU, Q. **Neuron-derived CCL2 contributes to microglia activation and neurological decline in hepatic encephalopathy.** *Biol Res* (2017) 50:26.

ZHANG, S. WANG, Q. **Factors determining the formation and release of bioactive IL-12: Regulatory mechanisms for IL-12p70 synthesis and inhibition.** *Biochemical and Biophysical Research C.* Volume 372, pag. 509-512, 2008.

8. ANEXOS

8.1 PROTOCOLO CEUA APROVADO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Papel do TNF e do sistema RAS no modelo experimental de encefalopatia hepática", protocolo do CEUA: 341/2018 sob a responsabilidade de Milene Alvarenga Rachid que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 12/11/2018.

Vigência da Autorização	12/11/2018 a 11/11/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	17g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	biotério CEBIO ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / C57BL6
Nº de animais	6
Peso/Idade	17g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério de criação de linhagens especiais
12/11/2018	Aprovado na reunião do dia 12/11/2018. Validade:12/11/2018 à 11/11/2023

Conside
raçõ
es
post
erior
es:
U
n
i
v
e
r
s
i
d
a
d
e

Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus
Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 –
Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br