

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Patologia

Faculdade de Medicina

Luiza Cioglia Dias Lima

**ASPECTOS COMPORTAMENTAIS ASSOCIADOS ÀS ALTERAÇÕES
PATOLÓGICAS, INFLAMATÓRIAS E NEUROQUÍMICAS NA
ENCEFALOPATIA HEPÁTICA EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte
2019

Luiza Cioglia Dias Lima

**ASPECTOS COMPORTAMENTAIS ASSOCIADOS ÀS ALTERAÇÕES
PATOLÓGICAS, INFLAMATÓRIAS E NEUROQUÍMICAS NA
ENCEFALOPATIA HEPÁTICA EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Investigativa.

Orientadora: Dra. Milene Alvarenga Rachid

Coorientador: Dr. Vitor Márcio Ribeiro

Belo Horizonte
2019

- 043 Lima, Luiza Cioglia Dias.
Aspectos comportamentais associados às alterações patológicas, inflamatórias e neuroquímicas na encefalopatia hepática experimental [manuscrito] / Luiza Cioglia Dias Lima. - 2019.
108 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Dra. Milene Alvarenga Rachid. Coorientador: Dr. Vitor Márcio Ribeiro.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.
1. Patologia. 2. Encefalopatia Hepática. 3. Tioacetamida. 4. Comportamento. 5. Depressão. 6. Ansiedade. 7. Inflamação. 8. Fatores de Crescimento Neural. I. Rachid, Milene Alvarenga. II. Ribeiro, Vitor Márcio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

ASPECTOS COMPORTAMENTAIS ASSOCIADOS AS ALTERAÇÕES
PATOLÓGICAS, INFLAMATÓRIAS E NEUROQUÍMICAS NA ENCEFALOPATIA
HEPÁTICA EXPERIMENTAL

LUIZA CIOGLIA DIAS LIMA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Milene de Alvarenga Rachid - Orientador
UFMG

Prof(a). Vitor Marcio Ribeiro - Coorientador
UFMG

Prof(a). Rubem Antônio Carneiro
Escola de Veterinária

Prof(a). Thiago Henrique Caldeira de Oliveira
UFMG

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2019.

Essa dissertação foi realizada nos Laboratórios de Patologia Celular e Molecular, Laboratório de Imunofarmacologia e Laboratório Conceição Machado, dos Departamentos de Patologia Geral, Departamento de Bioquímica e Imunologia e Departamento de Morfologia, respectivamente, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Profa. Milene Alvarenga Rachid, com auxílio do CNPq, CAPES e FAPEMIG.

Aos meus pais, Cláudio e Maria Carmen, à Paula, colaboradores e equipe do
Laboratório de Patologia Celular e Molecular da UFMG

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pela saúde a mim concedida, por guiar meus passos e não me deixar desanimar mesmo em meio às dificuldades.

Agradeço aos meus pais, Cláudio e Maria Carmen, a quem devo grande parte do que sou hoje, pelo presente da vida. Obrigada por tanto.

À minha irmã, Paula, por acreditar no meu potencial e fazer me sentir admirada. Você me faz querer ser melhor.

À Eliana, minha amiga, por ter compartilhado grande parte dessa jornada comigo. Por toda a ajuda intelectual e sentimental, não te largo mais.

À turma do mestrado da Patologia/2017, por todos os momentos que passamos juntos, em especial ao Lab. do Deboche, por me acolherem e me ajudarem sempre a seguir em frente.

À Dra. Milene Rachid, minha orientadora, por ter aberto as portas do universo acadêmico e me recebido tão bem desde o início.

Ao meu coorientador, Dr. Vitor Ribeiro, pela indicação para o mestrado e por ser o gatilho inicial desse projeto.

À Dra. Aline Miranda, pelas sugestões, sempre pertinentes e por me oferecer a infraestrutura e as colaborações necessárias para que o trabalho fosse realizado.

À Dra. Tatiane Paixão, por proporcionar minha primeira experiência na docência, e por todas as considerações a respeito desse projeto.

Aos técnicos do Laboratório de Técnicas Histológicas do Departamento de Patologia Geral, pelo auxílio no processamento das amostras.

A todos os amigos e colegas que de forma direta ou indireta, contribuíram para a execução do trabalho, pela paciência e disponibilidade, os meus mais sinceros agradecimentos.

Aos animais, parte fundamental desse trabalho, obrigada pela contribuição à ciência e por serem minha fonte de inspiração.

RESUMO

A encefalopatia hepática (EH) é uma complicação neurológica que ocorre em consequência à doença hepática. Pacientes que sofrem com EH podem apresentar sintomas neuropsiquiátricos, neuromusculares e comportamentais, o que causa grande impacto na qualidade de vida e capacidade laborativa. Atualmente, o único tratamento definitivo para a falência hepática é o transplante, evidenciando assim a necessidade de desvendar a fisiopatologia e os mecanismos envolvidos na doença, a fim de encontrar novos focos terapêuticos e medidas suportivas até que o transplante esteja disponível. Modelos experimentais de EH em roedores têm sido amplamente utilizados. Acredita-se que estes modelos forneçam informações relevantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença, bem como possibilitem o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos. Estudos que avaliam as sequelas neurológicas após o desenvolvimento da EH assim como sua associação com dados teciduais, perfis inflamatório e neuroquímico em fases mais tardias da doença são escassos. Por meio da utilização de camundongos C57BL/6, fêmeas, entre oito e doze semanas de idade, foram investigadas as alterações comportamentais e patológicas associadas às respostas inflamatória e neuroprotetora na EH induzida por falência hepática por injeção intraperitoneal de tioacetamida (TAA). Os camundongos foram divididos em grupos TAA e grupo controle, sendo esses últimos, submetidos à injeção intraperitoneal de salina. Os animais do grupo TAA apresentaram dano hepático associado a maior atividade dos neutrófilos e macrófagos. Além disso, os animais induzidos demonstraram através da aplicação de testes, comportamento semelhante à ansiedade e à depressão e alterações morfológicas dos astrócitos e da micróglia. Este mesmo grupo apresentou redução significativa da expressão das citocinas pró-inflamatórias interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-6 (IL-6) no hipocampo e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no córtex cerebral, quando comparado com os animais do grupo controle. Nossos resultados sugerem que disfunções das respostas inflamatória e neuroprotetora estejam associadas à formação dos déficits comportamentais na EH murina.

Palavras Chaves: Encefalopatia hepática, Tioacetamida, Comportamento, Depressão, Ansiedade, Patologia, Inflamação, Fatores Neurotróficos

ABSTRACT

Hepatic encephalopathy (HE) is a neurological complication observed in hepatic failure. HE patients may present neuropsychiatric, neuromuscular, and behavioral disorders, which may impair quality of life and work capability. Currently, the only definitive treatment for hepatic failure is transplantation, which highlights the need for complete understanding of the pathophysiology and mechanisms involved in the disease, in order to establish new therapeutic targets and supportive measures until transplantation is available. Experimental models of HE in rodents have been widely used. It is believed that these models provide relevant information for understanding the mechanisms involved in the pathogenesis of the disease, as well as the development of new therapeutic targets. Studies evaluating neurological sequelae after the development of hepatic encephalopathy as well as its association with tissue data, inflammatory and neurochemical profiles in later stages of the disease are scarce. Using C57BL/6 female mice, between eight and twelve weeks age, we investigated behavioral and pathological changes association with inflammatory and neuroprotective responses during HE that follows hepatic failure induced by intraperitoneal injection of thioacetamide (TAA). Mice were divided into TAA and control groups, the latter being submitted to intraperitoneal injection of saline. TAA animals presented liver damage associated with increased activity of neutrophils and macrophages. In addition, induced animals demonstrated in the applied tests, anxiety-like and depression-like behavior and morphological changes of astrocytes and microglia. This same group showed a significant reduction in expression of proinflammatory cytokines interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-6 (IL-6) in the hippocampus and the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the cerebral cortex when compared to the control animals. Our results suggest that inflammatory and neuroprotective responses disorders are associated with behavioral deficits in murine hepatic encephalopathy.

Keywords: Hepatic encephalopathy, Thioacetamide, TAA, Behavior, Depression, Anxiety, Pathology, Inflammation, Neurotrophic factors

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fatores contribuintes para a patogênese da EH, com ênfase nos efeitos sistêmicos da amônia e inflamação decorrente da falência hepática.....	25
Figura 2. Delineamento experimental para os grupos controle e TAA.....	33
Figura 3. Desenho esquemático do teste de reconhecimento de objetos (TRO).....	37
Figura 4. Variação do peso corporal dos animais durante o experimento.....	43
Figura 5. Redução e recuperação da atividade locomotora dos animais TAA 1 dia (a) e 7 dias (b) p.i.....	44
Figura 6. Comportamento semelhante à ansiedade no grupo TAA, 7 dias p.i.....	45
Figura 7. Comportamento semelhante à depressão no grupo TAA, 7 dias p.i.....	46
Figura 8. Avaliação da memória a curto e longo prazo	47
Figura 9. Dosagem de ALT nos grupos controle, 1, 3 e 7 dias p.i.....	48
Figura 10. Depuração de ICG nos grupos controle, 24h, 72h, e 7 dias p.i.....	49
Figura 11. Dosagem hepática das enzimas NAG e MPO, 1, 3 e 7 dias p.i.....	50
Figura 12. Histopatologia das lesões hepática e cerebral nos grupos TAA 1, 3 e 7 dias.....	52
Figura 13. Imunoistoquímica para GFAP e Iba-1.....	54
Figura 14. Quantificação de citocinas no tecido cerebral.....	58
Figura 15. Quantificação de fatores neurotróficos no tecido cerebral.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela. Classificação da encefalopatia hepática de acordo com nomenclatura estabelecida no 11º Congresso Mundial de Gastroenterologia, Viena e critérios de West Haven para classificação de acordo com a gravidade	21
---	----

LISTA DE SIGLAS

- μL : microlitro
- μm : micrômetro
- AASLD: Associação Americana para Estudo de Doenças do Fígado
- ALT: alanina aminotransferase
- BDNF: *brain-derived neurotrophic factor*: fator neurotrófico derivado do cérebro
- BHE: barreira hematoencefálica
- C57BL/6: C57 black 6: linhagem de camundongo
- Ca^{2+} : íon cálcio
- CBA: Cytometric Bead Array
- CCL2: quimiocina CCL2
- CEBIO: Centro de bioterismo
- CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
- CH_3CSNH_2 : tioacetamida
- cm: centímetro
- CoQ10: coenzima Q10
- CX3CL1: fraquitilquina
- EH: encefalopatia hepática
- EHM: encefalopatia hepática mínima
- ELISA: ensaio imunoenzimático
- ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*; Ensaio imunoenzimático
- FHA: falência hepática aguda
- FHC: falência hepática crônica
- g: grama
- GDNF: *glial cell-derived neurotrophic factor*: fator neurotrófico derivado da linhagem de célula glial
- GFAP: *glial fibrillary acidic protein*; proteína fibrilar ácida da glia
- H&E: hematoxilina e eosina
- i.p.: intraperitoneal
- Iba-1 - *Ionized calcium-binding adaptor molecule-1*; Proteína adaptadora de ligação do cálcio ionizado-1

- ICB: Instituto de Ciências Biológicas
- ICG: verde de indocianina
- IFN- γ : Interferon gama
- IHA: insuficiência hepática aguda
- IL: interleucina
- IL-10: Interleucina 10
- IL12p70: Interleucina 12
- IL-6: Interleucina 6
- ISHEN: Sociedade Internacional da Encefalopatia Hepática e Metabolismo do Nitrogênio
- K⁺: íon potássio
- Kg: quilograma
- LCE: labirinto em cruz elevado
- mg: miligrama
- mm: milímetro
- MPO: mieloperoxidase
- Na⁺: íon sódio
- NaCl: cloreto de sódio
- NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NADH -: nicotinamida adenina dinucleótido hidreto
- NAG: N-acetil- β -D-glicosaminidase
- NGF: fator de crescimento neural
- NH₃: amônia
- nm: nanômetro
- °C: graus Célsius
- p.i.: pós indução
- pH: potencial hidrogeniônico
- PMNs: polimorfonucleares
- rpm: rotações por minuto
- s.c.: subcutâneo
- SEM: erro padrão da média
- SNC: sistema nervoso central

- TAA: tioacetamida
- TGF- β : fator de crescimento transformador beta
- TNF: fator de necrose tumoral
- TNF: Fator de necrose tumoral
- TNFR: receptor do fator de necrose tumoral
- TRO: teste de reconhecimento de objetos
- UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. História da Encefalopatia Hepática	19
2.2. Definição e Classificação da Encefalopatia Hepática	20
2.3. Epidemiologia da Encefalopatia Hepática.....	21
2.4. Alterações neurológicas em pacientes com Encefalopatia Hepática.....	22
2.5. Modelos experimentais de Encefalopatia Hepática.....	23
2.5.1. Tioacetamida.....	24
2.6. Fisiopatologia da Encefalopatia Hepática.....	25
2.6.1. Hiperamonemia.....	26
2.6.2. Neuroinflamação.....	27
2.6.3. Citocinas e quimiocinas.....	27
2.6.4. Astrócitos e micróglia.....	28
2.6.5. Fatores neurotróficos.....	30
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Objetivo geral	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. Animais.....	33
4.2. Indução da encefalopatia hepática.....	34
4.3. Avaliação do peso dos animais.....	34
4.4. Análise de parâmetros cognitivos e comportamentais.....	34
4.4.1. Avaliação da atividade locomotora por meio do teste de campo aberto.....	34
4.4.2. Avaliação do comportamento semelhante à ansiedade por meio do teste de labirinto em cruz elevado.....	35
4.4.3. Avaliação do comportamento semelhante à depressão por meio do teste de nado forçado.....	35
4.4.4. Avaliação da memória de curto e longo prazo por meio do teste de reconhecimento de objetos.....	36
4.5. Eutanásia e coleta de amostras.....	37

4.6. Ensaio para detecção dos níveis de Mieloperoxidase (MPO) E N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) no fígado e no encéfalo.....	37
4.6.1. Processamento do tecido hepático e cerebral para os ensaios de MPO e NAG.....	38
4.6.2. Dosagem da atividade da MPO.....	38
4.6.3. Dosagem da atividade da NAG.....	39
4.7. Depuração hepática do verde de indocianina.....	39
4.8. Estimativa de lesão hepatocelular pela mensuração de ALT.....	40
4.9. Análises histopatológica e imunoistoquímica.....	40
4.10. Avaliação dos níveis teciduais de citocinas/quimiocinas por <i>Cytometric Bead Array</i> – CBA.....	41
4.11. Determinação dos níveis teciduais dos fatores neurotróficos e da fraquitulina por ELISA.....	41
4.12. Análise estatística.....	42
5. RESULTADOS.....	43
5.1. Redução do peso corporal.....	43
5.2. Atividade locomotora reduzida no dia 1 p.i. e normalizada no dia 7 p.i. ...	44
5.3. Comportamento semelhante à ansiedade.....	45
5.4. Comportamento semelhante à depressão.....	46
5.5. Ausência de déficit de memória a curto e longo prazo.....	47
5.6. Lesão hepatocelular evidente 1 dia p.i.	48
5.7. Redução intensa da função hepática nos dias 1 e 3 p.i.	49
5.8. Maior taxa de migração de neutrófilos e macrófagos para o tecido hepático nos dias 1 e 3 p.i.	50
5.9. Lesões hepática e encefálica evidenciadas pela histopatologia.....	51
5.10. Alterações morfológicas dos astrócitos e da micróglia na encefalopatia hepática.....	53
5.11. Redução dos níveis teciduais das citocinas IFN-γ e IL-6	56
5.12. Redução das concentrações de BDNF no córtex cerebral	59
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÕES	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
9. ANEXOS	76

9.1. “Hepatic Encephalopathy: lessons from preclinical studies”	76
9.2. Protocolo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, número 393/2017	110

1. INTRODUÇÃO

A encefalopatia hepática (EH) é uma condição neuropsiquiátrica decorrente de doença hepática descompensada ou shunts portossistêmicos. A EH é caracterizada por amplo espectro de sinais e sintomas, desde déficits motores e cognitivos, alterações de personalidade, distúrbios do sono, podendo evoluir até coma e morte (VILSTRUP *et al.*, 2014). Esta doença gera comprometimento da qualidade de vida dos pacientes e em uma carga social e econômica significativa para os provedores de saúde (AGRAWAL; UMAPATHY; DHIMAN, 2015).

A EH é uma síndrome complexa, e sua fisiopatogenia, incluindo os mecanismos celulares e moleculares, ainda não foram completamente elucidados. Várias teorias têm sido propostas, dentre elas: disfunção de neurotransmissores, envolvimento de bactérias intestinais, estresse oxidativo e nitrosativo, sendo as da hiperamonemia e neuroinflamação as mais reconhecidas. A EH pode se desenvolver em condições nas quais substâncias potencialmente tóxicas, como a amônia (NH₃), não são metabolizadas pelo fígado (BLEI *et al.*, 2002). A hiperamonemia pode promover alterações na atividade neuronal, ocasionando dessincronização das redes neuronais.

Outro fator destacado na patogênese da doença é a elevação de citocinas pró-inflamatórias no sangue durante a falência hepática aguda (FHA) (JIANG, WENLEI; DESJARDINS; BUTTERWORTH, 2009). Sabe-se que as citocinas pró-inflamatórias podem atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), contribuindo assim para a inflamação no sistema nervoso central (SNC) (COLTART; TRANAH; SHAWCROSS, 2013). A neuroinflamação está associada ao desenvolvimento de déficits cognitivos e motores na encefalopatia hepática mínima (EHM) e evidente após insuficiência hepática crônica. Esta hipótese foi apoiada por estudos utilizando modelos experimentais de EH (YIRMIYA; GOSHEN, 2011; TENORIO-LARANGA *et al.*, 2015). Além disso, déficits neurocomportamentais após EH foram maiores em pacientes cirróticos com níveis aumentados de proteína C-reativa e IL-6, sugerindo que a inflamação sistêmica pode ser um fator crítico no desenvolvimento de EH (SHAWCROSS, D L *et al.*, 2007).

Os fatores neurotróficos têm sido extensivamente estudados em doenças neurodegenerativas como Doença de Alzheimer e depressão (BUDNI *et al.*, 2015). O

fator neurotrófico induzido pelo cérebro (BDNF) é uma neurotrofina responsável pela sobrevivência, diferenciação e crescimento dos neurônios centrais e periféricos durante o desenvolvimento e na vida adulta. É bem compreendido que o BDNF é também central para a potenciação, aprendizagem e memória de longo prazo (ZHANG *et al.*, 2016).

Nosso grupo de pesquisa descreveu previamente alterações significativas no estado neuropsiquiátrico, comportamento motor e função reflexa e sensorial associadas ao aumento na liberação de glutamato no córtex cerebral dos camundongos com EH. Neste estudo, os camundongos C57BL/6, machos induzidos apresentaram taxa de mortalidade de cerca de 40%. Após 48 horas, os animais apresentavam tendência à melhora e sobrevivência (MIRANDA *et al.*, 2010). No entanto, os trabalhos avaliando as sequelas neurológicas após o desenvolvimento da EH assim como as alterações patológicas, inflamatórias e neuroquímicas em fases mais tardias da doença são escassos. Acredita-se que a validação de modelos experimentais e a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da EH possibilitem o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para a doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. História da Encefalopatia Hepática

A associação entre doença hepática e distúrbios do humor foi reconhecida por Hipócrates (460-371 a.C), que descreveu a conexão entre a icterícia e distúrbios comportamentais agudos, sendo provável que, junto a seus discípulos, tenha observado quadros de encefalopatia associados à insuficiência hepática grave. Por cerca de 2000 anos a principal evidência foi a associação entre icterícia, febre e delírio. Apenas no século XVIII houve descrição de disfunção mental decorrente de cirrose hepática por Giovanni Battista Morgagni, professor italiano de medicina, que descreveu um caso de EH com o relato da história de um nobre de Veneza, abusador de álcool no passado, que desenvolveu ascite, episódios de agitação, sonolência prolongada e delírios. Quando veio a óbito, sua autópsia revelou a existência de cirrose hepática (AMODIO, 2015).

Avanços no estudo da EH ocorreram através dos estudos de Hann e seus colaboradores (1893), que demonstraram que cães submetidos à cirurgia de *shunt* portacaval experimental desenvolveram mudanças comportamentais dentro de 10 a 40 dias após o procedimento, incluindo irritabilidade, ataxia, convulsões e coma. Os animais demonstraram piora dos sintomas após ingestão de carne, mas não de pão ou leite, auxiliando na compreensão da associação entre o fígado e o cérebro.

Nos anos 30, van Coukert e seus colaboradores reportaram a capacidade da amônia de induzir coma ou estupor em pacientes cirróticos e demonstraram que a carga de NH₃ oral capaz de produzir coma, não era constante. O mesmo paciente poderia ou não entrar em estado comatoso com a mesma carga de NH₃, deixando clara a existência de outros fatores associados à NH₃ no desenvolvimento do coma. S. Sherlock avançou com a descrição do quadro clínico, fisiopatologia e tratamento da EH nos anos 50, criou o termo “encefalopatia sistêmica portal”, além de confirmar o papel relevante da hiperamonemia na fisiopatologia da doença (SHERLOCK, 1956).

Em 1957, o termo “encefalopatia hepática” foi criado por Fazekas e colaboradores. Em 1978 Ridders relatou a “encefalopatia hepática latente”, na qual, apesar da ausência de sintomatologia evidente, os pacientes apresentavam déficit cognitivo e alterações no exame psicométrico e eletroencefalograma. Apenas em 1998, H. Schomerus e W. Hamster criaram o termo “encefalopatia hepática mínima” (EHM), uma vez que o termo “subclínica” poderia produzir a falsa ideia de falta de implicação clínica dessa condição (WEISSENBORN *et al.*, 2001).

2.2. Definição e Classificação da encefalopatia hepática

A EH é definida como uma síndrome neuropsiquiátrica, potencialmente reversível, que ocorre em pacientes com doença hepática aguda ou crônica (BUTTERWORTH *et al.*, 2009). Clinicamente, a EH é caracterizada por amplo espectro de sinais e sintomas, desde discreto prejuízo do sono, déficits cognitivos, níveis alterados de consciência até coma e morte (VILSTRUP *et al.*, 2014).

Segundo as diretrizes da Associação Americana para Estudo de Doenças do Fígado (AASLD), a EH deve ser classificada como tipo A, B ou C, de acordo com a doença subjacente. O tipo A é resultante de uma insuficiência hepática aguda (IHA), o tipo B de

um desvio portossistêmico sem doença hepática intrínseca e o tipo C (crônico) é devido à falência hepática crônica (FHC) (VILSTRUP *et al.*, 2014).

Tabela – Classificação da encefalopatia hepática de acordo com nomenclatura estabelecida no 11º Congresso Mundial de Gastroenterologia, Viena e critérios de West Haven para classificação de acordo com a gravidade

ETIOLOGIA	Tipo A	Falência Hepática Aguda
	Tipo B	<i>Shunt</i> portossistêmico
	Tipo C	Falência Hepática Crônica
SEVERIDADE	EHM	
	Grau I	Falta trivial de consciência; euforia ou ansiedade; déficit de atenção
	Grau II	Letargia ou apatia; alteração de personalidade; comportamento inapropriado
	Grau III	Sonolência a semi-estupor; confusão; desorientação intensa
	Grau IV	Coma
CURSO	Episódica Recorrente Persistente	
FATOR DESENCADEANTE	Precipitada Espontânea	

2.3. Epidemiologia da encefalopatia hepática

A FHC, ou cirrose, é a etiologia mais comum de EH e está entre as dez causas de morte mais prevalentes na América Latina (MOSCOL; SANCHEZ 2011). Sua evolução é lenta, ocorrendo ao longo de meses, e podendo apresentar períodos de exacerbação, levando à perda da qualidade de vida e da capacidade laborativa do paciente (VAQUERO; CHUNG; BLEI, 2003) Cerca de 80% dos pacientes com FHC apresentarão uma forma menos grave de EH, conhecida como encefalopatia hepática mínima (EHM), caracterizada por discreto comprometimento cognitivo, déficit de atenção e redução da coordenação psicomotora. A EHM é detectada apenas pela aplicação de testes psicométricos ou neurofisiológicos e é considerada um importante fator preditivo para o desenvolvimento de EH, uma vez que cerca de 30 a 40% dos pacientes cirróticos evoluem para essa condição (ORTIZ; JACAS; CÓRDOBA, 2005).

A falência hepática aguda (FHA) tem baixa incidência (cerca de 2.000 pessoas por ano nos EUA e na Europa), no entanto, apresenta alta mortalidade, devido à rápida progressão para EH, desencadeando edema cerebral, aumento da pressão intracraniana e herniação cerebral (TAYLOR *et al.*, 2013). Sua etiologia é variável, tendo como causas mais frequentes as hepatites virais nos países em desenvolvimento, e a hepatite medicamentosa nos países desenvolvidos (ICHAI; SAMUEL, 2011).

A EH frequentemente afeta a qualidade de vida, as estratégias de manejo clínico, a prioridade de transplante hepático e a sobrevida do paciente (STEPANOVA *et al.*, 2012). Trata-se de uma desordem de grande importância clínica e socioeconômica, uma vez que prejudica a rotina diária do paciente, levando a dificuldade de aprendizado, comprometendo sua capacidade de dirigir e trabalhar, e levando a maiores gastos pelo sistema de saúde e redução de mão de obra (AGRAWAL; UMAPATHY; DHIMAN, 2015). O risco de mortalidade tem sido frequentemente associado com graus mais intensos de EH, e sua incidência é maior em pacientes com infecções recorrentes (YUAN *et al.*, 2018)(WONG; GISH; AHMED, 2014).

Não há estudos epidemiológicos a respeito da prevalência da EH no Brasil, no entanto sabe-se que as doenças hepáticas são importantes causas de mortalidade. Em 2016, foram registrados 26.879 óbitos no Brasil decorrentes de doenças do fígado, segundo o DATASUS.

Nos Estados Unidos, pacientes com EH são responsáveis por cerca de 110.000 hospitalizações por ano (2005-2009), gerando encargos de cerca de bilhões de dólares aos sistemas de saúde em 2003 (STEPANOVA *et al.*, 2012).

2.4. Alterações neurológicas em pacientes com EH

Pacientes que apresentam EH podem apresentar alterações comportamentais, neuropsiquiátricas e neuromusculares (MÉNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2015).

O quadro clínico da EH é caracterizado por um amplo espectro de manifestações neurológicas e psiquiátricas não específicas. Os distúrbios do sono, como a sonolência diurna e a alternância do ritmo sono-vigília, estão entre os primeiros sintomas a aparecer (MONTAGNESE *et al.*, 2017). Comportamentos inadequados e mudanças de personalidade podem ser mais frequentes do que aqueles encontrados em condições psiquiátricas. A presença de asteríxis (ou "tremor de flapping") pode estar presente, não

sendo, porém, sintoma patognomônico da doença hepática. Outros sintomas neurológicos podem ser episódios raros de epilepsia transitória (DELANTY *et al.*, 2001), anormalidades motoras, como bradicinesia e tremor (em 4% dos casos de cirrose), podendo evoluir para tônus, rigidez, opistótono e coma (TRYC *et al.*, 2013). A EHM é um distúrbio de funções cognitivas, muitas vezes não evidente ou reconhecível, mas amplamente presente, em até 80% dos pacientes cirróticos. Os pacientes apresentam alterações nos testes psicométricos, déficit de atenção e orientação, redução da qualidade de vida, diminuição de produtividade no trabalho, redução da capacidade de condução, memória e aprendizado (BAJAJ, 2008).

2.5. Modelos experimentais de encefalopatia hepática

Para o melhor entendimento da fisiopatologia da EH e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, são utilizadas várias espécies de animais, incluindo cães, caprinos, suínos, coelhos, porquinhos da índia, e, mais frequentemente, ratos e camundongos (BUTTERWORTH *et al.*, 2009).

Membros da Sociedade Internacional da Encefalopatia Hepática e Metabolismo do Nitrogênio (ISHEN) estabeleceram em 2008, diretrizes para os modelos animais de EH. Devido à variedade de fatores que influenciam no desenvolvimento dos sinais neurológicos e à variedade de etiologias que levam à disfunção hepática, a reprodução da EH é considerada difícil em animais, e nenhum modelo experimental reproduz fielmente todos os aspectos da EH. No entanto, a disponibilidade de modelos experimentais é de suma importância para o desenvolvimento de terapias e compreensão da fisiopatologia da doença, uma vez que o ambiente *in vivo* não é fielmente reproduzido *in vitro* (BUTTERWORTH *et al.*, 2009).

Modelos animais de EH são estabelecidos através de vários métodos, incluindo administração de hepatotoxinas e procedimentos cirúrgicos. Administração de substâncias hepatotóxicas induz hepatites graves ou falência hepática aguda e, conseqüentemente, EH tipo A (ZIMMERMAN *et al.*, 1989). *Shunt* portocaval causa sintomatologia de EH sem a indução de lesão hepática intrínseca, levando à EH tipo B (WATANABE *et al.*, 1997). Ligação do ducto biliar induz obstrução do fluxo biliar, levando à cirrose e EH tipo C (JOVER *et al.*, 2006).

Em relação às espécies utilizadas, animais de grande porte apresentam a vantagem de facilidade de exame neurológico e de obtenção de amostras biológicas, como sangue, líquido e biópsias, mas são pouco utilizados devido a entraves éticos e custos de

obtenção e manutenção dos mesmos. As espécies mais utilizadas no estudo da EH são ratos e camundongos, uma vez que o custo para adquirir e manter esses animais é muito menor, além de já apresentarem literatura bem estabelecida sobre anatomia, patologia, genoma e comportamento, e facilidade de obtenção de anticorpos dessas espécies (BUTTERWORTH *et al.*, 2009). Ainda não há um modelo animal ideal para reprodução da falência hepática causada por etanol ou vírus, etiologias frequentes de EH no homem.

No intuito de estudar os modelos animais rotineiramente utilizados para reprodução e pesquisa da EH, o grupo de pesquisa redigiu o manuscrito intitulado “**Hepatic Encephalopathy: lessons from preclinical studies**” (ANEXO I), aceito para publicação pelo *World Journal of Hepatology*.

2.5.1. Tioacetamida

A Tioacetamida (CH_3CSNH_2) (TAA) foi utilizada até os anos 40 como fungicida em plantações de laranja, quando foi descoberto que sua administração crônica poderia levar à cirrose e carcinoma hepatocelular. A TAA reduz a atividade antioxidante e aumenta a peroxidação lipídica no fígado, levando ao estresse oxidativo e necrose celular (HAJOVSKY *et al.*, 2012). Tem sido amplamente utilizada como modelo de IHA em ratos e camundongos, produzindo encefalopatia, acidose metabólica, elevação de transaminases, coagulopatias e necrose centrolobular. Esse modelo apresenta boa reprodutibilidade e alterações cerebrais e hepáticas bem descritas (BRUCK *et al.*, 1998) (ZIMMERMAN *et al.*, 1989). As principais formas de administração de TAA são por via oral, em água de beber ou gavagem, e injeção subcutânea ou intraperitoneal (FONTANA *et al.*, 1996).

Nosso grupo de pesquisa estabeleceu previamente um modelo de EH utilizando camundongos da linhagem C57BL/6, através de injeção intraperitoneal em dose única de 600mg/kg, dissolvido em salina, causando alteração do estado neuropsiquiátrico, atividade motora, função reflexa e sensorial, necrose hepática e elevação de glutamato em tecido cerebral. O modelo apresentou taxa de mortalidade de 30-40% até 48 horas pós-indução. Após esse período, os animais apresentavam tendência à melhora, evidenciando a reversibilidade do modelo (MIRANDA *et al.*, 2010).

2.6. Fisiopatologia da encefalopatia hepática

Em seu processo fisiopatológico, a EH desenvolve-se por distúrbios bioquímicos com elevação dos níveis séricos de NH_3 , pela resposta neuroinflamatória com aumento de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo e edema cerebral. Além disso, a liberação de glutamato em grandes quantidades pode levar à morte da célula neuronal e neurodegeneração.

A EH é uma síndrome complexa, e sua fisiopatogenia, incluindo os mecanismos celular e molecular, ainda não foram completamente elucidados. Existem várias teorias propostas para sua explicação, dentre elas: disfunção de neurotransmissores, envolvimento de bactérias intestinais, estresse oxidativo e nitrosativo, dentre outras (Figura 1).

As teorias da hiperamonemia e neuroinflamação são as mais reconhecidas e, portanto, serão abordadas.

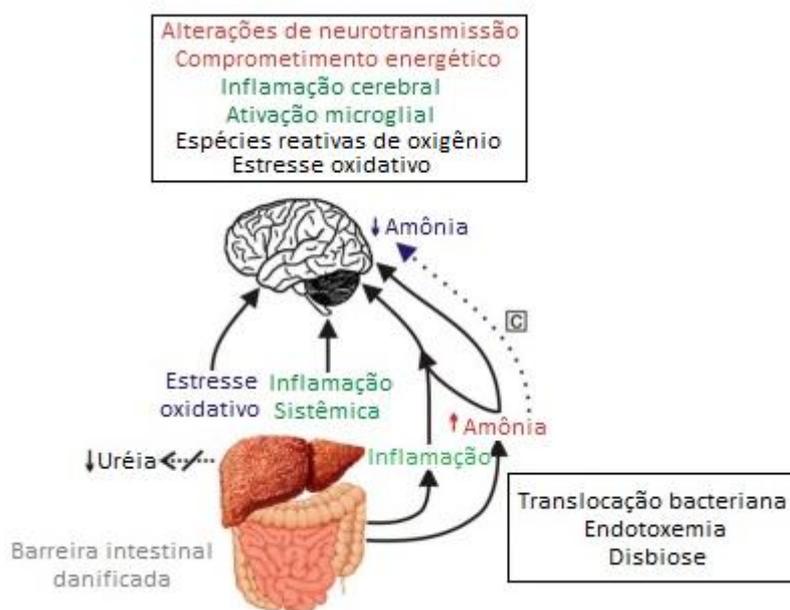


Figura 1. Fatores contribuintes para a patogênese da EH, com ênfase nos efeitos sistêmicos da amônia e inflamação decorrente da falência hepática. Fonte: Hadjihambi, A, 2018 (adaptado).

O comprometimento da função hepática leva à não metabolização da amônia em uréia, pelo fígado, causando acúmulo de NH_3 circulante. A elevação dessa substância com potencial tóxico leva à inflamação sistêmica e estresse oxidativo, comprometendo as funções do organismo como um todo.

A EH ocorre devido à combinação de uma série de mecanismos fisiopatológicos, como inflamação (JIANG, YING *et al.*, 2015), estresse oxidativo (CAULI *et al.*, 2009), neurotoxinas, dentre outros. Essas alterações se devem, principalmente, à incapacidade

de metabolização do fígado lesado, levando ao acúmulo de neurotoxinas no cérebro, afetando a neurotransmissão e produzindo alterações celulares, que afetam principalmente astrócitos (MÉNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2015). É importante salientar que o dano celular cerebral não é apenas uma consequência do desenvolvimento de EH, mas também um fator contribuinte (HADJIHAMBI *et al.*, 2018).

2.6.1. Hiperamonemia

Níveis elevados de NH_3 no sangue e cérebro estão intensamente relacionados à patogênese da EH (FELIPO; BUTTERWORTH, 2002). A hiperamonemia decorrente da insuficiência hepática resulta em grave disfunção do SNC, podendo levar a edema cerebral, convulsões e coma. (GOMIDES *et al.*, 2014).

A NH_3 resultante da metabolização de compostos nitrogenados pela flora intestinal é, em condições fisiológicas, metabolizada pelo fígado, através do ciclo da uréia, levando à formação de uréia, que passa por excreção renal. Alterações hepáticas como FHA, FHC ou desvios portossistêmicos, prejudicam a função de metabolização do fígado, levando ao aumento dos níveis séricos de NH_3 .

Com a elevação dos níveis de NH_3 no sangue, a molécula cruza a BHE e passa a ser metabolizada no SNC, como uma via alternativa (SHAWCROSS, DEBBIE L. *et al.*, 2010). Por ser uma substância potencialmente tóxica, em um cenário de hiperamonemia, o cérebro se torna responsável pela neutralização de NH_3 . No cérebro, para sua neutralização, a amônia necessita se incorporar à glutamina, pela ação da enzima glutamina sintetase, presente em astrócitos, levando essas células ao edema citotóxico devido ao aumento da entrada de água por estresse osmótico (HÄUSSINGER; SCHLISS, 2008).

Apesar das evidências do papel central da amônia na fisiopatologia da EH, na rotina clínica, não é observada uma correlação consistente entre sua concentração no sangue e a manifestação dos sinais de EH (SHAWCROSS, DEBBIE L. *et al.*, 2010). Curiosamente, níveis elevados de NH_3 podem ser observados em pacientes assintomáticos e a concentração de NH_3 não é sempre consistente com a gravidade da EH em pacientes cirróticos (PANIS; MCMULLAN; EMOND, 1997). Além disso,

agentes terapêuticos utilizados na redução da hiperamonemia, como L-ornitina e lactulose, demonstram pouca eficácia na prevenção de EH na IHA e IHC, sugerindo a existência de outros fatores associados à NH₃ no desenvolvimento da EH.

A amônia, por si só, é capaz de induzir ativação de micróglia e astrócitos, levando ao aumento de expressão de citocinas inflamatórias como IL-1 β e IL-6. Esse achado sugere que a hiperamonemia pode desencadear a neuroinflamação na EH de modo sinérgico. No entanto, ainda faltam evidências para ligar os dois mecanismos (HERNANDEZ-RABAZA *et al.*, 2016):

2.6.2. Neuroinflamação

A neuroinflamação é um importante componente no desenvolvimento da EH, assim como a hiperamonemia (JAYAKUMAR; RAMA RAO; NORENBURG, 2015). Estudos recentes têm demonstrado importante papel da inflamação na fisiopatologia da EH aguda e crônica (COLTART; TRANAH; SHAWCROSS, 2013).

Evidências clínicas e experimentais da ativação da micróglia, células residentes no SNC, com função imunológica, em resposta à FHA e FHC dão suporte à teoria da neuroinflamação (BÉLANGER; CÔTÉ; BUTTERWORTH, 2006) (ZEMTSOVA *et al.*, 2011)(JIANG, WENLEI; DESJARDINS; BUTTERWORTH, 2009).

A ativação microglial é frequentemente associada com o aumento da liberação de citocinas e quimiocinas, também relacionadas com a patogênese de doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (RODRÍGUEZ; VERKHRATSKY, 2011)(BLANK; PRINZ, 2013). Estratégias anti-inflamatórias atenuaram déficits cognitivos e atividade motora alterada (HU *et al.*, 1996), dando suporte ao envolvimento na neuroinflamação na fisiopatologia da EH (HERNANDEZ-RABAZA *et al.*, 2015)(HERNANDEZ-RABAZA *et al.*, 2015)(MCMILLIN *et al.*, 2014).

2.6.3. Citocinas e quimiocinas

Citocinas são polipeptídeos, geralmente associados com inflamação, ativação do sistema imune, diferenciação e morte celular. Incluem interleucinas (IL), Interferons (IFN), fator de necrose tumoral (TNF), quimiocinas e fatores de crescimento. Em sua maioria, não possuem ação sobre tecidos saudáveis, mas respondem rapidamente à

lesão, infecção ou inflamação dos mesmos, agindo como mensageiros intercelulares e direcionando o recrutamento de células com perfil pró ou anti-inflamatório. Além das células imunes e da glia, neurônios, células endoteliais e plaquetas também produzem essas glicoproteínas. Em geral, citocinas pró-inflamatórias clássicas (TNF e IL-12) possuem potencial neurotóxico e citocinas anti-inflamatórias (IL-10), neuroprotetor (ALLAN; ROTHWELL, 2003).

IL-6 é uma citocina pleiotrópica, potente indutora de inflamação local e sistêmica quando envolvida em resposta de fase aguda, mas pode exercer papel anti-inflamatório. IL-6 possui papel na regulação do sono (HOGAN *et al.*, 2003)(GRUOL, 2015) e suas concentrações variam durante o dia e noite em cérebros de roedores (GUAN *et al.*, 2005) e seres humanos (REDWINE *et al.*, 2000). Pacientes cirróticos com EH podem apresentar graves distúrbios do sono e elevação de IL-6 no sangue periférico (MONTAGNESE *et al.*, 2013).

IFN- γ é considerada uma citocina pró-inflamatória e seus níveis se mostraram inalterados nos cérebros de pacientes cirróticos analisados. Um estudo recente mostrou ativação e proliferação microglial e elevação dos níveis de IL-6, e níveis inalterados de IL-4, IL-10 e IFN- γ em amostras cerebrais *post mortem* de quatro pessoas de um grupo de nove pacientes cirróticos (DENNIS *et al.*, 2014). A importância desse achado ainda é controversa, uma vez que IL-6 está envolvida em diversos processos fisiológicos no encéfalo e possui caráter pró-inflamatório ou anti-inflamatório, dependendo do padrão de citocinas presentes (GRUOL, 2015)(ROTHAUG; BECKER-PAULY; ROSE-JOHN, 2016).

A fraquitulina (CX3CL1) é superexpressa por neurônios e células endoteliais no SNC e parece estar envolvida na sinalização neurônio-micróglia, sendo importante na ativação de células microgliais. A sinalização ativada pela CX3CL1 com o seu receptor CX3CR1 presente na micróglia tem sido associada à modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias e da neurogênese (LIMATOLA; RANSOHOFF, 2014).

2.6.4. Astrócitos e Micróglia

A morte neuronal tem sido descrita na falência hepática (BÉLANGER; CÔTÉ; BUTTERWORTH, 2006). No entanto, sua prevalência e gravidade são consideradas

insuficientes para justificar a variedade de sintomas característicos da EH (BUTTERWORTH, 2010).

A EH é caracterizada neuropatologicamente por edema astrocitário, ativação microglial e proliferação de astrócitos Alzheimer tipo II (BUTTERWORTH, 2010). O astrócito é o tipo celular mais abundante no SNC e tem como função a sustentação do tecido nervoso e a nutrição neuronal, através da formação de pontes entre células endoteliais e corpos neuronais, por onde passam os nutrientes do sangue. Esse tipo celular também é importante para a remoção do excesso de glutamato, substância com potencial excitotóxico, das fendas sinápticas (BLANK; PRINZ, 2013). Os astrócitos são as células mais afetadas pela hiperamonemia no SNC, parcialmente devido a sua proximidade com os vasos sanguíneos (NORENBERG; RAMA RAO; JAYAKUMAR, 2009). Em resposta à exposição à amônia, essas células apresentam mudanças morfológicas, como edema citotóxico, levando ao edema cerebral (SEYAN *et al.*, 2010). Astrócitos Alzheimer tipo II apresentam núcleo pálido e nucléolo evidente e o número de astrócitos evidenciando essa alteração fenotípica pode ser correlacionado à severidade da encefalopatia (CALVARUSO *et al.*, 2007).

Os astrócitos liberam TNF- α , com consequente liberação de glutamato e concomitante ativação da micróglia. A ativação microglial é normalmente seguida de proliferação e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 β e IL-6, podendo levar a morte neuronal (HADJIHAMBI *et al.*, 2018).

A micróglia corresponde a cerca de 20% do total de células da glia e é a principal fonte de síntese de citocinas pró-inflamatórias no encéfalo. Seu papel na patogênese da EH ainda não é totalmente compreendido, mas torna-se ativada no SNC de modelos experimentais para insuficiência hepática aguda e crônica (KIM; JOH, 2006).

Em situações fisiológicas, apresenta morfologia ramificada e estado quiescente, mantendo a homeostase, vigilância imunológica, desativação de neurotransmissores e produção de fatores de crescimento. Em situações patológicas que afetem o SNC, como na EH, essa célula é ativada e assume morfologia amebóide, apresentando atividade fagocítica (HERNÁNDEZ-RABAZA *et al.*, 2016)(MCMILLIN *et al.*, 2014).

Após sua ativação, a micróglia produz diretamente e induz o aumento dos níveis de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, citocinas, quimiocinas e metaloproteínas, promovendo remoção dos debris celulares e facilitando a plasticidade neuronal, mas

levando também à expansão da lesão tecidual, devido a sua atividade pró-inflamatória (SONG; ZHANG; DONG, 2013). A ativação da micróglia foi demonstrada em infecções no SNC e em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer (SARLUS *et al.*, 2017).

A inflamação, em associação com a hiperamonemia, exerce importante papel na patogênese da EH. A aplicação de NH₃ a culturas celulares de astrócitos leva a edema astrocitário e cerebral através de sistemas de sinalização inflamatória (NF-kB, PLA2, NOS, NOX, COX2). Além disso, a amônia ativa a micróglia e estimula as células endoteliais do cérebro; alguns desses eventos também ocorrem em animais experimentais e em humanos com HE. As conseqüências dessa resposta inflamatória (síntese e liberação de fatores inflamatórios da micróglia ativada e células endoteliais), juntamente com a hiperamonemia, levam ao edema cerebral na encefalopatia hepática aguda. A presença de inflamação central e periférica também contribui para as anormalidades comportamentais observadas na HE crônica (ZEMTSOVA *et al.*, 2011).

2.6.5. Fatores Neurotróficos

Fatores neurotróficos são proteínas endógenas solúveis, que regulam sobrevivência, crescimento e plasticidade neuronais. Essas proteínas participam de várias funções celulares através da ativação de receptores, incluindo a expressão dos genes envolvidos na regulação da neuroplasticidade e saúde celular (SCHMIDT *et al.*, 2008)

Dentre as várias neurotrofinas, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) tem sido extensivamente estudado em doenças neurodegenerativas, como na Doença de Alzheimer, e na depressão (BUDNI *et al.*, 2015). A hipótese neurotrófica da depressão é baseada na redução da quantidade ou expressão de BDNF cerebral, principalmente no sistema límbico desses pacientes (DUMAN; LI, 2012). Neuroinflamação aguda ou lesão cerebral desencadeia ativação astrocitária e elevação da expressão de BDNF. Condições crônicas ou subagudas elevam a expressão de TNF e reduzem a de BDNF, promovendo neurodegeneração (SONG; ZHANG; DONG, 2013).

O fator neurotrófico derivado da linhagem de célula glial (GDNF) promove desenvolvimento, diferenciação e proteção das células do SNC e também possui papel relevante em doenças neuropsiquiátricas. Vários estudos mensurando o nível de GDNF em pacientes com depressão demonstraram resultados inconsistentes (LIN; TSENG,

2015). O fator de crescimento neural (NGF) foi a primeira neurotrofina identificada responsável por exercer papel na sobrevivência e função de neurônios sensoriais e simpáticos no sistema nervoso periférico (SNP) e neurônios colinérgicos do prosencéfalo no SNC (BUDNI *et al.*, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os déficits neurológicos associados às alterações patológicas, inflamatórias e neuroquímicas na encefalopatia hepática experimental.

3.2. Objetivos específicos

Nos animais controle e induzidos (TAA):

1. Avaliar os parâmetros comportamentais no modelo murino de EH;
2. Analisar alterações histopatológicas no encéfalo e no fígado;
3. Detectar os níveis hepáticos da alanina aminotransferase (ALT) e de depuração hepática do verde de indocianina (ICG);
4. Mensurar a atividade dos neutrófilos e dos macrófagos no fígado e no encéfalo;
5. Caracterizar alterações morfológicas dos astrócitos e da micróglia nas diferentes regiões do encéfalo;
6. Quantificar os níveis teciduais das citocinas TNF, IL-10, IFN-g, IL12p70, IL-6 e CCL2 e dos fatores neurotróficos BDNF, NGF e BDNF em diferentes regiões anatômicas do encéfalo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, entre oito e 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 sob condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com água e ração *ad libitum*. Os camundongos foram separados aleatoriamente em dois grupos: o grupo controle e o grupo EH induzida por injeção intraperitoneal de TAA. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob o número de protocolo 393/2017 (ANEXO II). A figura 2 resume o delineamento experimental realizado no presente estudo.

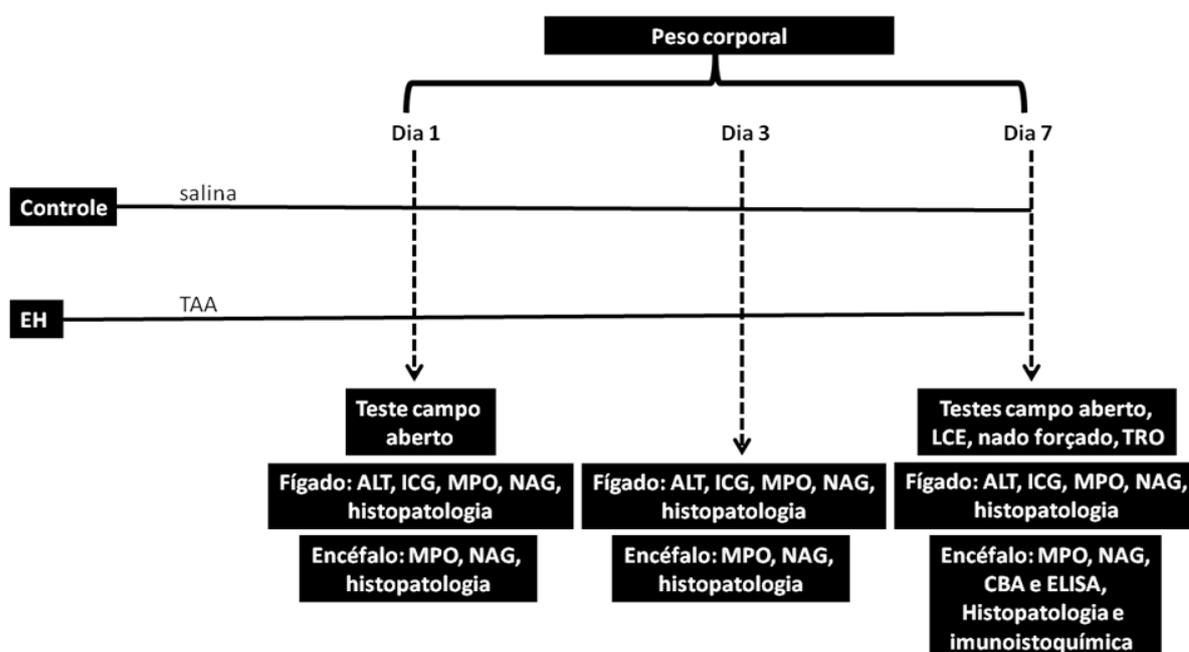


Figura 2: Delineamento experimental para os grupos controle e TAA.

Número de animais por grupo:

Teste de campo aberto: controle: 6; TAA: 9

ALT: controle: 8; TAA 1d: 4; TAA 3d: 5; TAA 7d: 10

ICG: controle: 5; TAA 1d: 5; TAA 3d: 5; TAA 7d: 5

NAG e MPO: controle: 5; TAA 1d: 7, TAA 3d: 7, TAA 7d: 10

Histopatologia: controle: 6; TAA 1d: 6; TAA 3d: 6; TAA 7d: 10

LCE: controle: 5; TAA 7d: 10

Nado forçado: controle: 6; TAA 7d: 9

TRO: controle: 10; TAA: 10

ELISA: controle: 6; TAA 7d: 7

CBA: controle: 8; TAA 7d: 8

Imunohistoquímica: controle: 5; TAA 7d: 10

4.2. Indução da encefalopatia hepática

O modelo utilizado para indução de EH foi o de falência hepática aguda, induzida por Tioacetamida (TAA, CH_3CSNH_2 , Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA), previamente estabelecido por MIRANDA *et al.*, 2010. Camundongos do grupo TAA receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de TAA na dose única de 600mg/kg, diluída em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% (NaCl 0,9%) na concentração de 40mg/mL. Os animais do grupo controle receberam injeção intraperitoneal de solução fisiológica NaCl 0,9% no volume proporcional. Foram utilizados camundongos fêmeas, devido à maior taxa de sobrevivência desses animais.

Ambos os grupos de animais receberam injeção subcutânea (s.c.) de 500 μ L de soro glicosado 5% para evitar desidratação e hipoglicemia, e foram mantidos sobre manta térmica durante 30 minutos, para evitar hipotermia. Após a indução, os animais foram realocados nas gaiolas e mantidos durante 1, 3 e 7 dias sob as mesmas condições anteriores de temperatura e luminosidade e livre acesso à água e ração.

4.3. Avaliação do peso dos animais

Os animais foram pesados antes do procedimento de indução da EH e posteriormente todos os dias no mesmo horário, até o sétimo dia pós-indução.

4.4. Análise de parâmetros cognitivos e comportamentais

4.4.1. Avaliação da atividade locomotora por meio do teste de campo aberto

O teste de Campo Aberto, também conhecido como Open Field foi desenvolvido para avaliação da atividade locomotora e exploratória e do nível de ansiedade em roedores (HALL & BALACHEY 1932), e foi realizado 24 horas e 7 dias após a indução da EH. Foi utilizado o aparelho PhenoTyper®, que consiste em uma caixa com base quadrada branca e paredes de acrílico transparente. O teste foi realizado em uma sala vazia e silenciosa e foi utilizado papel Kraft para revestir externamente as paredes da caixa para evitar interferências com o meio externo. Os camundongos foram posicionados, individualmente no centro da arena onde se moveram livre e espontaneamente durante dez minutos. A arena foi higienizada com álcool 70% e seca

com papel toalha no intervalo de cada sessão de exploração. Foram analisadas a distância total percorrida e a porcentagem de permanência no centro da arena durante a exploração através do software EthoVision®.

4.4.2. Avaliação do comportamento semelhante à ansiedade por meio do teste de labirinto em cruz elevado

Para avaliação do comportamento semelhante à ansiedade, foi realizado no sétimo dia o teste do labirinto em cruz elevado (LCE), que é um teste de ansiedade não condicionada, e se baseia no antagonismo entre o comportamento exploratório espontâneo do animal e sua aversão inata a elementos ansiogênicos como elevação e uma área aberta desconhecida. O labirinto em cruz elevado (LCE) (Insight® SP, Brasil) possui dois braços abertos e dois fechados, dispostos em direções opostas, formando uma cruz, que emergem de uma plataforma central, que apresenta uma elevação da base. O teste de LCE foi conduzido como descrito por (WALF; FRYE, 2007). Cada camundongo foi colocado individualmente no centro da plataforma com a cabeça direcionada para um braço aberto. O animal percorreu livremente o labirinto por cinco minutos. Foi considerada entrada no braço quando o camundongo colocou as quatro patas no mesmo, caso contrário, a localização foi considerada no centro do labirinto. Foram analisadas as entradas nos braços abertos e fechados e o tempo gasto nos mesmos. A medida da ansiedade foi apresentada pelo número de entradas e pela porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, sendo que baixas porcentagens na região aberta indicam maiores níveis de ansiedade (DE MIRANDA *et al.*, 2011). Entre cada teste, o labirinto foi limpo com álcool 70% e seco com papel toalha.

4.4.3. Avaliação do comportamento semelhante à depressão por meio do teste de nado forçado

O teste do nado forçado foi primeiramente proposto para ratos e então adaptado para camundongos (DELALANDE, 1978) e consiste em colocar o animal em um tanque cilíndrico contendo água limpa a 25°C e a uma profundidade que o animal não consiga tocar o fundo do tanque com a cauda.

Camundongos forçados a nadar em um espaço restrito do qual não podem escapar, após um período inicial de atividade vigorosa, adotam uma postura imóvel e permanecem flutuando passivamente, realizando os movimentos necessários apenas para manter suas

cabeças acima da água (DELALANDE, 1978). Uma frequência elevada dessa imobilidade é característica de um estado depressivo. Cada animal permaneceu por 6 min em um béquer de vidro de 5 litros com água. Após o término do teste, cada animal foi seco com uma toalha e mantido por 30 minutos sobre manta térmica, para evitar hipotermia. Entre cada teste a água do cilindro foi substituída por água limpa. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera posicionada a 20 cm da borda do cilindro para que os registros fossem analisados posteriormente. Foram analisados os comportamentos de imobilidade: ausência de movimentos bruscos, realizando movimentos necessários apenas para manter a cabeça acima da água; nado: movimentos horizontais do animal pelo tanque, movimentando as patas vigorosamente; e *climbing*: impulso vertical do animal, geralmente apoiando-se nas paredes do tanque, realizando movimentos de escalada.

4.4.4. Avaliação da memória de curto e longo prazo por meio do teste de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos (TRO) foi realizado para avaliação da memória de curto e longo prazo no sétimo dia pós-indução (p.i.). Durante o período de adaptação, no quinto dia p.i., os animais tiveram a oportunidade de explorar a arena por 10 minutos. No dia seguinte, sexto dia p.i., uma sessão de treinamento foi conduzida, individualmente, durante 10 minutos. Dois objetos idênticos foram posicionados em cantos adjacentes a 8cm das paredes. Durante o teste de memória de curta duração, 1,5 horas após o treino (6º dia p.i.), os camundongos exploraram a arena por 5 minutos, na presença do objeto familiar (A) e do novo objeto (B). Os objetos eram distintos em cor e formato, mas feitos do mesmo material (gesso). 24 horas após o treino, foi realizado novo teste para avaliação da memória de longo prazo, no qual o novo objeto foi novamente substituído por outro de formato e cor diferentes, e os animais exploraram a arena novamente por 5 minutos. A arena foi higienizada com álcool 70% e seca com papel toalha no intervalo de cada sessão de exploração. A preferência exploratória foi definida pela porcentagem do tempo total de exploração gasto pelo animal na investigação do objeto familiar (A) ou do novo objeto (B) e foi calculada para cada animal através da relação: $TB/(TA+TB)$, sendo TA o tempo gasto explorando o objeto familiar e TB o tempo gasto explorando o novo objeto. O Software Anymaze® (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA) foi utilizado para análise comportamental.

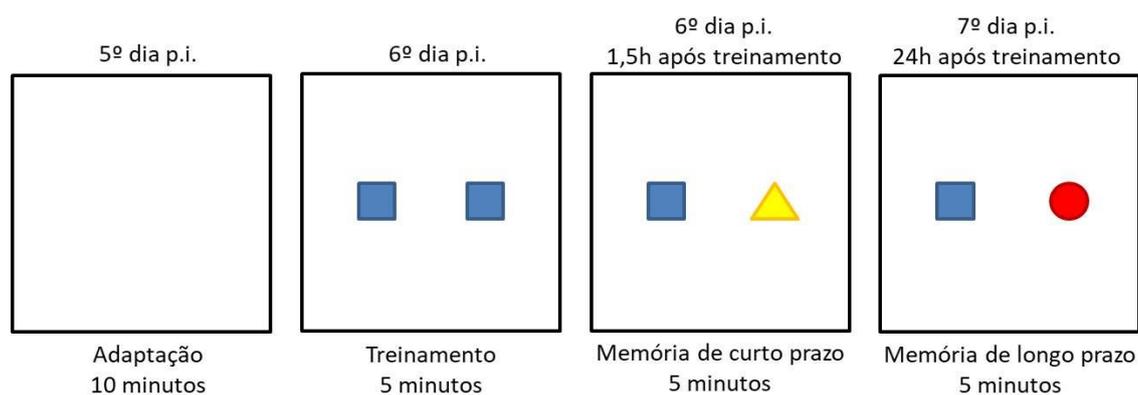


Figura 3. Desenho esquemático do teste de reconhecimento de objetos (TRO)

Esquema representando a arena do aparelho PhenoTyper demonstrando a disposição de objetos nos dias 5, 6 e 7 p.i. e as durações dos respectivos testes.

4.5. Eutanásia e coleta de amostras

Após os períodos estipulados, os animais foram eutanasiados com injeção i.p. de uma combinação de 100 mg/kg de cetamina (Syntec) e 10 mg/kg de xilazina (Syntec), sendo o volume administrado individualizado por peso, considerando a proporção de 0,3 mL de anestésico/10g de massa do animal. Foi realizada necrópsia e coleta do encéfalo e do fígado, armazenados a -20°C para posterior mensuração dos níveis de mieloperoxidase (MPO) E N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG). Para citocinas e fatores neurotróficos foram coletadas regiões específicas do encéfalo: córtex cerebral, estriado e hipocampo, e mantidas em refrigeração -20°C para posterior processamento e análises. Para análise histopatológica e imunoistoquímica, os órgãos foram imediatamente removidos e fixados em formalina tamponada 10% e posterior processamento. Para dosagem de ALT e de depuração hepática do ICG, foi realizada transecção da veia cava inferior e sucção cuidadosa do sangue com pipeta de Pasteur. A dosagem de ICG foi realizada imediatamente após a coleta. Para posterior dosagem de ALT o sangue foi mantido em refrigeração a -20°C.

4.6. Ensaio para detecção dos níveis de Mieloperoxidase (MPO) E N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) no fígado e no encéfalo

Foram realizadas estimativas da migração de neutrófilos e macrófagos para fígado e cérebro através da dosagem da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) A NAG é uma enzima lisossômica produzida pela

ativação de macrófagos e sua quantificação é utilizada como índice de infiltração dessas células no foco de inflamação (BAILEY, 1988).

A MPO é uma enzima encontrada nos grânulos de neutrófilos, e sua quantificação é utilizada como marcador bioquímico de recrutamento dessas células para o foco inflamatório, permitindo demonstrar a presença de neutrófilos quantitativamente (MULLANE *et al.*, 1985).

4.6.1. Processamento do tecido hepático e cerebral para os ensaios de MPO e NAG

Adicionou-se 100 mg de tecido hepático e cerebral a 1mL de solução de extração de citocinas (NaCl 0,4 mol/L, Na₂HPO 10 mmol/L, PMSF 0,1 mmol/L, cloreto de benzalcônio 0,1 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, tween 20 0,05% (p/v), BSA 0,5% (p/v), aprotinina 20 UI) para o processamento em homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific, Pennsylvania, EUA). As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 4°C e 10.000rpm. O *pellet* foi homogeneizado em 1,9 mL do Tampão 1, com pH 4,7, contendo 0,1 mol/L de NaCl, 0,02 mol/L de Na₂HPO₄, 0,015 mol/L de EDTA e centrifugado por 10 minutos a 4°C e 10.000rpm. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* submetido à lise celular através da adição de 1,5 mL de NaCl 0,2% (p/v) por aproximadamente 30 segundos. Posteriormente foi adicionado 1,5 mL de uma solução de NaCl 1,6% (p/v) com glicose 5% (p/v) e a solução final foi homogeneizada e dividida igualmente em dois eppendorfs® que foram centrifugados por 10 minutos a 4°C e 10.000rpm. O sobrenadante foi descartado, os eppendorfs® identificados para NAG e MPO e foram adicionados 800 µL de salina 0,9% (p/v) com triton X-100 1% (p/v), para o ensaio de NAG; ou 800 µL de tampão fosfato [0,05 mol/L de Na₄PO₃ e 0,5% (p/v) de hexadecil-trimetil brometo de amônia, pH 5,4] para o ensaio de MPO. As amostras foram homogeneizadas e congeladas a -80°C para posterior realização dos ensaios enzimáticos.

4.6.2. Dosagem da atividade da MPO

Para liberação da enzima das vesículas citoplasmáticas, o tecido processado foi submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, e, então, centrifugado por 15 minutos a 4°C e 10.000rpm. Para o ensaio enzimático foi

utilizado o sobrenadante. A reação se inicia com a adição de 25 µL de tetrametilbenzidina (Sigma) diluída em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) na concentração de 1,6 mmol/L a 25 µL da amostra em uma placa de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). A placa foi levada a estufa a 37°C por 10 minutos e depois foram adicionados 100 µL de peróxido de hidrogênio 1,2 mmol/L em tampão fosfato de sódio 80mmol/L, pH 5,4. Posteriormente, foi feita uma nova incubação a 37°C por mais 10 minutos. Para cessar a reação, foram adicionados 100 µL de H₂SO₄ 1 mol/L. A atividade da MPO foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica a 450nm. Os resultados foram expressos em atividade de absorbância de MPO.

4.6.3. Dosagem da atividade da NAG

O tecido processado foi centrifugado por 10 minutos a 4°C e 3.000rpm. Para o ensaio enzimático, foi utilizado o sobrenadante. A reação inicia-se com a adição de 100 µL das amostras em uma placa de 96 poços. Foram adicionados 100 µL do substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-D glicosamina, Sigma) às amostras, diluído em tampão citrato/fosfato pH4,5 na concentração de 2,24 mol/L. Sobrenadante e substrato foram levados à estufa a 37°C por 10 minutos. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2 mol/L, pH 10,6. A absorbância foi analisada por espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) no comprimento de onda de 405nm. Os resultados foram expressos em atividade de absorbância de NAG.

4.7. Depuração hepática do verde de indocianina

A função metabólica do fígado foi avaliada por meio da depuração hepática do verde de indocianina (ICG; SIGMA), um teste geralmente utilizado clinicamente. A redução da depuração do ICG está correlacionada com a perda da função hepática. O ICG foi dosado no soro dos camundongos dos grupos controle e TAA 1, 3 e 7 dias após a indução de EH. O ICG foi aplicado na dose de 20mg/kg, diluído em água para injeção, através do plexo retro orbital, com seringa de insulina, que não possui volume morto. O volume foi ajustado de acordo com o peso de cada animal. Exatamente 20 minutos após a injeção, os camundongos foram eutanasiados e seus sangues coletados e centrifugados

por 10 minutos a 7.000 rpm, em temperatura ambiente. Foi realizada a diluição seriada de acordo com o protocolo do fabricante. Após a leitura no aparelho leitor de ELISA, os resultados foram multiplicados pelo fator de diluição. A quantidade de ICG foi determinada por espectrofotometria (absorbância em 800nm).

4.8. Estimativa de lesão hepatocelular pela mensuração de ALT

A alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima presente no citoplasma de hepatócitos e, apesar de não-específica para o fígado, se eleva rapidamente após injúria hepática, sendo seu aumento sérico, um marcador sensível de lesão hepatocelular, permitindo que seja utilizada como teste de triagem de dano hepático (SENIOR, 2012). A ALT foi dosada no soro dos camundongos dos grupos controle e TAA 1, 3 e 7 dias, como índice de lesão hepatocelular, utilizando um teste cinético (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil). O sangue foi coletado através da secção da veia cava inferior, e sucção com pipeta de Pasteur. Para separação do soro, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 10.000 rpm, em temperatura ambiente. Posteriormente, foi utilizado o kit *Transaminase ALT Cinética* (K049, Bioclin) de acordo com as instruções do fabricante. O teste consiste em reações químicas com oxidação de NADH em NAD⁺ na presença de ALT e lactato desidrogenase (LDH). São realizadas quatro leituras por espectrofotometria, em intervalos de um minuto e a variação da absorbância reflete a quantidade de ALT no soro. As leituras são realizadas no comprimento de onda de 340 nm no aparelho leitor de ELISA.

4.9. Análises histopatológica e imunoistoquímica

Após eutanásia os encéfalos e fragmentos dos lobos quadrados do fígado foram imediatamente removidos e fixados em formalina tamponada 10%. Após fixação, os encéfalos foram cortados em fatias coronais de 2mm de espessura, utilizando uma matriz para corte de cérebros de camundongos (Insight LTDA, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Para obtenção de lâminas histológicas, as fatias foram desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cada amostra foi clivada e processada em micrótomo para obter-se secções de 4 µm de espessura em intervalos de 70 µm. As lâminas então foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E).

Outras seções dos fragmentos do encéfalo foram utilizadas para análise imunohistoquímica para - *Ionized calcium-binding adaptor molecule-1* (Iba-1) e *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) ao sétimo dia pós-indução. Essas seções passaram por recuperação antigênica com tampão de sódio-citrato (pH 6) por 28 minutos em panela de pressão e bloqueio de peroxidase com H₂O₂ e solução de PBS (10%) por 30 minutos. Posteriormente foi realizado o bloqueio de proteína com o bloqueador de proteína (kit Novolink, Leica). As seções foram então incubadas com anticorpos monoclonais de coelho contra Iba-1 (Abcam) e GFAP (Diagnostic BioSystems, California, EUA), em diluição 1:2000 e 1:200, respectivamente, e incubadas overnight a 4°C. Anticorpo secundário policlonal biotilado e streptavidina-HRP (Leica) foram aplicadas e as seções foram incubadas com diaminobenzidina 5% (v/v) (Leica). As lâminas foram então contrainformadas com hematoxilina e examinadas por microscopia óptica.

4.10. Avaliação dos níveis teciduais de citocinas/quimiocinas por *Cytometric Bead Array* - CBA

Após os testes comportamentais os animais foram eutanasiados e seus encéfalos retirados. Foram coletadas amostras do córtex, estriado e hipocampo para dosagem das citocinas. Os tecidos foram armazenados em freezer -20°C e em seguida processados em solução tampão de homogeneização para realização de análises via CBA. As concentrações das citocinas Fator de necrose tumoral (TNF), Interleucina 10 (IL-10), Interferon gama (IFN- γ), Interleucina 12 (IL12p70), Interleucina 6 (IL-6) e CCL2 foram avaliadas por meio de Kits de CBA (*Cytometric Bead Array*) obtidos da BD *Biosciences*, de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. A concentração dos mediadores inflamatórios foi determinada por leitura no instrumento FACSCanto (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

4.11. Determinação dos níveis teciduais dos fatores neurotróficos e da fraquitulina por ELISA

As concentrações dos fatores neurotróficos (BDNF, GDNF e NGF) e da fraquitulina (CX3CL1) foram mensuradas no homogenato do cérebro (córtex, estriado e hipocampo)

de cada animal, por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando-se anticorpos R&D Systems (DuoSet) e de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. Os encéfalos de cada animal foram devidamente retirados, acondicionados e estocados no freezer -20°C até o processamento. As amostras foram pesadas e padronizadas em uma média de 190mg de tecido cerebral. Logo após foram trituradas em tampão de lise por um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125, Fisher Scientific) a uma velocidade média. O fundo do eppendorf, ao se fazer a trituração permaneceu no gelo, evitando aquecimento da amostra. Após a maceração, o homogenato que se encontrava o mais uniforme possível, foi centrifugado a 14.000 RPM por 20min, a 4°C , e o sobrenadante colhido, aliqotado e estocado a -80°C até a utilização para o ensaio imunoenzimático. Para tal, 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. Enquanto isso as placas foram deixadas no agitador. 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 (Pharmlingen), 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). Feito isso, as placas foram incubadas em uma caixa fechada e escura à temperatura ambiente. O tempo de coloração amarelada foi monitorado entre 20 a 30 minutos. Quando a coloração amarelada tornou-se adequada, a reação foi interrompida imediatamente adicionando-se a solução stop (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).

4.12. Análise estatística

Todos os dados foram testados quanto à normalidade (teste de Kolmorov-Smirnov). As diferenças foram comparadas usando o teste t de Student. A análise de variância de duas

vias foi empregada para analisar a porcentagem de peso corporal original. 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). O significado estatístico foi assumido para todos os valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Redução do peso corporal

Os animais foram pesados diariamente com a mesma balança e no mesmo horário do dia 0, antes da indução de EH, até o dia 7, quando foram eutanasiados. Não houve mortalidade até o momento da eutanásia. Os animais do grupo TAA mostraram perda de peso significativa em relação ao grupo controle (Fig.4).

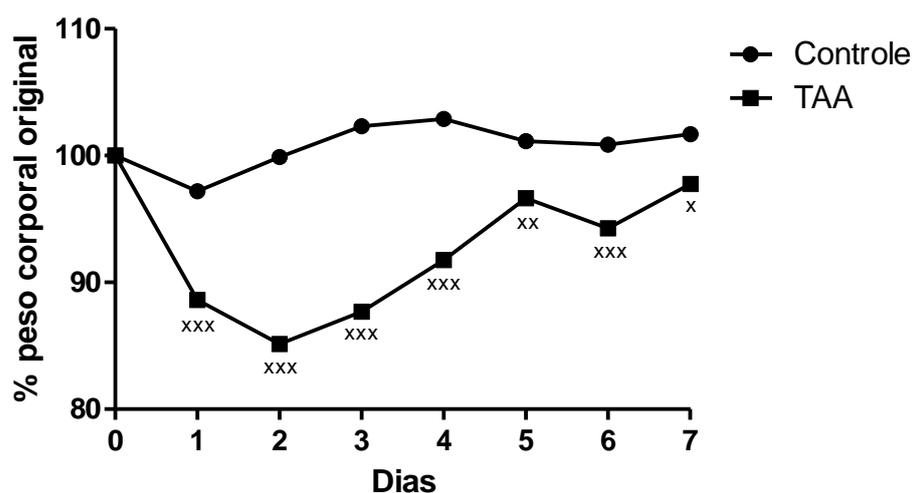


Figura 4. Variação do peso corporal dos animais durante o experimento. Controle (n=5), TAA (n=10). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Grupo controle e TAA: EH induzida por tioacetamida.

5.2. Atividade locomotora reduzida no dia 1 p.i. e normalizada no dia 7 p.i.

Para execução dos testes comportamentais é necessário que a atividade locomotora dos animais esteja preservada, pois a redução da mobilidade pode levar a um resultado enviesado, devido à diminuição da locomoção. Foi realizado o teste de campo aberto para avaliação da atividade locomotora dos camundongos um e sete dias após a indução da EH. No primeiro momento avaliado, observou-se redução significativa da motricidade dos animais TAA em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$). No segundo momento do teste, os animais mostraram recuperação da atividade locomotora (Fig.5).

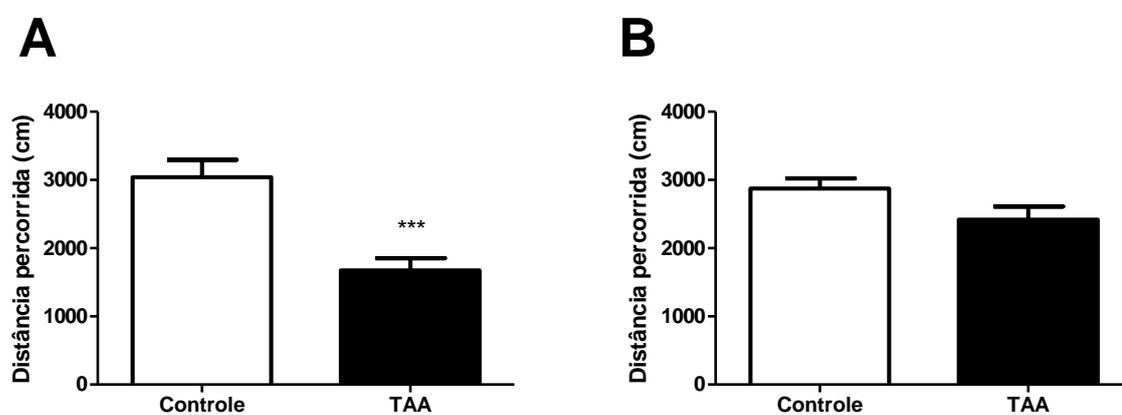


Figura 5. Redução e recuperação da atividade locomotora dos animais TAA 1 dia (a) e 7 dias (b) p.i.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais e avaliados por meio do teste em campo aberto. Sua movimentação livre em uma arena foi filmada e analisada pelo software EthoVision®. Quando comparado ao grupo controle ($n=6$), os animais TAA ($n=9$) apresentam diferença estatisticamente significativa da atividade locomotora no teste 1 dia p.i. ($p < 0,001$) (A). No teste 7 dias p.i.(B), não há diferença estatística entre a motricidade dos animais dos dois grupos, permitindo assim a realização de outros testes comportamentais. (***) $p < 0,001$.: Grupo controle e TAA: EH induzida por tioacetamida.

5.3. Comportamento semelhante à ansiedade

Houve redução significativa da porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE pelos camundongos do grupo TAA em relação ao grupo controle aos sete dias p.i., evidenciando comportamento semelhante à ansiedade nos animais com EH (Fig. 6).

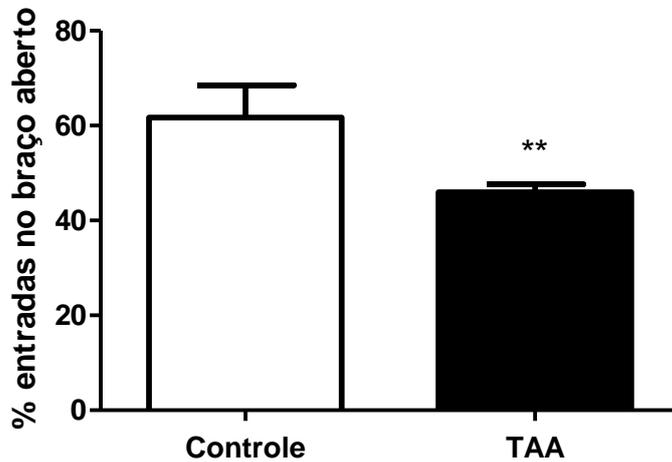


Figura 6. Comportamento semelhante à ansiedade no grupo TAA, 7 dias p.i.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais e avaliados por meio do teste de labirinto em cruz. Sua movimentação livre no LCE foi filmada e analisada pelo software EthoVision®. Quando comparado ao grupo controle (n=5), os animais TAA (n=10) apresentam redução estatisticamente significativa das entradas nos braços abertos do labirinto 7 dias p.i. ($p < 0,01$), evidenciando comportamento semelhante à ansiedade nesses animais (** $p < 0,01$). Grupo controle e TAA: EH induzida por tioacetamida.

5.4. Comportamento semelhante à depressão

Os animais do grupo TAA apresentaram redução do tempo gasto com a atividade de “climbing” em relação ao grupo controle aos sete dias p.i., evidenciando comportamento semelhante à depressão nos animais com EH (Fig. 7).

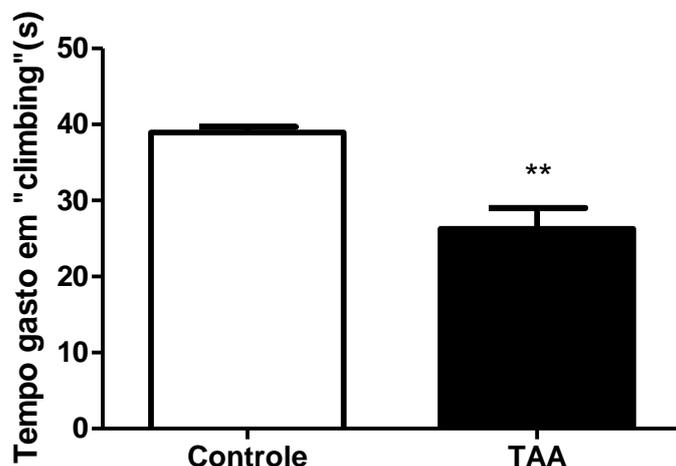


Figura 7. Comportamento semelhante à depressão no grupo TAA, 7 dias p.i.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais e avaliados por meio do teste de nado forçado. Seus tipos de comportamento foram filmados e analisados manualmente. Quando comparado ao grupo controle (n=6), os animais TAA (n=9) apresentam redução estatisticamente significativa do comportamento de “climbing” 7 dias p.i. ($p < 0,01$), evidenciando comportamento semelhante à depressão nesses animais (** $p < 0,01$) Grupo controle e TAA: EH induzida por tioacetamida.

5.5. Ausência de déficit de memória a curto e longo prazo

O teste de reconhecimento de objetos (TRO), realizado no sétimo dia pós indução, foi validado, uma vez que os animais do grupo controle passaram mais de 60% do tempo explorando o novo objeto, o que é esperado, visto que o roedor possui essa tendência inata de explorar o que é novo para ele. Entretanto, os animais do grupo TAA também fizeram adequada discriminação dos objetos, visto que não houve diferença significativa entre este grupo e o grupo controle em relação ao tempo explorando o novo objeto. Conclui-se assim, que, os animais do grupo TAA não apresentam dano de memória de curto prazo (teste de 1,5h) ou de memória de longo prazo (teste de 24h) com base no teste de reconhecimento de objetos (Fig.8).

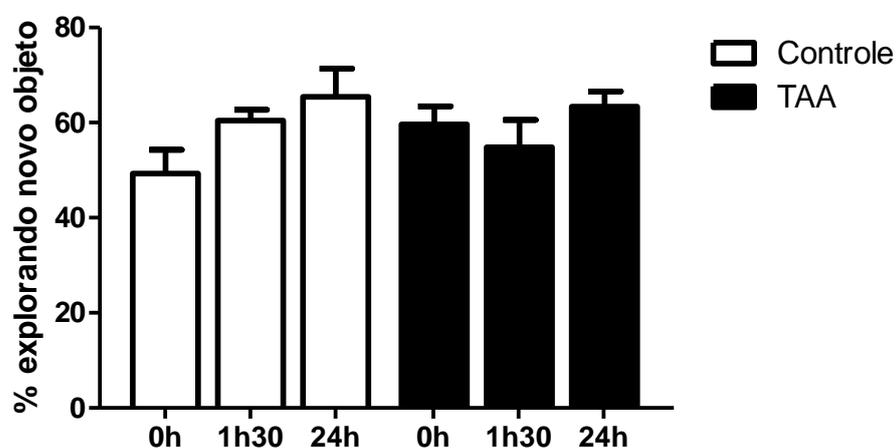


Figura 8. Avaliação da memória a curto e longo prazo.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais e avaliados por meio do TRO. Seus tipos de comportamento foram filmados e analisados pelo software EthoVision®. Foram analisados três momentos do TRO: 0, 1,5h e 24h, se referindo à sessão de treinamento, à sessão para avaliação de memória de curto prazo e de longo prazo, respectivamente. Grupo controle (n=6); TAA (n=10): grupo EH induzida por tioacetamida.

5.6. Lesão hepatocelular evidente 1 dia p.i.

A dosagem de ALT apresentou um pico no dia 1 após a indução, retornando aos níveis basais no dia 3 p.i., demonstrando que nesse momento há intensa lesão hepatocelular (Fig. 9).

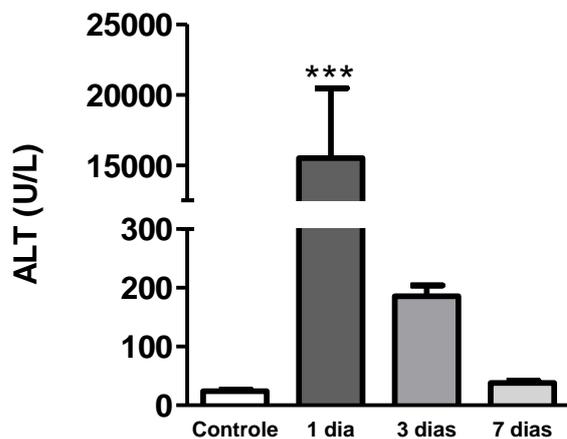


Figura 9. Dosagem de ALT nos grupos controle, 1, 3 e 7 dias p.i..

Foi realizada mensuração de ALT de animais dos quatro grupos experimentais: controle (n=8), dia 1 p.i. (n=4), dia 3 p.i. (n=5), dia 7 p.i. (n=10). Há aumento significativo de ALT no tempo de 24h p.i. (**p<0,01) em relação aos outros grupos.

5.7. Redução intensa da função hepática nos dias 1 e 3 p.i.

A depuração hepática de ICG apresentou-se comprometida nos dias um e três pós indução, retornando à normalidade no sétimo dia p.i., indicando a reversibilidade do processo e retomada do metabolismo hepático (Fig. 10).

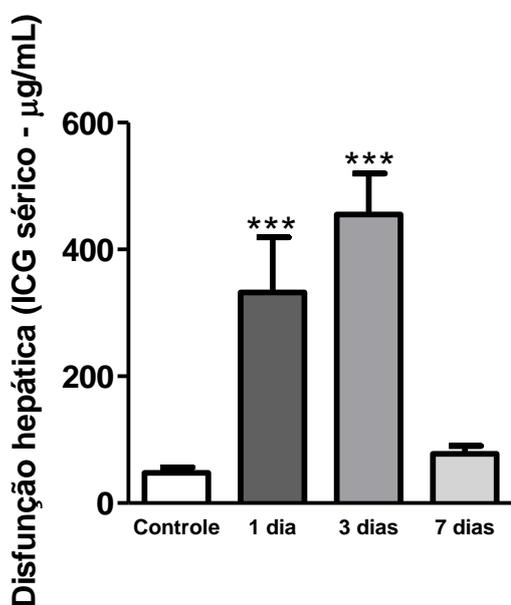


Figura 10. Depuração de ICG nos grupos controle, 24h, 72h, e 7 dias p.i.

Foi realizada mensuração da depuração hepática de ICG de animais dos quatro grupos experimentais: controle (n=5), dia 1 p.i. (n=5), dia 3 p.i. (n=5), dia 7 p.i. (n=5). Há aumento significativo dos níveis de ICG no tempo de 24h p.i. (*p<0,05) e 72h p.i. (**p<0,01) em relação aos outros grupos, indicando que nesses momentos sua depuração está reduzida e, portanto, há redução da função hepática.

5.8. Maior taxa de migração de neutrófilos e macrófagos para o tecido hepático nos dias 1 e 3 p.i.

Os animais do grupo TAA apresentaram níveis hepáticos significativamente maiores de NAG e MPO em relação aos animais do grupo controle nos dias um e três pós-indução, indicando que nesses períodos há maior migração de neutrófilos e macrófagos para o fígado. Não foi observada atividade dessas enzimas em tecido cerebral nos períodos avaliados (Fig. 11).

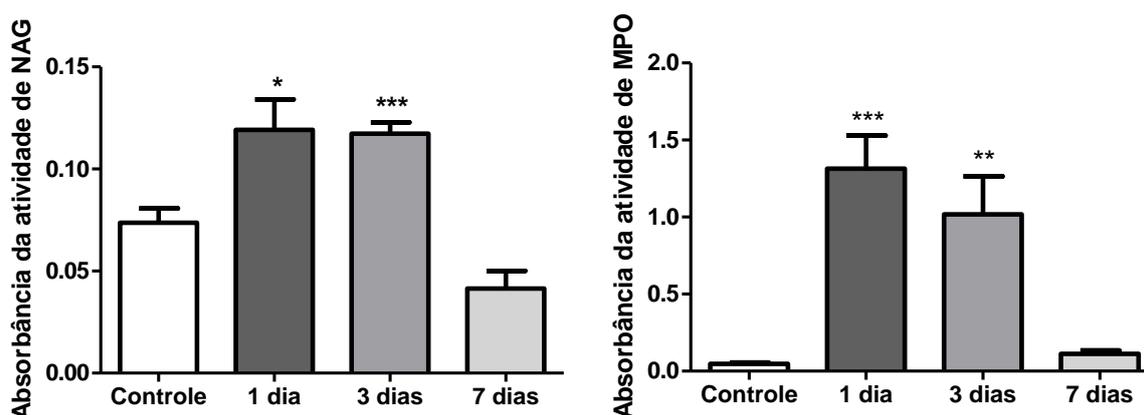


Figura 11. Dosagem hepática das enzimas NAG e MPO, 1, 3 e 7 dias p.i.

Foi realizada mensuração de NAG e MPO de animais dos quatro grupos experimentais controle (n=5), dia 1 p.i. (n=7), dia 3 p.i. (n=7), dia 7 p.i. (n=10). Houve aumento significativo de NAG nos momentos 1 dia p.i. (*p<0,05) e 3 dias (***p<0,001) e MPO nos momentos 1 dia p.i. (***p<0,001) e 3 dias (**p<0,01) em relação ao grupo controle. Os resultados demonstram, portanto, que há aumento da migração de macrófagos e neutrófilos para o tecido hepático nos tempos de 1 e 3 dias após indução de EH em comparação ao grupo controle.

5.9. Lesões hepática e encefálica evidenciadas pela histopatologia

A avaliação histopatológica revelou áreas multifocais de necrose e hemorragia hepática associadas à infiltração inicial de polimorfonucleares nos dias um e três p.i., sendo que essas lesões se localizam principalmente na região centrolobular (Fig 12 A-H). No dia 7 p.i., foram visualizadas infiltrações de células inflamatórias mononucleares e proliferação de células gigantes localizadas próximos aos focos de necrose. As secções de fígado dos animais controles apresentaram aspecto histológico normal.

Em todos os períodos avaliados foram encontradas áreas focais de hemorragia no cerebelo do grupo TAA (Fig.12 I-L). Não foram observadas alterações microscópicas nos encéfalos dos animais controles.

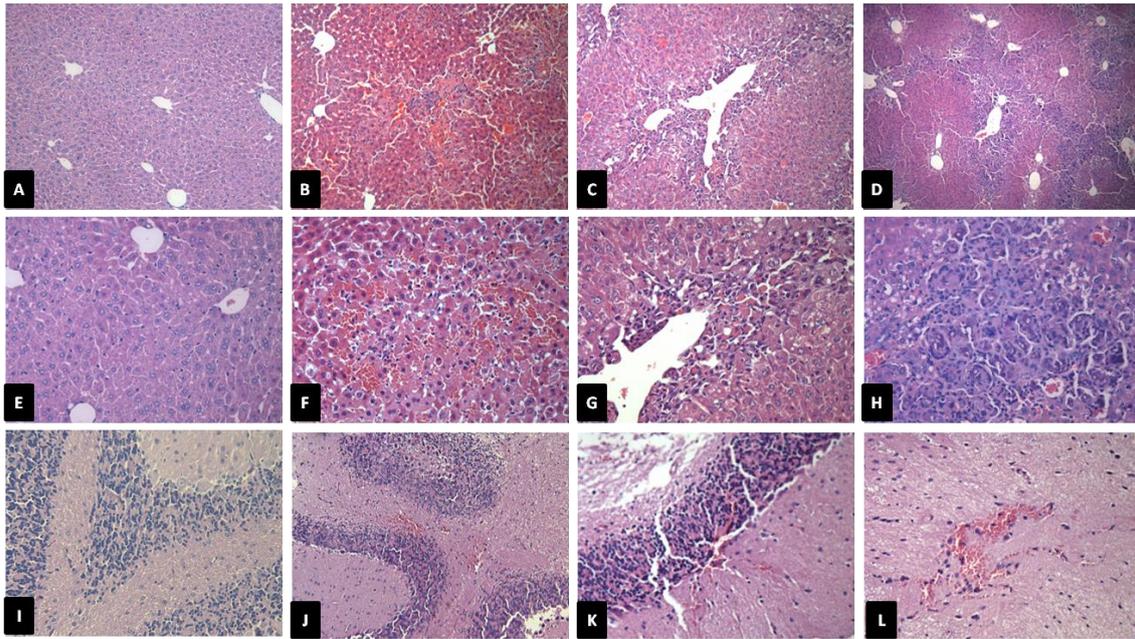


Figura 12. Histopatologia das lesões hepática e cerebral nos grupos TAA 1, 3 e 7 dias.

Fotomicrografia de secções do fígado (A-H) e do encéfalo (I-L) coradas por H&E de camundongos C57BL/6 com EH induzida por TAA por via intraperitoneal 1 dia p.i. (B,F,J), 3 dias p.i. (C,G,K), 7 dias p.i. (D,H,L) e controles (A,E,,I). Aspecto histológico normal no animal controle (A,E). Necrose hemorrágica multifocal associada à infiltração focal de neutrófilos no fígado no dia 1 p.i. (B,F). Infiltração de polimorfonucleares no dia 3 p.i. (C,G). Áreas coalescentes de inflamação caracterizadas pela infiltração de células mononucleares e células gigantes no fígado no dia 7 p.i. (D,H). Cerebelo sem alterações microscópicas, animal controle (I). Camundongo induzido mostrando hemorragia focal em cerebelo em todos os períodos pós-indução (J,K,L). Aumentos originais: 20x (A-D, J); 40x (E-H,I,K,L). Grupo controle (n=5); TAA 1d(n=6); TAA 3d(n=6); TAA 7d (n=6): grupo EH induzida por tioacetamida.

5.10. Alterações morfológicas dos astrócitos e da micróglia na encefalopatia hepática

Os animais controles apresentaram células imunopositivas para GFAP localizadas ao redor de vasos sanguíneos e dispersas pelo neurópilo (Fig.13 A-D). Os animais TAA também mostraram astrócitos imunomarcados distribuídos ao longo do tecido encefálico. No entanto, pequenos focos com aumento da celularidade destas células foram observados nos córtices cerebral e cerebelar. Os encéfalos dos animais controles apresentaram micróglia imunopositiva para iba-1 e com aspecto ramificado em diferentes regiões do encéfalo (Fig.13 E-F). Já os animais TAA apresentaram micróglia imunomarcada para iba-1 com aspecto amebóide.

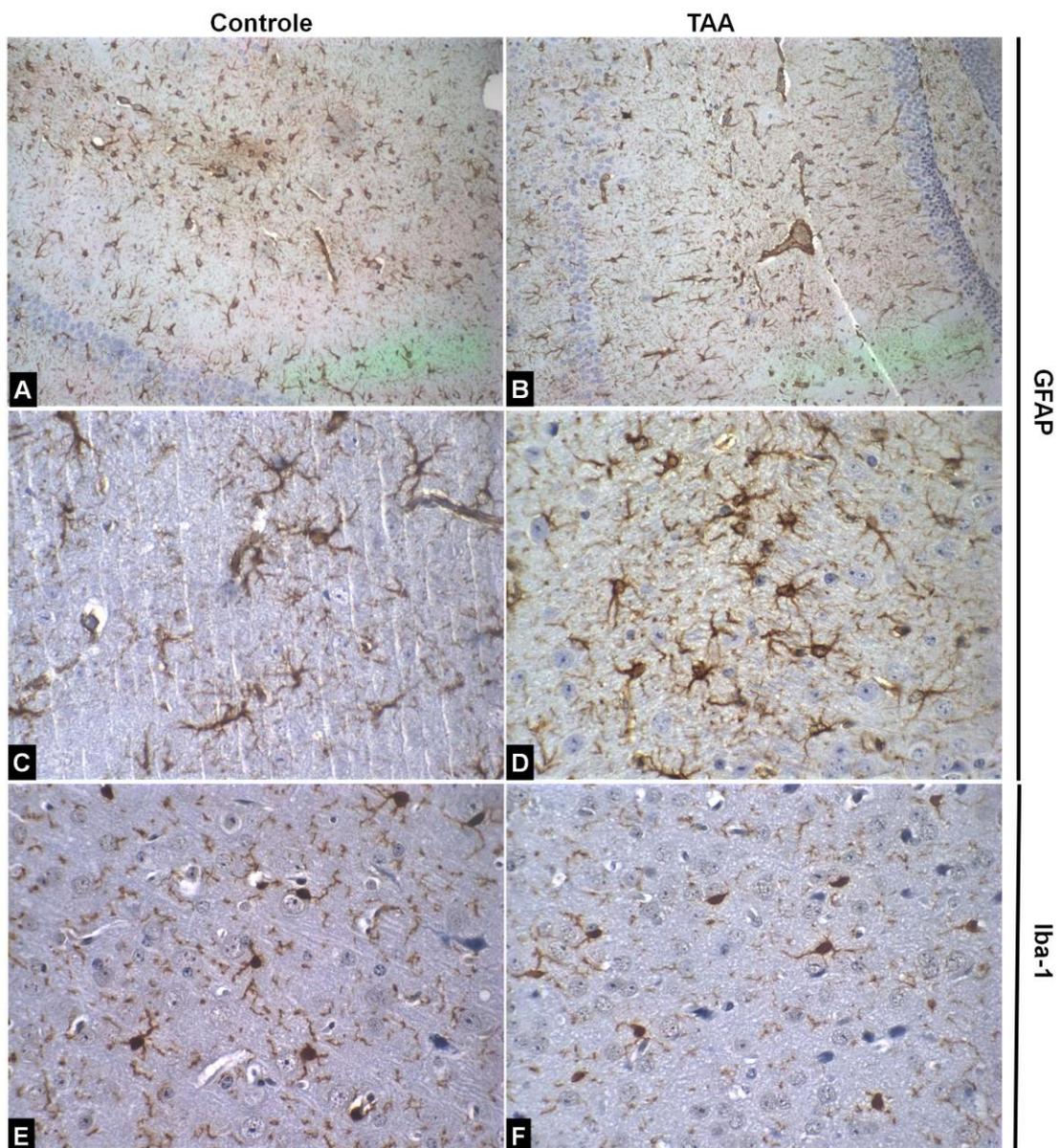


Figura 13. Imunoistoquímica para GFAP e Iba-1.

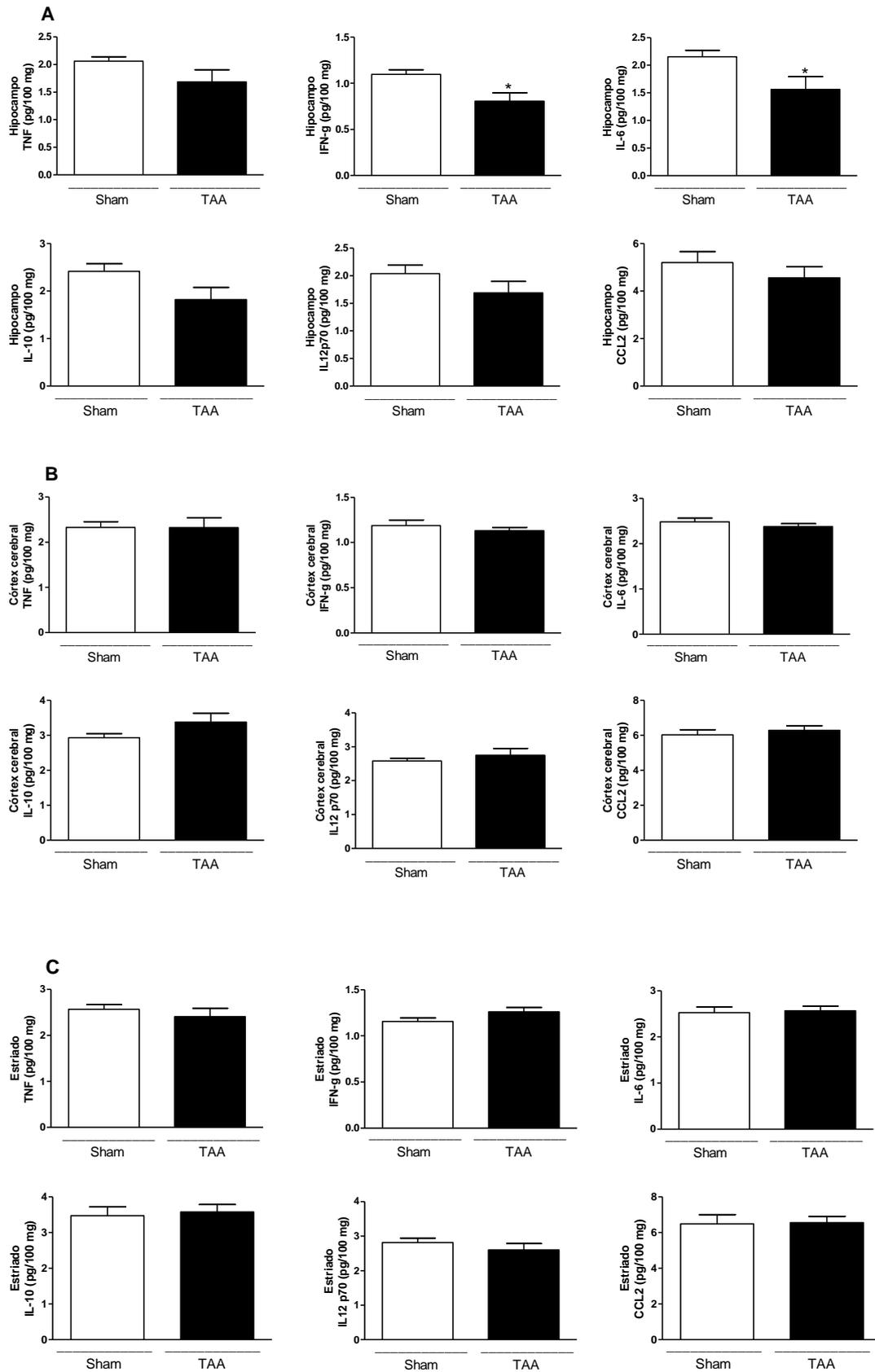
Fotomicroscopia do encéfalo de camundongos controle (A, C, E) e TAA (B, D, F). Reação imunoistoquímica para GFAP (A-D) e Iba-1 (E-F). Observam-se astrócitos imunopositivos para GFAP no córtex cerebral (A-B) e no hipocampo (C-D). Animal TAA (D) apresenta maior celularidade na região cortical, comparado com o animal controle (C). Animal controle com micróglia imunomarcada para Iba-1 e aspecto ramificado (E). Animal TAA com micróglia positiva para Iba-1 e aspecto amebóide (F). Aumento: A,B: 200x; C-F: 600x. Grupo controle: (n=5); TAA (n=10): grupo EH induzida por tioacetamida.

5.11. Redução dos níveis teciduais das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-6

Os níveis dos mediadores pró-inflamatórios (TNF, IFN- γ , IL12p70, IL-6 e CCL2) e antiinflamatório (IL-10) foram avaliados nas regiões do córtex cerebral, estriado e hipocampo, sete dias após a indução da EH (Fig.14). As concentrações das citocinas TNF, IL12p70 e IL-10 e da quimiocina CCL2 estudadas no hipocampo foram similares entre os grupos controle e TAA. A quantificação de citocinas por CBA demonstrou redução significativa ($p < 0,05$) dos níveis de IFN- γ e IL-6 no hipocampo dos animais induzidos em relação aos controles. Os níveis dos mediadores avaliados nas regiões do córtex cerebral e do estriado não foram estatisticamente distintos entre os grupos controle e TAA.

Figura 14. Quantificação de citocinas no tecido cerebral.

Foi realizada quantificação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no tecido cerebral (córtex, estriado e hipocampo) de animais dos grupos controle e TAA. Foi observada redução dos níveis teciduais de IFN- γ e IL-6 ($p < 0,05$) no hipocampo dos animais do grupo induzido em relação ao grupo controle (A). Não foi observada diferença estatística das demais citocinas nas regiões avaliadas (B e C). Grupo controle (n=8); TAA (n=8): grupo EH induzida por tioacetamida.

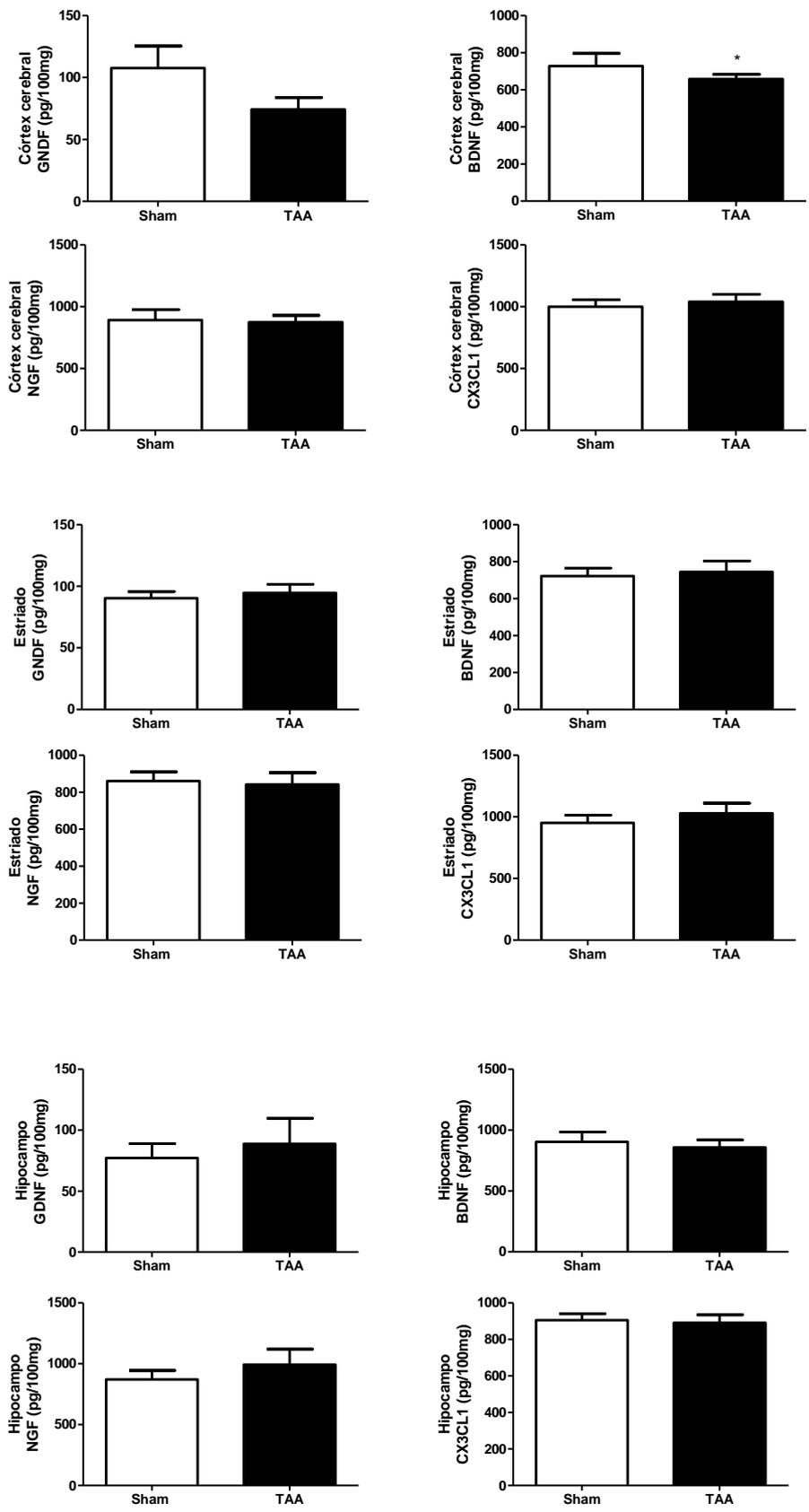


5.12. Redução das concentrações de BDNF no córtex cerebral

As concentrações dos fatores neurotróficos GDNF, BDNF e NGF foram avaliadas nas regiões do córtex cerebral, estriado e hipocampo, sete dias após a indução da EH (Fig.15). Os animais TAA apresentaram níveis de BDNF significativamente menores ($p < 0,05$) no córtex cerebral, quando comparados com os animais controles. Não foram observadas diferenças estatísticas nas concentrações de GDNF e NGF no córtex cerebral e de todos os fatores neurotróficos estudados no hipocampo e no estriado dos grupos controle e TAA.

Figura 15. Quantificação de fatores neurotróficos no tecido cerebral.

Avaliação dos níveis teciduais dos fatores neurotróficos GDNF, BDNF e NGF por ELISA de animais dos grupos controle e TAA. Foi observada redução dos níveis teciduais de BDNF ($p < 0,05$) no córtex cerebral dos animais do grupo induzido em relação ao grupo controle (A). Não foi observada diferença estatística dos demais marcadores nas regiões avaliadas. Grupo controle (n=6); TAA (n=7): grupo EH induzida por tioacetamida.



6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou alterações comportamentais similares à ansiedade e depressão associadas às alterações patológicas e dos parâmetros inflamatórios e neuroquímicos na EH induzida por TAA em camundongos. A EH é uma síndrome neuropsiquiátrica grave e progressiva que se desenvolve em pacientes com falência hepática ou desvio portossistêmico. Atualmente, o único tratamento definitivo para a falência hepática é o transplante, procedimento de alto custo financeiro e complexidade, além de longa fila de espera (BERNAL *et al.*, 2010). Segundo estatística europeia, a taxa de sobrevivência em 1 ano pós-transplante é de 79% (GERMANI *et al.*, 2012).

Há importante associação entre a EH e o prognóstico e evolução do paciente com falência hepática. A inflamação sistêmica colabora para o avanço do quadro, sendo essencial para a compreensão da fisiopatologia da doença e descoberta de novos alvos terapêuticos, o uso de modelos animais. O modelo experimental por injeção intraperitoneal de TAA já é extensivamente utilizado, no entanto, estudos com esse modelo abordando sequelas neuropsiquiátricas tardias e sua associação ao padrão de citocinas e fatores neurotróficos no encéfalo são escassos.

A atividade locomotora preservada é essencial para outros testes comportamentais, como o labirinto em cruz elevado, nado forçado e teste de reconhecimento de objetos. A locomoção prejudicada cria um viés de resultado pela baixa movimentação nos demais testes. Em nosso modelo de injeção i.p. de TAA, ao avaliarmos a locomoção dos animais através de teste em campo aberto, encontramos significativa redução da atividade locomotora 1 dia após a indução, corroborando com os resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa (Miranda *et al.*, 2010; Faleiros *et al.*, 2014). Em momento mais tardio, 7 dias p.i., os animais induzidos já não apresentaram déficit locomotor, possibilitando a execução de novos testes comportamentais, para avaliação de sequelas neuropsiquiátricas no modelo.

Apesar da existência de muitos estudos em modelos animais experimentais com TAA, a grande maioria utiliza ratos. Diferenças entre espécies podem gerar resultados divergentes, o que é um fator limitante para comparações entre estudos. A histologia da lesão hepática provocada pela TAA consiste principalmente em necrose centrolobular e

inflamação. Nossos resultados se mostraram de acordo com a literatura, e, em período mais tardio (7 dias p.i.), observamos a presença de infiltrado inflamatório de células mononucleares e de células gigantes. A aplicação intraperitoneal de TAA em camundongos induz falência hepática aguda, produzindo sinais e sintomas semelhantes aos vistos na EH, comprovada pela avaliação histopatológica, aumento de ALT e aumento de ICG no soro dos camundongos no tempo de 1 dia pós indução, e seu efeito hepatotóxico se deve ao estresse oxidativo e geração de radicais livres (ZIMMERMAN *et al.*, 1989). Nosso estudo mostrou que as dosagens de ALT e de ICG retornaram ao valor basal no sétimo dia p.i., indicando que, nesse momento, o fígado retoma sua capacidade funcional. Apesar de também recuperarem a capacidade motora no dia 7 p.i., os camundongos ainda apresentavam alterações comportamentais relacionadas à ansiedade e depressão, indicando permanência de possível alteração decorrente da EH no SNC. Alguns autores demonstraram que 12 dias após a injeção intraperitoneal de TAA, os camundongos ainda apresentavam déficits cognitivos (AVRAHAM, YOSEFA *et al.*, 2006), corroborando as alterações comportamentais persistentes em fases tardias observadas no presente estudo. Outros trabalhos também demonstraram lesão hepática, alterações motoras e neuropsiquiátricas utilizando esse modelo, no entanto, a maioria dos estudos aborda a fase mais aguda da EH, até 2 dias p.i. (MIRANDA *et al.*, 2010) (GOMIDES *et al.*, 2014).

Nosso grupo estabeleceu previamente o modelo de EH em camundongos que receberam injeção i.p. de TAA na dose de 600mg/kg, apresentando dano hepático confirmado pela histopatologia, alteração de estado neuropsiquiátrico, comportamento motor, funções reflexas e sensoriais, através da bateria SHIRPA (MIRANDA *et al.*, 2010). Nosso estudo abrangeu um período mais tardio da doença, para avaliação de alterações neuropsiquiátricas e estudo da expressão fatores neurotróficos e citocinas presentes neste momento. Nossos resultados avaliando a função hepática e comportamento motor foram semelhantes, no entanto, a taxa de mortalidade observada por Miranda e colaboradores, foi de cerca de 30 a 40%, utilizando camundongos machos. Em nosso estudo, utilizamos camundongos fêmeas, e não houve mortalidade, sugerindo que possa haver algum tipo de proteção hormonal neste modelo, exigindo mais estudos para completa elucidação.

A discrepância entre as lesões observadas na histopatologia do fígado aos 7 dias p.i. e à dosagem de ALT no soro, se deve à complexidade dos mecanismos envolvidos na liberação das enzimas citosólicas. Sabe-se que a liberação dessas enzimas ocorre durante as fases reversível e irreversível de lesão do hepatócito, portanto, sua detecção no soro não indica necessariamente morte celular (AVRAHAM, Y. *et al.*, 2011). Nossos resultados demonstraram a associação das seqüelas neurológicas com danos hepáticos e encefálicos sete dias após a indução da EH. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos exatos da associação entre lesão hepática à disfunção e lesão cerebral.

Diferentemente do que foi visto em nosso estudo, animais tratados cronicamente com TAA na água de beber, durante 20 semanas (KAWAI *et al.*, 2012), não apresentaram redução da atividade de *climbing* no teste de nado forçado, e, portanto, não apresentam comportamento semelhante à depressão. Esses animais apresentaram ainda, nesse teste, aumento da atividade e redução de imobilidade, além de déficit cognitivo no teste de reconhecimento de objetos, o que também não foi observado em nosso estudo.

Nossos resultados corroboram com os dados encontrados por AVRAHAM, YOSEFA *et al.* (2006) que avaliou a função cognitiva de camundongos no modelo de EH por injeção de TAA sete dias após indução, já que antes desse período, a cognição se mostrou gravemente comprometida. Avraham e colaboradores estudaram o possível envolvimento de endocanabinóides na síndrome da EH, uma vez que seu papel é conhecido na reversão do dano do trauma cerebral, assim como em outras condições do SNC. Avraham descreveu o nível de endocanabinóide elevado no SNC de camundongos TAA. A utilização de agonistas e antagonistas desses endocanabinóides, melhorou o escore neurológico, função cognitiva e atividade motora.

SHKANI-ESFAHANI *et al.* (2016) estudaram o papel da coenzima Q10 (CoQ10), utilizada rotineiramente na medicina, conhecida por seu papel protetor, antioxidante, e anti-inflamatório sobre células, na EH experimental por TAA em ratos. Foi observado que em relação ao grupo controle, os animais tratados apresentaram menor grau de encefalopatia, maior atividade locomotora e níveis reduzidos de depressão, além de redução do escore de necrose centrolobular, apoptose, infiltração de células inflamatórias, vacuolização e necrose hepática. No geral, a CoQ10 apresentou efeitos positivos na injúria hepática e as alterações comportamentais e bioquímicas relacionadas a ela, demonstrando a importância da inflamação na fisiopatologia da EH e

alterações comportamentais, e como a terapêutica anti-inflamatória pode ser um importante alvo para tratamento de suporte desses pacientes.

No modelo de EH por ligação de ducto biliar (BDL) utilizado por DHANDA *et al.*, 2018, além do aumento de enzimas hepáticas, foi observada elevação dos níveis de IL-6 e TNF em tecido cerebral, hepático e soro, inversamente ao observado em nosso estudo. Foi descrita também redução da expressão de GFAP e Iba-1 em tecido cerebral. A redução de BDNF em tecido cerebral associada a déficits neurológicos observados através de testes comportamentais corrobora com os resultados encontrados em nossa pesquisa. Esses autores sugeriram que a inflamação sistêmica e a redução de BDNF desempenham papel fundamental no declínio das funções cognitivas.

A neuroinflamação associada à hiperamonemia aumenta o tônus GABAérgico e prejudica as funções cognitiva e motora, como demonstrado por HERNANDEZ-RABAZA *et al.*, 2016. Rabazza utilizou o modelo experimental de ratos Wistar alimentados com dieta rica em amônia. Foram realizados testes comportamentais para avaliar aprendizagem e coordenação motora, ambos prejudicados no grupo hiperamonêmico. A expressão de IL-1 β e Iba-1 se mostrou no cerebelo dos animais hiperamonêmicos. GFAP não apresentou diferença estatística entre os grupos, mas foram visualizados astrócitos com alterações morfológicas. Os resultados encontrados por Rabazza demonstram mecanismos pelos quais a neuroinflamação secundária à hiperamonemia leva ao déficit cognitivo e comprometimento na coordenação motora, e como o tratamento com sulforafano, composto obtido de vegetais com propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, reverte o quadro, demonstrando, mais uma vez, a importância da inflamação na patogênese e reversão da EH (HERNANDEZ-RABAZA *et al.*, 2016).

A hiperamonemia induz neuroinflamação que contribui com os déficits cognitivos em ratos com EH, como demonstrado por RODRIGO *et al.*, 2010. Foram utilizados ratos Wistar, divididos em dois grupos, o primeiro passou pela cirurgia de ligação de ducto biliar (BDL) e o segundo foi alimentado com dieta rica em amônia. Os dois grupos apresentaram ativação da micróglia, principalmente no cerebelo, demonstraram déficits cognitivos e motores. A utilização do anti-inflamatório Ibuprofeno reduziu a ativação microglial, e restaurou os déficits cognitivos e motores, demonstrando a importância da inflamação na EH e a necessidade de estabelecer estratégias anti-inflamatórias para o tratamento de suporte desses pacientes. A quimiocina CX3CL1 é altamente expressa em

neurônios e pode atuar no receptor CX3CR1 localizado na micróglia. A interação da fraquitallina com o receptor CX3CR1 atenua a resposta neuroinflamatória. Sabe-se que o aumento dos níveis da CX3CL1 reduz os déficits neurológicos, ativação microglial e a expressão de citocinas pró-inflamatórias durante a indução da EH por azoximetano (MCMILLIN *et al.*, 2016). No presente estudo não foram encontradas alterações nos níveis teciduais da CX3CL1 nas regiões do córtex cerebral, estriado e hipocampo no período avaliado. Fato interessante é que foi observada redução da expressão das citocinas IFN- γ e IL-6, sete dias após a indução. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa observou aumento significativo dos níveis séricos de TNF, CXCL1 e CCL3 e das concentrações de TNF, IL-1 β , CXCL1, CCL2, CCL3 e CCL5 no córtex pré-frontal até dois dias após a indução da EH por tiocetamida em camundongos fêmeas C57BL/6 (FALEIROS *et al.*, 2014). O presente trabalho descreve, pela primeira vez, a presença de déficits comportamentais associados com a redução dos níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias. Sabe-se que os fatores neurotróficos podem modular a resposta inflamatória e vice-versa (DE MIRANDA *et al.*, 2017; VICTORIA *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2017).

Nosso estudo demonstrou a redução da expressão de BDNF em córtex cerebral dos animais induzidos com TAA, em relação ao grupo controle. Essa neurotrofina é comumente relacionada à plasticidade sináptica e déficits cognitivos, além de se mostrar reduzida em diversas doenças neuropsiquiátricas, como doença de Alzheimer e depressão. Além da redução de BDNF cortical, os animais do grupo TAA apresentaram comportamento semelhante à depressão no teste de nado forçado.

A administração de Harmina (inibidor da monoaminaoxidase), no estudo de (FORTUNATO *et al.*, 2009), induziu efeito anti-depressivo e elevou BDNF no hipocampo de Ratos wistar. No teste de nado forçado, o grupo que recebeu a substância, apresentou redução do tempo de imobilidade e maior frequência dos comportamentos de “climbing” e nado, associados ao aumento hipocampal de BDNF, permitindo, assim como em nosso estudo, realizar a associação entre a redução de BDNF e comportamento semelhante à depressão e, como demonstrado por Fortunato, a elevação de BDNF e efeito anti-depressivo.

A hiperamonemia prejudica o metabolismo de glutamato e reduz BDNF no hipocampo de ratos wistar, como demonstrado por GALLAND *et al.*, 2017. Foi utilizado um

modelo hiperamonêmico sem lesão hepática, através injeções i.p. diárias de solução de urease. BDNF se mostrou reduzido no hipocampo de ratos hiperamonêmicos por um mecanismo que deve envolver a produção de astrócitos, uma vez que os mesmos efeitos foram observados em culturas celulares de astrócitos. Resultados demonstram vulnerabilidade do hipocampo à toxicidade da amônia, particularmente devido à redução do metabolismo do glutamato e conteúdo de BDNF, contribuindo para o entendimento das alterações neuropsiquiátricas presentes na EH. Assim como observado em nosso estudo, foi possível estabelecer ligação entre a expressão de BDNF e as alterações comportamentais. A GFAP, proteína característica dos astrócitos, não foi alterada em ratos tratados com urease, em relação ao grupo controle, demonstrando que a amônia não induziu astrogliose hipocampal. GFAP também inalterado foi encontrado no cerebelo de pacientes cirróticos (KRIL; FLOWERS; BUTTERWORTH, 1997). Além disso, a redução da expressão de GFAP já foi demonstrada em modelo de falência hepática aguda em ratos (BÉLANGER *et al.*, 2002).

Sugere-se estudos futuros avaliando os níveis de ativação dos astrócitos e da micróglia bem como das atividades pró-inflamatórias, anti-inflamatórias, pró-resolutivas e neuroprotetoras locais e sistêmicas em fases mais tardias da EH são necessários para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese das disfunções neurológicas observadas na doença.

7. CONCLUSÕES

A indução da EH com TAA na dose única de 600mg/kg em camundongos fêmeas C57/BL6 promoveu alterações nos níveis séricos de ALT associados a dano hepático e aumento da atividade de neutrófilos e macrófagos no fígado;

A EH promoveu alterações comportamentais similares à ansiedade e depressão sete dias após a indução. Estas alterações foram associadas a formação de focos de hemorragia cerebelar, alterações morfológicas dos astrócitos e da micróglia e redução dos níveis teciduais das IFN- γ e IL-6 e do fator neurotrófico BDNF.

Nossos resultados sugerem que disfunções das respostas inflamatória e neuroprotetora estejam associadas a formação dos déficits comportamentais na EH murina.

8. REFERÊNCIAS

AGRAWAL, Swastik; UMAPATHY, Sridharan; DHIMAN, Radha K. Minimal Hepatic Encephalopathy Impairs Quality of Life. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, v. 5, n. S1, p. S42–S48, 2015.

ALLAN, Stuart M.; ROTHWELL, Nancy J. Inflammation in central nervous system injury. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 358, n. 1438, p. 1669–1677, 2003.

AMODIO, Piero. Hepatic Encephalopathy: Historical Remarks. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, v. 5, n. S1, p. S4–S6, 2015.

ASHKANI-ESFAHANI, Soheil *et al.* Protective effects of quercetin on thioacetamide-induced acute liver damage and its related biochemical and pathological alterations. *The Egyptian Journal of Internal Medicine*, v. 28, n. 3, p. 123, 2016.

AVRAHAM, Y. *et al.* Cannabidiol improves brain and liver function in a fulminant hepatic failure-induced model of hepatic encephalopathy in mice. *British Journal of Pharmacology*, v. 162, n. 7, p. 1650–1658, 2011.

AVRAHAM, Yosefa *et al.* Endocannabinoids affect neurological and cognitive function in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in mice. *Neurobiology of Disease*, v. 21, n. 1, p. 237–245, 2006.

BAJAJ, Jasmohan. Minimal hepatic encephalopathy matters in daily life. *World Journal of Gastroenterology*, v. 14, n. 23, p. 3609–3615, 2008.

BÉLANGER, Mireille *et al.* Loss of expression of glial fibrillary acidic protein in acute hyperammonemia. v. 41, p. 155–160, 2002.

BÉLANGER, Mireille; CÔTÉ, Jean; BUTTERWORTH, Roger F. Neurobiological characterization of an azoxymethane mouse model of acute liver failure. *Neurochemistry International*, v. 48, n. 6–7, p. 434–440, 2006.

BERNAL W, AUZINGER G, DHAWAN A, WENDON J. Acute liver failure. *Lancet* 2010;376:190-201.

BLANK, Thomas; PRINZ, Marco. Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. *Glia*, v. 61, n. 1, p. 62–70, 2013.

BLEI, Andres T. *et al.* Hepatic encephalopathy - Definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: Final report of the Working Party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology*, v. 35, n. 3, p. 716–721, 2002.

BRUCK, Rafael *et al.* Hypothyroidism minimizes liver damage and improves survival in rats with thioacetamide induced fulminant hepatic failure. *Hepatology*, v. 27, n. 4, p. 1013–1020, 1998.

BUDNI, Josiane *et al.* The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging and Disease*, v. 6, n. 5, p. 331, 2015.

BUTTERWORTH, Roger F. Altered glial-neuronal crosstalk: Cornerstone in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochemistry International*, v. 57, n. 4, p. 383–388, 2010.

- BUTTERWORTH, Roger F. *et al.* Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver International*, v. 29, n. 6, p. 783–788, 2009.
- CALVARUSO, Vincenza *et al.* Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, From Duplicate 2 (Mechanisms of brain edema in acute liver failure and impact of novel therapeutic interventions - Vaquero, Javier; Butterworth, Roger F) PMID: 18173908, v. 29, n. 7, p. 594–601, mar. 2007.
- CAULI, Omar *et al.* Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, v. 24, n. 1, p. 69–80, 2009.
- COLTART, Iona; TRANAH, Thomas H.; SHAWCROSS, Debbie L. Inflammation and hepatic encephalopathy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 536, n. 2, p. 189–196, 2013.
- DE MIRANDA, Aline Silva *et al.* A Neuroprotective Effect of the Glutamate Receptor Antagonist MK801 on Long-Term Cognitive and Behavioral Outcomes Secondary to Experimental Cerebral Malaria. *Molecular Neurobiology*, v. 54, n. 9, p. 7063–7082, 2017.
- DE MIRANDA, Aline Silva *et al.* Anxiety-like behavior and proinflammatory cytokine levels in the brain of C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* (strain ANKA). *Neuroscience Letters*, v. 491, n. 3, p. 202–206, 2011.
- DELALANDE, Centre De Recherche. Short communication " BEHAVIOURAL DESPAIR " IN RATS AND MICE : STRAIN DIFFERENCES AND THE EFFECTS OF IMIPRAMINE 1 . Introduction We have recently described procedures for producing a state resembling depression in rats and mice (Porsolt et al ., 1977a , . v. 51, p. 291–294, 1978.
- DELANTY, N. *et al.* Status epilepticus arising de novo in hospitalized patients: An analysis of 41 patients. *Seizure*, v. 10, n. 2, p. 116–119, 2001.
- DENNIS, C, *et al.* Microglial proliferation in the brain of chronic alcoholics with hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* (2014) 29: 1027.
- DHANDA, Saurabh *et al.* Systemic inflammation without gliosis mediates cognitive deficits through impaired BDNF expression in bile duct ligation model of hepatic encephalopathy. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 70, p. 214–232, 2018.
- DUMAN, Ronald S.; LI, Nanxin. A neurotrophic hypothesis of depression: Role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 367, n. 1601, p. 2475–2484, 2012.
- FALEIROS, Bruno E *et al.* Up-regulation of brain cytokines and chemokines mediates neurotoxicity in early acute liver failure by a mechanism independent of microglial activation. *Brain Research*, v. 1578, p. 49–59, 2014.
- FELIPO, Vicente; BUTTERWORTH, Roger F. Neurobiology of ammonia. *Progress in Neurobiology*, v. 67, n. 4, p. 259–279, 2002.
- FONTANA, Luis *et al.* Serum amino acid changes in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Toxicology*, v. 106, n. 1–3, p. 197–206, 1996.
- FORTUNATO, Jucélia J. *et al.* Acute harmine administration induces antidepressive-

- like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 33, n. 8, p. 1425–1430, 2009.
- GALLAND, Fabiana *et al.* Hyperammonemia compromises glutamate metabolism and reduces BDNF in the rat hippocampus. *NeuroToxicology*, v. 62, p. 46–55, 2017.
- GERMANI, G *et al.* Liver transplantation for acute liver failure in Europe: outcomes over 20 years from the ELTR database. *J Hepatol.* 2012 Aug;57(2):288-96.
- GOMIDES, Lindisley Ferreira *et al.* Murine model to study brain, behavior and immunity during hepatic encephalopathy. *World Journal of Hepatology*, v. 6, n. 4, p. 243–250, 2014.
- GRUOL, Donna L. Neuropharmacology IL-6 regulation of synaptic function in the CNS. *Neuropharmacology*, v. 96, p. 42–54, 2015.
- GUAN, Zhiwei *et al.* Interleukin-6 levels X uctuate with the light – dark cycle in the brain and peripheral tissues in rats. v. 19, p. 526–529, 2005.
- HADJIHAMBI, Anna *et al.* Hepatic encephalopathy: a critical current review. *Hepatology International*, v. 12, n. s1, p. 135–147, 2018.
- HAJOVSKY, Heather *et al.* Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-Oxide in rat hepatocytes. *Chemical Research in Toxicology*, v. 25, n. 9, p. 1955–1963, 2012.
- HÄUSSINGER, Dieter; SCHLIESS, F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut*, v. 57, n. 8, p. 1156–1165, 2008.
- HERNANDEZ-RABAZA, Vicente *et al.* Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarization of microglia. *Journal of Neuroinflammation*, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2016.
- HERNANDEZ-RABAZA, Vicente *et al.* Sildenafil reduces neuroinflammation and restores spatial learning in rats with hepatic encephalopathy : underlying mechanisms. *Journal of Neuroinflammation*, p. 1–12, 2015.
- HERNÁNDEZ-RABAZA, Vicente *et al.* Hyperammonemia induces glial activation , neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus , impairing spatial learning : reversal by sulforaphane. *Journal of Neuroinflammation*, p. 1–11, 2016.
- HOGAN, Dale *et al.* Interleukin-6 alters sleep of rats. v. 137, p. 59–66, 2003.
- HU, Y *et al.* Hypothyroidism minimizes liver damage and improves survival in rats with thioacetamide induced fulminant hepatic failure. *Hepatology*, v. 27, n. 4, p. 1013–1020, 1996.
- ICHAÏ, Philippe; SAMUEL, Didier. Epidemiology of liver failure. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, v. 35, n. 10, p. 610–617, 2011.
- JAYAKUMAR, Arumugam R.; RAMA RAO, Kakulavarapu V.; NORENBURG, Michael D. Neuroinflammation in hepatic encephalopathy: Mechanistic aspects. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, v. 5, n. S1, p. S21–S28, 2015.

- JIANG, Wenlei; DESJARDINS, Paul; BUTTERWORTH, Roger F. Cerebral inflammation contributes to encephalopathy and brain edema in acute liver failure: Protective effect of minocycline. *Journal of Neurochemistry*, v. 109, n. 2, p. 485–493, 2009.
- JIANG, Ying *et al.* Minocycline enhances hippocampal memory, neuroplasticity and synapse-associated proteins in aged C57 BL/6 mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 121, p. 20–29, 2015.
- JOVER, Rodrigo *et al.* Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology*, v. 43, n. 6, p. 1257–1266, 2006.
- KAWAI, Hiroshi *et al.* Behavioral and biochemical characterization of rats treated chronically with thioacetamide: proposal of an animal model for hepatic encephalopathy associated with cirrhosis. *The Journal of Toxicological Sciences*, v. 37, n. 6, p. 1165–1175, 2012.
- KIM, Yoon Seong; JOH, Tong H. Microglia, major player in the brain inflammation: Their roles in the pathogenesis of Parkinson’s disease. *Experimental and Molecular Medicine*, v. 38, n. 4, p. 333–347, 2006.
- KRIL, Jillian J; FLOWERS, Dimity; BUTTERWORTH, Roger F. Distinctive pattern of Bergmann glial pathology in human hepatic encephalopathy. *Molecular and Chemical Neuropathology*, v. 31, n. 3, p. 279–287, 1997.
- LIMATOLA, Cristina; RANSOHOFF, Richard M. Modulating neurotoxicity through CX3CL1/CX3CR1 signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 8, n. August, p. 1–8, 2014.
- LIN, Pao Yen; TSENG, Ping Tao. Decreased glial cell line-derived neurotrophic factor levels in patients with depression: A meta-analytic study. *Journal of Psychiatric Research*, v. 63, p. 20–27, 2015.
- M.D., Moscol; C.B., Sanchez. The burden of hepatic encephalopathy in Latin America. *Annals of Hepatology*, v. 10, n. SUPPL. 2, p. S31–S35, 2011.
- MCMILLIN, Matthew *et al.* Fractalkine suppression during hepatic encephalopathy promotes neuroinflammation in mice. *Journal of Neuroinflammation*, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2016.
- MCMILLIN, Matthew *et al.* Neuronal CCL2 is upregulated during hepatic encephalopathy and contributes to microglia activation and neurological decline. v. 11, n. 1, p. 1–11, 2014.
- MÉNDEZ-LÓPEZ, M. *et al.* Effects of a high protein diet on cognition and brain metabolism in cirrhotic rats. *Physiology and Behavior*, v. 149, p. 220–228, 2015.
- MIRANDA, Aline Silva De *et al.* A thioacetamide-induced hepatic encephalopathy model in C57BL / 6 mice A behavioral and neurochemical study. v. 68, n. March, p. 597–602, 2010.
- MONTAGNESE, Sara *et al.* Neuropsychiatric performance in patients with cirrhosis: Who is “normal”? *Journal of Hepatology*, v. 66, n. 4, p. 825–835, 2017.
- MONTAGNESE, Sara *et al.* Sleep-Wake Abnormalities in Patients With Cirrhosis. p.

705–712, 2013.

MULLANE, Kevin M.; KRAEMER, Rosemary; SMITH, Bruce. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *Journal of Pharmacological Methods*, v. 14, n. 3, p. 157–167, 1985.

NORENBERG, M. D.; RAMA RAO, K. V.; JAYAKUMAR, A. R. Signaling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity. *Metabolic Brain Disease*, v. 24, n. 1, p. 103–117, 2009.

ORTIZ, María; JACAS, Carlos; CÓRDOBA, Juan. Minimal hepatic encephalopathy: Diagnosis, clinical significance and recommendations. *Journal of Hepatology*, v. 42, n. SUPPL. 1, p. 45–53, 2005.

PANIS, Yves; MCMULLAN, David M.; EMOND, Jean C. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery*, v. 121, n. 2, p. 142–149, 1997.

REDWINE, Laura *et al.* Effects of Sleep and Sleep Deprivation on Interleukin-6 , Growth Hormone , Cortisol , and Melatonin Levels in Humans *. v. 85, n. 10, 2000.

RODRIGO, Regina *et al.* Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, v. 139, n. 2, p. 675–684, 2010..

RODRÍGUEZ, José Julio; VERKHRATSKY, Alexei. Neuroglial Roots of Neurodegenerative Diseases ? n. September 2010, p. 87–96, 2011.

ROTHAUG, Michelle; BECKER-PAULY, Christoph; ROSE-JOHN, Stefan. Biochimica et Biophysica Acta The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *BBA - Molecular Cell Research*, v. 1863, n. 6, p. 1218–1227, 2016.

SARLUS, Heela *et al.* Microglia in Alzheimer ' s disease. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 127, n. 9, p. 33–35, 2017.

SCHMIDT, HD, *et al.* Future Antidepressant Targets: Neurotrophic Factors and Related Signaling Cascades. *Drug Discov Today Ther Strateg.* 2008;5(3):151-156.

SEYAN, Amit S *et al.* Changing face of hepatic encephalopathy : Role of inflammation and oxidative stress. v. 16, n. 27, p. 3347–3357, 2010.

SHAWCROSS, D L *et al.* Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, v. 22, n. 1, p. 125–138, mar. 2007.

SHAWCROSS, Debbie L. *et al.* Ammonia and the neutrophil in the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology*, v. 51, n. 3, p. 1062–1069, 2010.

SHERLOCK, Sheila. of Electroencephalogram A fair correlation exists between the neuropsychiatric. n. 1955, p. 867–871, 1956.

SONG, Cai; ZHANG, Ye; DONG, Yilong. Acute and subacute IL-1 β administrations differentially modulate neuroimmune and neurotrophic systems: Possible implications for neuroprotection and neurodegeneration. *Journal of Neuroinflammation*, v. 10, p. 1–15, 2013.

STEPANOVA, Maria *et al.* In-Hospital Mortality and Economic Burden Associated

- With Hepatic Encephalopathy in the United States From 2005 to 2009. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 10, n. 9, p. 1034–1041.e1, 2012.
- TAYLOR, Nicholas J. *et al.* Circulating neutrophil dysfunction in acute liver failure. *Hepatology*, v. 57, n. 3, p. 1142–1152, 2013.
- TENORIO-LARANGA, Jofre *et al.* The expression levels of prolyl oligopeptidase responds not only to neuroinflammation but also to systemic inflammation upon liver failure in rat models and cirrhotic patients. *Journal of Neuroinflammation*, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2015.
- TRYC, Anita B. *et al.* Cirrhosis-related Parkinsonism: Prevalence, mechanisms and response to treatments. *Journal of Hepatology*, v. 58, n. 4, p. 698–705, 2013.
- VAQUERO, Javier; CHUNG, Chuhan; BLEI, Andres T. Brain edema in acute liver failure. A window to the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Annals of hepatology : official journal of the Mexican Association of Hepatology*, v. 2, n. 1, p. 12–22, 2003.
- VICTORIA, Edna Constanza Gómez *et al.* Knockdown of C-C Chemokine Receptor 5 (CCR5) is Protective Against Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury. *Current Neurovascular Research*, v. 14, n. 2, p. 125–131, 2017..
- VILSTRUP, Hendrik *et al.* 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. *Journal of Hepatology*, v. 61, n. 3, p. 642–659, 2014.
- WALF, Alicia A; FRYE, Cheryl A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, v. 2, p. 322, 1 mar. 2007.
- WATANABE, Masayoshi *et al.* Behavioral and Electroencephalographic Studies of Beagles with an Eck ' s Fistula : Suitability as a Model of Hepatic Encephalopathy. v. 57, n. 96, p. 367–375, 1997.
- WEISSENBORN, Karin *et al.* Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *Journal of Hepatology*, v. 34, n. 5, p. 768–773, 2001.
- WONG, Robert J.; GISH, Robert G.; AHMED, Aijaz. Hepatic encephalopathy is associated with significantly increased mortality among patients awaiting liver transplantation. *Liver Transplantation*, v. 20, n. 12, p. 1454–1461, 2014.
- XU, Danfeng *et al.* Brain-derived neurotrophic factor reduces inflammation and hippocampal apoptosis in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Journal of Neuroinflammation*, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2017.
- YUAN, Lan Ting *et al.* Multiple bacterial infections increase the risk of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *PLoS ONE*, v. 13, n. 5, p. 1–14, 2018.
- ZEMTSOVA, Irina *et al.* Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. *Hepatology*, v. 54, n. 1, p. 204–215, 2011.
- ZHANG, Y *et al.* Computational model of a positive BDNF feedback loop in hippocampal neurons following inhibitory avoidance training. *Learn Mem.* 2016;23(12):714-722.

ZIMMERMANN, C *et al.* Hepatic encephalopathy in thioacetamide-induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission. *Hepatology*. 1989 Apr;9(4):594-601.

ANEXO I

Hepatic Encephalopathy: lessons from preclinical studies

Running title: Preclinical studies in hepatic encephalopathy

From: BPG Publication Fee <publicationfee@wjgnet.com>

Sent: Monday, January 28, 2019 9:58 PM

To: acsilva@hotmail.com

Cc: luizaciaglia@hotmail.com; mirandas.aline@gmail.com; kineacts@yahoo.com.br; milenerachid@gmail.com

Subject: World Journal of Hepatology Manuscript acceptance-Manuscript NO: 41893

Dear Dr. Simoes e Silva,

We are pleased to inform you that your paper has successfully passed our very rigorous review process and has been accepted for publication in the [World Journal of Hepatology](#). We are happy to tell you that this paper will be given priority for publishing, with all publishing fees waived.

BASIC INFORMATION OF THE MANUSCRIPT

Manuscript NO: 41893

Manuscript Type: Minireviews

Title: Hepatic encephalopathy: Lessons from preclinical studies

Authors: Luiza Cloglia Dias Lima, Aline Silva Miranda, Rodrigo Novaes Ferreira, Milene Alvarenga Rachid and Ana Cristina Simoes e Silva

Correspondence to: Ana Cristina Simoes e Silva, MD, PhD, Full Professor, Research Scientist, Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, UFMG, Avenida Alfredo Balena, 190, 2o andar, sala 281, Belo Horizonte 30130-100, Minas Gerais, Brazil. acsilva@hotmail.com

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Copyright: © The Author(s) 2019. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Received Date: 2018-08-28

Accepted Date: 2019-01-28

In Press: <https://www.fjgpublishing.com/ArticleInPressDetail?id=41893>

On behalf of the Editors of the [World Journal of Hepatology](#), I would like to thank you for your support. We look forward to your continued contributions to the journal.

Luiza Cioglia Dias Lima¹, Aline Silva Miranda^{2,3}, Rodrigo Novaes Ferreira²,
Milene Alvarenga Rachid¹, Ana Cristina Simões e Silva³

¹Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

²Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

³Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

*Corresponding author:

Ana Cristina Simoes e Silva, MD, PhD

Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina –
UFMG

Avenida Alfredo Balena, 190, 2o andar, sala 281 – Belo Horizonte, Minas Gerais,
Brazil – 30130-100

E-mail: acssilva@hotmail.com, ana@medicina.ufmg.br

Phone: +55-31-34098073

Orcid number: 0000-0001-9222-3882

Author contributions: Lima LCD, Miranda AS, Ferreira RN, Rachid MA, Simões e Silva AC contributed equally to this work, designed and performed the research and analyzed the data.

Conflict-of-interest statement: The authors declare that they do not have any conflict of interest.

Abstract

Hepatic encephalopathy is a major complication closely related to the progression of end-stage liver disease. Metabolic changes in advanced liver failure can promote cognition impairment, attention deficits and motor dysfunction that may result in coma and death. HE can be subdivided according to the type of hepatic injury in acute liver failure (type A), associated with a portosystemic shunting without intrinsic liver disease (type B) and due to chronic liver disease (type C). Several studies have investigated the pathogenesis of the disease and most of the mechanisms have been explored by means of the use of animal models. This article aimed to review the use of preclinical models to investigate hepatic encephalopathy. The most used animal species are rats and mice. Experimental models of type A include surgical procedures and the administration of hepatotoxic medications, whereas models of types B and C are in general surgically induced lesions in liver tissue, which evolve to hepatic cirrhosis. Preclinical models have allowed the comprehension of the pathways related to HE.

Keywords: hepatic encephalopathy; acute liver failure; preclinical studies; hepatic cirrhosis; neuroinflammation; hyperammonemia

Core tip:

Lima LCD, Miranda AS, Ferreira RN, Rachid MA, Simões e Silva AC. In this article, we have described the use of preclinical models to investigate hepatic encephalopathy. We have briefly described the applicability and the characteristics of these experimental models.

1 - Introduction

Hepatic encephalopathy (HE) is defined as a neuropsychiatric syndrome that occurs in patients with acute or chronic liver diseases [1]. Clinically, it is characterized by a spectrum of symptoms including cognition impairment, altered levels of consciousness that may progress to coma and death [2]. The risk of mortality usually has been related with higher grades of HE and the incidence of this disease increased in patients that had frequent infections [3, 4]. Patients with HE led to a great impact on the quality of life and high costs caused by increased healthcare utilization [5, 6].

The pathophysiology of HE is not completely understood and several studies have shown biochemical disturbances with elevation of serum ammonia levels and increased oxidative stress in blood, alterations of neurotransmission systems, development of brain edema, astrocyte swelling and inflammation [8]. A wide range of animals including dogs, goats, pigs, rabbits, guinea pigs, rats and mice have been used for better understanding the mechanisms underlying HE pathogenesis and for the development of novel therapeutic agents for HE, providing a basis for future clinical research. Therefore, the objective of this brief review is to discuss relevant aspects of the HE pathogenesis and the currently animal models employed, which may closely resemble the disease in humans.

2 - Hepatic Encephalopathy

Hepatic Encephalopathy (HE) is a central nervous system (CNS) dysfunction resulted from acute or chronic liver failure that leads to a wide range of neuropsychiatric manifestations [7]. Clinically, patients with HE may present sleep-wake cycle disturbance, personality changes, cognitive, motor activity and coordination dysfunctions, which ultimately progress to stupor, coma and death. Importantly, HE often affects health-related quality of life, clinical management strategies, liver transplant priority, and patient survival [8].

According to the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD) updated guideline, the HE should be classified as type A, B, or C

based on the underlying disease. The type A (acute) results from an acute liver failure (ALF), the type B (by pass) is associated with a portosystemic shunting without intrinsic liver disease and type C (chronic) is due to cirrhosis [7]. The incidence of ALF is low, being around 2,000 people per year in the USA or Europe [8, 9]. However, the mortality of ALF is high and mostly attributed to fast progression to HE, leading to cerebral edema, increased intracranial pressure and cerebral herniation [8, 9].

On the other hand, chronic liver diseases are highly prevalent, affecting approximately 5.5 million individuals only in the USA. Around 80% of patients with cirrhosis will develop a less severe form of HE, known as minimal HE (MHE), which is characterized by mild cognitive impairment, attention deficits, psychomotor slowing and impaired visuomotor and bimanual coordination [10]. The MHE is detected only by employing psychometric or neurophysiological tests, and is considered an important predictive factor for the development of HE, since 30-40% of cirrhotic patients progress to this later condition [10, 11]. Apart from its educational and social impact, HE also carries out a significant economic burden. For instance, in 2009, in the USA, HE leads to approximately 22,931 hospitalizations with an average cost of each stay ranging from 46,663 to 63,108 USD [8].

The broad spectrum of HE, especially regarding the type of underlying disease, severity of clinical manifestations, and precipitating factors (e.g. infections, gastrointestinal bleeding and drugs toxicity) should be considered to understand the pathophysiological mechanisms of HE as well as to identify potential therapeutic targets [12].

3 - Hepatic Encephalopathy Pathophysiology

HE is a complex condition whose cellular and molecular mechanism remain to be fully elucidated. Over the past decades, some hypotheses have been proposed, including neurotransmitter systems dysfunction, impaired energy and lactate metabolisms and oxidative stress (for review see [1, 13]). However, the hyperammonemia and the neuroinflammation hypotheses have

been the mostly recognized ones and will be briefly revisited in the current review. Figure 1 shows the main pathophysiological features of the available models of HE.

3.1 - Hyperammonemia

Currently, increased systemic and brain levels of ammonia are the main factors implicated in HE pathogenesis. Under physiological conditions, the ammonia, resulting from nitrogenous compounds like proteins metabolized by gut microflora, is metabolized in the liver via the urea cycle forming urea, which is mainly excreted by the kidneys. ALF, portosystemic shunting or chronic liver disease can impair liver function, leading to increased levels of ammonia in the blood [14].

Ammonia metabolism in the liver depends on the phosphate-activated glutaminase (PAG) that catalyzes the hydrolysis of glutamine to produce glutamate, energy, nucleotide synthesis and ammonia. PAG has two isoforms, the hepatic type (L-PAG), restricted to the liver, and the kidney-type (K- PAG), found in the kidney and also in the brain and in villus of the enterocytes, especially in the small intestine. Interestingly, PAG activity in the intestine has been associated with increased systemic levels of ammonia during liver cirrhosis and seems to play a major role in the pathogenesis of hepatic encephalopathy [15,16].

As the levels of ammonia enhance systemically, the molecule crosses the blood-brain barrier and starts to be metabolized in the CNS [14]. The ammonia detoxification in the brain requires its incorporation into glutamine by the action of the enzyme glutamine synthetase, which is present only in astrocytes. The glutamine accumulation in astrocytes as a result of ammonia detoxification results in increased water entry and osmotic forces, ultimately inducing astrocytes to swelling and cytotoxic edema [17]. The impact of hyperammonemia in astrocytes function in response to HE remains to be fully elucidated. However, it has been reported that, apart from increasing oxidative stress and osmotic pressure, hyperammonemia may also influence

inflammatory and signal transduction pathways [18, 19], gene expression and neurotransmitters release [20] as well as post-translational protein modifications [21].

Although a great deal of attention continues to be focused on ammonia as the main toxin related to HE pathogenesis, there is evidence that patients with elevated levels of systemic and local ammonia may not present HE symptoms and the ammonia concentration is not always consistent with the severity of HE in cirrhotic patients [22, 23]. Moreover, ammonia-lowering agents including L-ornithine, L-aspartate and lactulose have so far been of limited value in preventing HE in ALF and in cirrhosis [24-26], supporting a role for other factors alone or in association with ammonia in the development of HE. For instance, the effect of the Glycerol Phenylbutyrato (GPB), approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 2013 for the treatment of urea cycle disorders, was investigated in a randomized, double-blind, placebo-controlled phase II trial with cirrhotic patients who experienced two or more hepatic encephalopathy (HE) events in the last 6 months. The GPB acts as a lowering-ammonia agent by producing phenylacetyl glutamine, which is excreted in urine. GPB treatment in cirrhotic patients decreased plasma levels of ammonia, the proportion of patients who experienced an HE and hospitalizations due to HE. These findings supported the involvement of ammonia in HE pathophysiology and the potential therapeutic role of GPB [27].

3.2 - Neuroinflammation

In addition to the ammonia hypothesis, brain inflammation also known as neuroinflammation is thought to be a major component in the development of HE. Clinical and experimental evidence of activation of microglia, the brain resident immune cells, in response to ALF and cirrhosis extensively supported the neuroinflammation hypothesis [28-32]. For instance, increased expression of the major histocompatibility complex class II antigen marker CD11b/c (also called OX-42), an indicator of microglial activation, was found in an ALF model following liver ischemia in rats [30]. Importantly, the administration of

minocycline, a potent inhibitor of microglial activation, attenuates the encephalopathy grade and prevents brain edema in the same ALF experimental model [32]. Corroborating these findings, increased expression of microglial activation markers including human leukocyte antigen DR (CR3/43) and ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba-1) was found in the CNS of patients with ALF associated with viral hepatitis [29] and in liver cirrhosis [31], respectively.

Microglial activation has been often associated with increased release of cytokines and chemokines, which are also implicated in the pathogenesis of neurodegenerative and neuropsychiatric diseases [33, 34]. A first evidence of up-regulation of inflammatory molecules in HE was obtained in a study of patients with ALF due to acetaminophen overdose. The levels of inflammatory cytokines (TNF, IL-1 β and IL-6) were measured in blood samples from an artery and a reverse jugular catheter. Increased arterial cytokine levels correlated with intracranial hypertension. Brain cytokine efflux was noted, indicating brain cytokine production in these patients [35]. Supporting data was also provided by several studies employing pharmacological and non-pharmacological liver failure models in rodents, which also showed increased levels of inflammatory cytokines (TNF, IL-1 β and IL-6) and of chemokines like CXCL-1, CCL2, CCL3, CCL5 and CX3CL1 [30, 32, 36-38]. Importantly, anti-inflammatory based strategies attenuated cognitive decline and motor activity impairment, supporting the involvement of neuroinflammation in HE pathophysiology [39-42]. It is worth mentioning that ammonia alone is capable to induce microglial and astrocyte activation, leading to increase expression of inflammatory cytokines as IL-1 β and IL-6. This finding suggests that hyperammonemia may trigger neuroinflammation in HE in a synergistic manner. However, a direct linking between both mechanisms is still missing [43].

4 - Preclinical models

4.1 - Choice of animal species

In 2008, a commission formed by members of ISHEN (International Society of Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism) gathered in Padua, Italy, to establish guidelines for HE animal models. Due to the variety of etiologies of hepatic dysfunction and the many factors that may influence the development of neurological symptoms, HE is considered difficult to reproduce faithfully in animals. Table 1 summarizes the main advantages and disadvantages of the available HE models. Nowadays, there is not an ideal animal model to resemble hepatic failure caused by ethanol, virus or acetaminophen, the most common etiologies in human beings [44].

The availability of animal models is indispensable to study the mechanisms of diseases and possible therapies [45]. Many animal species have been used for the study of HE, including dogs, goats, pigs, rabbits, guinea pigs, rats and mice. Large animals are advantageous in regard to neurological examination and to availability of biological samples, like blood samples, body fluids and biopsies, but are rarely used due to the cost of the animals, the maintenance and ethical concerns. The most common species currently used in HE models are rats and mice, mainly due to accessibility of molecular and anatomical studies, and literature about behavioral, pathological and biochemical methods and findings. Other advantages of these species are the complete characterization of the genome, easy achievement of antibodies and molecular probes and low costs to obtain and maintain the animals [44].

4.2 - Animal HE models of acute liver failure (type A)

According to the HE guidelines established by ISHEN, an animal model of HE in ALF has to essentially reproduce clinical picture, to facilitate staging of encephalopathy and to show the progression of symptoms, including brain edema and its complications (intracranial hypertension and brain herniation). The model should have also been capable of being reversed, with high concentrations of ammonia and glutamine in the brain, classical hepatic and brain pathology and minimal hazard to personnel from toxins and infectious agents. All animal models of ALF produce hypothermia and

hypoglycemia, being essential to control the temperature and glucose levels, and to provide supportive care to the animals. A brief description of ALF models is presented in table 2.

4.2.1) *Pharmacological Models*

Several hepatotoxins have been extensively used in the development of animal models of ALF [46]. The main hepatotoxic substances used to cause ALF in animals include galactosamine, acetaminophen, azoxymethane (AOM) and thioacetamide (TAA) [44]. Although the administration of carbon tetrachloride (CCL₄) has been primarily described as type A HE model, the acute liver failure and behavioral changes in this model are not commonly observed. On the other hand, the ability of this model to induce liver cirrhosis makes it a valuable tool to study type C HE [44]. Thus, in the current review, the CCL₄ will be discussed as a Type C HE model.

4.2.1.a) Thioacetamide

Until 1943, thioacetamide was used as fungicide in orange crops. In 1948, it was discovered that chronic administration of the substance led to liver cirrhosis and hepatocellular carcinomas. TAA causes hepatocellular necrosis after biotransformation to an active metabolite via the flavin adenine dinucleotide monooxygenase pathway, resulting in the formation of TAA-S-oxide [47]. TAA reduces antioxidant activity and enhances lipid peroxidation in the liver, leading to oxidative stress and cellular necrosis [48]. The most common forms of administration of TAA are oral (in drinking water) and intraperitoneal injection [49]. TAA has been extensively used as a model of ALF in rats and mice, producing encephalopathy, metabolic acidosis, high transaminases, abnormal coagulopathy and histological centrilobular necrosis. The TAA model of HE shows good reproducibility and well-described hepatic and cerebral changes [50-52]. Chronic administration can produce hepatic cirrhosis [49, 53, 54].

4.2.1.b) D-Galactosamine

D-Galactosamine (D-Gal) is an amino sugar and is metabolized in the liver, causing depletion of uridine nucleotides and blockade of transcriptional factors in the liver. The hepatic failure resulting from D-Gal administration has been, at least in part, associated with the production of uridine-containing compounds during hepatic biotransformation [55]. The administration of D-Gal in rats was described by Keppler et al. [56] as an acute hepatic failure model that induced encephalopathy and increased aspartate transaminase, prothrombin time, ammonia and intracranial pressure. This same model was described by Blitzler et al. [57] in rabbits, and by Sielaff et al. [58] and Diaz Buxo et al. [59] in dogs.

There are differences in species susceptibility. Mice are resistant until high doses are administered, while rats are sensitive to D-Gal-induced hepatic failure [60]. D-Galactosamine and APAP models cause liver failure although the development of HE is variable. Both models are difficult to reproduce and have poorly characterized cerebral pathology [44].

4.2.1.c) Acetaminophen

Acetaminophen is known as APAP (in United States) and Paracetamol (in Europe and other areas of the world). Acetaminophen has been widely used as an antipyretic and/or analgesic since 1955, particularly due to the fact that it is easily accessible in various formulations as an over-the-counter medication. However, acetaminophen is one of the most common causes of acute liver failure, accounting for more than 60% of all cases in the United States [61].

The metabolism of APAP occurs in the liver. Under normal circumstances, the drug undergoes biotransformation by a combination of glucuronidation, sulphation and is then excreted by the kidneys. When excessive amounts of acetaminophen are administered, these metabolic pathways are saturated and APAP is metabolized by the P450 cytochrome oxidase enzyme system, leading to the formation of a toxic electrophile N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI), which causes cell injury unless conjugated with endogenous glutathione. NAPQI is thought to interrupt

mitochondrial calcium flux resulting in cell damage by the formation of free radical oxygen species, hydroxyl radicals, nitrites and nitrates. The cascade is amplified by the activation of Kupffer cells and the production of cytotoxic mediators (e.g. cytokines and free radicals), leading to apoptosis and cell necrosis [62-65].

Miller et al. [66] reported a model of APAP-induced liver failure in pigs. Animals exhibited metabolic acidosis, encephalopathy, coma, raised transaminases and histological evidence of severe centrilobular coagulative necrosis. However, changes produced by APAP administration were variable according to animal species used, as was described by Gazzard et al. [67], who showed variable clinical outcome in greyhound dogs.

Later, Francavilla et al. [68] induced ALF by APAP administration for the first time in beagles. The authors compared the routes of administration: intravenous, intramuscular and subcutaneous. APAP toxicity was very variable in different animal models and the incidence of sudden death due to methaemoglobinaemia was a frequent problem. This drug exhibited cardiotoxicity and nephrotoxicity that was associated with acute lung injury [69-71].

4.2.1.d) Azoxymethane

Azoxymethane (AOM) is an active metabolite of the cycad palm nut found on the island of Guam. AOM is a potent hepatotoxin that induces ALF in mice in a dose-dependent fashion. Liver toxicity has also been reported in humans, livestock and rats following the ingestion of Guam cycad palm nuts due to AOM toxicity. AOM model was first described as a model of hepatotoxin-induced liver failure and hepatic encephalopathy by Matkowskyj et al. [72]. This model leads to encephalopathy, cerebral edema, elevated brain ammonia and unbalanced amino acid levels. This model also shows characteristic pathologic aspects [28].

The AOM model generates microvesicular steatosis, dilation of hepatic sinusoids, and hepatocyte necrosis in addition to elevations of serum

transaminases and bile acids with the largest increases when mice progressed toward coma [73].

4.2.2) *Surgical Models*

The surgical models can be divided into variations of partial and total hepatectomy, and partial and complete devascularization of the liver [46].

4.2.2.a) Hepatic devascularization

Rappaport was the first to describe a devascularization model, in 1953 [74]. The model is usually produced by a portocaval anastomosis (PCA) with subsequent hepatic artery ligation (HAL). ALF can be reversible by the occlusion of the hepatic artery for only a short period of time. There is no blood lost. The presence of necrotic hepatic tissue is comparable to ALF in humans [45]. Hypoxic insult leads to dysfunction of the mitochondrial respiratory chain, which, in turn, reduces ATP levels due to impaired oxidative phosphorylation, interferes with the intracellular calcium homeostasis and activates enzymes responsible for protein, lipid and DNA damage. After hypoxic injury, the reperfusion process induces more damage in liver tissue [75-77].

4.2.2.b) Hepatectomy

Hepatectomy is considered a model of post-operative liver failure (POLF) that can accurately reproduce all neurological and metabolic changes as a consequence of extensive liver resections in humans [78]. Almost 100% survival and intense regeneration occur in partial hepatectomy that removes about 70% of the liver in rats and pigs [79-81]. On the other hand, progressive necrosis follows partial resections of the liver as reported by Panis et al. [82]. Among other disadvantages of partial hepatectomy are the lack of consistency of injury degree, and the increased intraoperative blood loss. Additionally, the surgery often hampers animal's capability to immediately restore drink and food consumption, which may lead to severe hypoglycemia and death [83].

The altered physiological state is attribute to increased total blood flow through the remnant liver tissue, leading to flow injury and damage to sinusoidal endothelial cells, activation of Kupffer cells and release of inflammatory cytokines [84] This model is also associated with increased levels of aspartate transaminase (AST), tumor necrosis factor (TNF) and hypoglycemia [85].

The “anhepatic” model is made by the total removal of the liver. In clinical practice, the total hepatectomy has been performed only in cases of very severe ALF, pending the arrival of a donor liver, which follows the removal of a “toxic” organ [86, 87]. Overall, the anhepatic model seems not to be suitable for assessing therapies as the artificial liver support in the setting of the ALF Moreover, due to the lack of the liver, this model is of very poor reversibility [46].

4.3 - Animal HE models of types B and C

An ideal model of HE classified as type B or C should have some essential features, including a precipitant factor and neuropathological findings of HE, such as symptoms of encephalopathy, ranging from minimal hepatic encephalopathy (MHE) to coma. Additionally, increased brain ammonia/glutamine besides low-grade brain edema and Alzheimer Type II astrocytosis at advanced stages of HE might also be observed. These models should exhibit clinical response to established treatments [29]. Table 3 displays animal models of HE associated with portosystemic shunting (type B) and with chronic liver disease (type C).

Type B Hepatic Encephalopathy

As previously mentioned, type B animal models of HE are based on portal-systemic shunting and included the following approaches.

4.3.1) Portacaval anastomosis

Portacaval anastomosis (PCA) is the most used animal model in the study of chronic HE. The basis of this model is the creation of a portal-systemic shunt (end-to-side PCA) that mimics the situation induced in cirrhosis by collateral circulation [45].

It is known that the deviation of portal blood decreases the total hepatic blood flow, depriving the liver of oxygen and hepatotrophic factors from the portal vein, necessary to metabolic processes. These phenomena induce hepatic parenchyma atrophy. Among other factors, the high levels of ammonia, as a consequence of reduced hepatic metabolism, contribute to HE. The severity of neurological manifestations depends on the intensity of liver injury. Animals submitted to PCA have increased brain ammonia/glutamine, altered circadian cycle, hypokinesia, reduced memory and learning ability [88].

4.3.2) Congenital portacaval shunts

Dogs and cats with congenital portacaval shunts are considered naturally occurring models of type B HE. These animals develop psychomotor dysfunction, abnormal motor signs, altered day-night rhythms, hyperammonemia, and hepatic dysfunction [89].

4.3.3) Graded portal vein stenosis

Graded portal vein stenosis provides a minimal hepatic encephalopathy (MHE) model in rats. This procedure is easier to perform than the end-to-side portacaval anastomosis. Alterations associated with this model are hypoactivity, altered circadian cycle and increased brain ammonia/glutamine [44].

Type C Hepatic Encephalopathy

Animal models of type C HE should lead to decompensated liver cirrhosis. It is worth noting that there is not an ideal animal model of type C HE

at the present time [44]. Some models that resemble human hepatic cirrhosis have been employed as described below.

4.3.4) Carbon Tetrachloride CCl₄

Carbon Tetrachloride (CCl₄) was extensively used in the seventies as a model of acute hepatic failure, but the species variation was significant, and it was difficult to reproduce. It has been used more recently in the study of liver cirrhosis [90, 91]. CCl₄ is metabolized by cytochrome P-450, generating free radicals, causing lipoperoxidation, increased hepatic membrane permeability, tissue fibrosis and hepatic failure. This model does not seem to produce many behavioral changes, except in cases of advanced cirrhosis [92]. It is used in the study of astrocytic response at the level of RNA synthesis. Inconsistent lesions animal to animal may represent a major disadvantage. Moreover, the presence of ascites may limit neurobehavioral assessment [44].

4.3.5) Bile duct ligation

The ligation of the common bile duct (BDL) induces a reproducible model of biliary cirrhosis in rats, leading to liver failure, portal hypertension, translocation of bacteria and immune system dysfunction. BDL rats show hyperammonemia and decreased motor activities, but only low-grade encephalopathy [45, 93-95]. It is possible to reproduce the human neuropathology of type C HE, Alzheimer type II astrocytosis, altered brain osmolytes, low-grade brain edema, inflammation and motor activity deficits by feeding BDL rats with ammonium salts. Of note, by giving ammonium salts to BDL rats, it is possible to obtain a model of acute-on-chronic HE [96].

5. HE models resulting from pure hyperammonemia

These models are usually limited to rats and mice, and are used to study the effects of hyperammonia on brain function, in the absence of liver damage or portacaval shunting. It is produced by means of the administration of high-ammonia diets, parenteral infusion of ammonia or urease treatment. These

models are inexpensive and easily reproducible and result in animals with impaired memory and learning skills [44]. However, the disadvantages of these models included time-consuming to produce alterations and that they are not suitable for long-term studies [45].

6 - Concluding remarks

HE is a very severe complication in the context of liver failure. HE can be subdivided according to the type of hepatic injury in acute liver failure (type A), associated with a portosystemic shunting without intrinsic liver disease (type B) and due to chronic liver disease (type C). The pathophysiology of HE has two major factors: increased ammonia levels and neuroinflammation.

Preclinical models have been very useful in investigating the mechanisms of HE and in evaluating novel therapeutic approaches. The most used animal species are rats and mice. Experimental models of ALF (type A) include surgical procedures (hepatectomy and hepatic devascularization) and the administration of hepatotoxic medications. Surgical models resemble post-operative liver failure in humans, whereas pharmacological models are similar to adverse drug reactions due to hepatotoxicity.

Ideally, models of HE associated to portosystemic shunting (type B) and due to chronic liver disease (type C) must exhibit liver cirrhosis, a precipitant factor, neuropathological and neurochemical alterations. These models are in general surgically induced lesions in liver tissue, which evolve to hepatic cirrhosis.

In conclusion, preclinical models have allowed the comprehension of the pathways related to neurological damage as a consequence of acute and chronic liver injury, resulting in the identification of potential therapeutic targets.

6 - References

1 Butterworth RF. The concept of "the inflamed brain" in acute liver failure: mechanisms and new therapeutic opportunities. *Metabolic brain disease*. 2016; 1283 [PMID: 26481639 10.1007/s11011-015-9747-0: 10.1007/s11011-015-9747-0]

2 Wang AJ, Peng AP, Li BM, Gan N, Pei L, Zheng XL, Hong JB, Xiao HY, Zhong JW, Zhu X. Natural history of covert hepatic encephalopathy: An observational study of 366 cirrhotic patients. *World journal of gastroenterology*. 2017: 6321 [PMID: 28974899 10.3748/wjg.v23.i34.6321: 10.3748/wjg.v23.i34.6321]

3 Wong RJ, Gish RG, Ahmed A. Hepatic encephalopathy is associated with significantly increased mortality among patients awaiting liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2014: 1454 [PMID: 25155379 10.1002/lt.23981: 10.1002/lt.23981]

4 Yuan L-T, Chuah S-K, Yang S-C, Liang C-M, Wu C-K, Tai W-C, Hung T-H, Nguang S-H, Wang J-W, Tseng K-L, Ku M-K, Hsu P-I, Wu D-C, Hsu C-N. Multiple bacterial infections increase the risk of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *PLOS ONE*. 2018: e0197127 10.1371/journal.pone.0197127: 10.1371/journal.pone.0197127]

5 Flamm SL. Considerations for the cost-effective management of hepatic encephalopathy. *The American journal of managed care*. 2018: S51 [PMID: 29521513]

6 Roggeri DP, Roggeri A, Rossi E, Cinconze E, Gasbarrini A, Monici Preti P, De Rosa M. Overt hepatic encephalopathy in Italy: clinical outcomes and healthcare costs. *Hepatic Medicine : Evidence and Research*. 2015: 37 [PMID: PMC4506032 10.2147/HMER.S87594: 10.2147/HMER.S87594]

7 Vilstrup H, Amodio P, Bajaj J, Cordoba J, Ferenci P, Mullen KD, Weissenborn K, Wong P. 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. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2014: 715 [PMID: 25042402 10.1002/hep.27210: 10.1002/hep.27210]

8 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. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2012: 1034 [PMID: 22642955 10.1016/j.cgh.2012.05.016: 10.1016/j.cgh.2012.05.016]

9 Bernal W, Wendon J. Acute Liver Failure. *New England Journal of Medicine*. 2013: 2525 10.1056/NEJMra1208937: 10.1056/NEJMra1208937]

- 10 Ortiz M, Jacas C, Cordoba J. Minimal hepatic encephalopathy: diagnosis, clinical significance and recommendations. *Journal of hepatology*. 2005: S45 [PMID: 15777572 10.1016/j.jhep.2004.11.028: 10.1016/j.jhep.2004.11.028]
- 11 Basu PP, Shah NJ. Clinical and Neurologic Manifestation of Minimal Hepatic Encephalopathy and Overt Hepatic Encephalopathy. *Clinics in liver disease*. 2015: 461 [PMID: 26195201 10.1016/j.cld.2015.05.003: 10.1016/j.cld.2015.05.003]
- 12 Felipo V. Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nature reviews Neuroscience*. 2013: 851 [PMID: 24149188 10.1038/nrn3587: 10.1038/nrn3587]
- 13 Liere V, Sandhu G, DeMorrow S. Recent advances in hepatic encephalopathy. *F1000Research*. 2017: 1637 [PMID: PMC5583742 10.12688/f1000research.11938.1: 10.12688/f1000research.11938.1]
- 14 Parekh PJ, Balart LA. Ammonia and Its Role in the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. *Clinics in liver disease*. 2015: 529 [PMID: 26195206 10.1016/j.cld.2015.05.002: 10.1016/j.cld.2015.05.002]
- 15 Romero-Gomez M, Jover M, Galan JJ, Ruiz A. Gut ammonia production and its modulation. *Metabolic brain disease*. 2009: 147 [PMID: 19067141 10.1007/s11011-008-9124-3: 10.1007/s11011-008-9124-3]
- 16 Romero-Gomez M, Ramos-Guerrero R, Grande L, de Teran LC, Corpas R, Camacho I, Bautista JD. Intestinal glutaminase activity is increased in liver cirrhosis and correlates with minimal hepatic encephalopathy. *Journal of hepatology*. 2004: 49 [PMID: 15246207 10.1016/j.jhep.2004.03.021: 10.1016/j.jhep.2004.03.021]
- 17 Romero-Gomez M, Montagnese S, Jalan R. Hepatic encephalopathy in patients with acute decompensation of cirrhosis and acute-on-chronic liver failure. *Journal of hepatology*. 2015: 437 [PMID: 25218789 10.1016/j.jhep.2014.09.005: 10.1016/j.jhep.2014.09.005]
- 18 Liang C, Du T, Zhou J, Verkhatsky A, Peng L. Ammonium Increases Ca²⁺ Signalling and Up-Regulates Expression of TRPC1 Gene in Astrocytes in Primary Cultures and in the In Vivo Brain. *Neurochemical research*. 2014: 2127 [PMID: 25218789 10.1007/s11064-014-1406-z: 10.1007/s11064-014-1406-z]

- 19 Wang F, Du T, Liang C, Verkhatsky A, Peng L. Ammonium increases Ca(2+) signalling and upregulates expression of Cav1.2 gene in astrocytes in primary cultures and in the in vivo brain. *Acta physiologica* (Oxford, England). 2015: 261 [PMID: 25846713 10.1111/apha.12500: 10.1111/apha.12500]
- 20 Sobczyk K, Jordens MS, Karababa A, Gorg B, Haussinger D. Ephrin/Ephrin receptor expression in ammonia-treated rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. *Neurochemical research*. 2015: 274 [PMID: 25064044 10.1007/s11064-014-1389-9: 10.1007/s11064-014-1389-9]
- 21 Karababa A, Gorg B, Schliess F, Haussinger D. O-GlcNAcylation as a novel ammonia-induced posttranslational protein modification in cultured rat astrocytes. *Metabolic brain disease*. 2014: 975 [PMID: 24292976 10.1007/s11011-013-9454-7: 10.1007/s11011-013-9454-7]
- 22 Ong JP, Aggarwal A, Krieger D, Easley KA, Karafa MT, Van Lente F, Arroliga AC, Mullen KD. Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *The American journal of medicine*. 2003: 188 [PMID: 12637132]
- 23 Shawcross DL, Wright G, Olde Damink SW, Jalan R. Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*. 2007: 125 [PMID: 17260161 10.1007/s11011-006-9042-1: 10.1007/s11011-006-9042-1]
- 24 Acharya SK, Bhatia V, Sreenivas V, Khanal S, Panda SK. Efficacy of L-ornithine L-aspartate in acute liver failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Gastroenterology*. 2009: 2159 [PMID: 19505424 10.1053/j.gastro.2009.02.050: 10.1053/j.gastro.2009.02.050]
- 25 Jalan R. Acute liver failure: current management and future prospects. *Journal of hepatology*. 2005: S115 [PMID: 15777566 10.1016/j.jhep.2004.11.010: 10.1016/j.jhep.2004.11.010]
- 26 Sharma P, Sharma BC, Sarin SK. Predictors of nonresponse to lactulose in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2010: 526 [PMID: 20009938 10.1097/MEG.0b013e3283341b7d: 10.1097/MEG.0b013e3283341b7d]
- 27 Rockey DC, Vierling JM, Mantry P, Ghabril M, Brown RS, Jr., Alexeeva O, Zupanets IA, Grinevich V, Baranovsky A, Dudar L, Fadieienko G, Kharchenko N, Klaryts'ka I, Morozov V, Grewal P, McCashland T, Reddy KG, Reddy KR,

Syplyviy V, Bass NM, Dickinson K, Norris C, Coakley D, Mokhtarani M, Scharschmidt BF. Randomized, double-blind, controlled study of glycerol phenylbutyrate in hepatic encephalopathy. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2014; 1073 [PMID: 23847109 10.1002/hep.26611: 10.1002/hep.26611]

28 Belanger M, Cote J, Butterworth RF. Neurobiological characterization of an azoxymethane mouse model of acute liver failure. *Neurochemistry international*. 2006; 434 [PMID: 16563565 10.1016/j.neuint.2005.11.022: 10.1016/j.neuint.2005.11.022]

29 Butterworth RF. Hepatic encephalopathy: a central neuroinflammatory disorder? *Hepatology* (Baltimore, Md). 2011; 1372 [PMID: 21480337 10.1002/hep.24228: 10.1002/hep.24228]

30 Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Direct evidence for central proinflammatory mechanisms in rats with experimental acute liver failure: protective effect of hypothermia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2009; 944 [PMID: 19259110 10.1038/jcbfm.2009.18: 10.1038/jcbfm.2009.18]

31 Zemtsova I, Gorg B, Keitel V, Bidmon HJ, Schror K, Haussinger D. Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2011; 204 [PMID: 21452284 10.1002/hep.24326: 10.1002/hep.24326]

32 Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Cerebral inflammation contributes to encephalopathy and brain edema in acute liver failure: protective effect of minocycline. *Journal of neurochemistry*. 2009; 485 [PMID: 19220703 10.1111/j.1471-4159.2009.05981.x: 10.1111/j.1471-4159.2009.05981.x]

33 Blank T, Prinz M. Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. *Glia*. 2013; 62 [PMID: 22740320 10.1002/glia.22372: 10.1002/glia.22372]

34 Rodríguez JJ, Verkhratsky A. Neuroglial roots of neurodegenerative diseases? *Mol Neurobiol*. 2011; 87 [PMID: 21161612 10.1007/s12035-010-8157-x: 10.1007/s12035-010-8157-x]

35 Wright G, Shawcross D, Olde Damink SW, Jalan R. Brain cytokine flux in acute liver failure and its relationship with intracranial hypertension. *Metabolic*

brain disease. 2007: 375 [PMID: 17899343 10.1007/s11011-007-9071-4: 10.1007/s11011-007-9071-4]

36 Bemeur 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. *Neurochemistry international*. 2010: 213 [PMID: 19931338 10.1016/j.neuint.2009.11.010: 10.1016/j.neuint.2009.11.010]

37 Faleiros BE, Miranda AS, Campos AC, Gomides LF, Kangussu LM, Guatimosim C, Camargos ER, Menezes GB, Rachid MA, Teixeira AL. Up-regulation of brain cytokines and chemokines mediates neurotoxicity in early acute liver failure by a mechanism independent of microglial activation. *Brain research*. 2014: 49 [PMID: 25017944 10.1016/j.brainres.2014.07.001: 10.1016/j.brainres.2014.07.001]

38 McMillin M, Grant S, Frampton G, Andry S, Brown A, DeMorrow S. Fractalkine suppression during hepatic encephalopathy promotes neuroinflammation in mice. *Journal of neuroinflammation*. 2016: 198 [PMID: 27561705 10.1186/s12974-016-0674-8: 10.1186/s12974-016-0674-8]

39 Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Balzano T, Taoro-Gonzalez L, Ibanez-Grau A, Cabrera-Pastor A, Fustero S, Llansola M, Montoliu C, Felipo V. Sildenafil reduces neuroinflammation in cerebellum, restores GABAergic tone, and improves motor in-coordination in rats with hepatic encephalopathy. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2017: 386 [PMID: 28296282 10.1111/cns.12688: 10.1111/cns.12688]

40 Hernandez-Rabaza V, Agusti A, Cabrera-Pastor A, Fustero S, Delgado O, Taoro-Gonzalez L, Montoliu C, Llansola M, Felipo V. Sildenafil reduces neuroinflammation and restores spatial learning in rats with hepatic encephalopathy: underlying mechanisms. *Journal of neuroinflammation*. 2015: 195 [PMID: 26511444 10.1186/s12974-015-0420-7: 10.1186/s12974-015-0420-7]

41 Hernandez-Rabaza V, Cabrera-Pastor A, Taoro-Gonzalez L, Gonzalez-Usano A, Agusti A, Balzano T, Llansola M, Felipo V. Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarization of microglia. *Journal of neuroinflammation*. 2016: 83 [PMID: PMC4835883 10.1186/s12974-016-0549-z: 10.1186/s12974-016-0549-z]

42 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; 121 [PMID: 25012628 10.1186/1742-2094-11-121: 10.1186/1742-2094-11-121]

43 Hernandez-Rabaza V, Cabrera-Pastor A, Taoro-Gonzalez L, Malaguarnera M, Agusti A, Llansola M, Felipo V. Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by sulforaphane. *Journal of neuroinflammation*. 2016; 41 [PMID: 26883214 10.1186/s12974-016-0505-y: 10.1186/s12974-016-0505-y]

44 Butterworth RF, Norenberg MD, Felipo V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2009; 783 [PMID: 19638106 10.1111/j.1478-3231.2009.02034.x: 10.1111/j.1478-3231.2009.02034.x]

45 Jover R, Madaria E, Felipo V, Rodrigo R, Candela A, Compan A. Animal models in the study of episodic hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Metabolic brain disease*. 2005; 399 [PMID: 16382350 10.1007/s11011-005-7925-1: 10.1007/s11011-005-7925-1]

46 Rahman TM, Hodgson HJF. Animal models of acute hepatic failure. *International Journal of Experimental Pathology*. 2000; 145 [PMID: PMC2517718 10.1046/j.1365-2613.2000.00144.x: 10.1046/j.1365-2613.2000.00144.x]

47 Chieli E, Malvaldi G. Role of the microsomal FAD-containing monooxygenase in the liver toxicity of thioacetamide S-oxide. *Toxicology*. 1984; 41 [PMID: 6729835]

48 Hajovsky H, Hu G, Koen Y, Sarma D, Cui W, Moore DS, Staudinger JL, Hanzlik RP. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. *Chemical research in toxicology*. 2012; 1955 [PMID: 22867114 10.1021/tx3002719: 10.1021/tx3002719]

49 Fontana L, Moreira E, Torres MI, Fernandez MI, Rios A, Sanchez de Medina F, Gil A. Serum amino acid changes in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Toxicology*. 1996; 197 [PMID: 8571392]

50 Bruck R, Oren R, Shirin H, Aeed H, Papa M, Matas Z, Zaidel L, Avni Y, Halpern Z. Hypothyroidism minimizes liver damage and improves survival in rats with thioacetamide induced fulminant hepatic failure. *Hepatology* (Baltimore, Md). 1998: 1013 [PMID: 9537441 10.1002/hep.510270417: 10.1002/hep.510270417]

51 Peeling J, Shoemaker L, Gauthier T, Benarroch A, Sutherland GR, Minuk GY. Cerebral metabolic and histological effects of thioacetamide-induced liver failure. *The American journal of physiology*. 1993: G572 [PMID: 8214078 10.1152/ajpgi.1993.265.3.G572: 10.1152/ajpgi.1993.265.3.G572]

52 Zimmermann C, Ferenci P, Pifl C, Yurdaydin C, Ebner J, Lassmann H, Roth E, Hortnagl H. Hepatic encephalopathy in thioacetamide-induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission. *Hepatology* (Baltimore, Md). 1989: 594 [PMID: 2564368]

53 Nakano A, Kanda T, Abe H. Liver and Bone. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 1996: 1143 10.1111/j.1440-1746.1996.tb01843.x: 10.1111/j.1440-1746.1996.tb01843.x]

54 Petermann H, Heymann S, Vogl S, Dargel R. Phagocytic function and metabolite production in thioacetamide-induced liver cirrhosis: a comparative study in perfused livers and cultured Kupffer cells. *Journal of hepatology*. 1996: 468 [PMID: 8738734]

55 Takahashi N, Ishizuya T. Modification of D-galactosamine-induced liver damage in rats by intravenous injection of newly isolated intact splenic cells. *International journal of tissue reactions*. 1990: 39 [PMID: 2384298]

56 Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Experimental and molecular pathology*. 1968: 279 [PMID: 4952077]

57 Blitzer BL, Waggoner JG, Jones EA, Gralnick HR, Towne D, Butler J, Weise V, Kopin IJ, Walters I, Teychenne PF, Goodman DG, Berk PD. A model of fulminant hepatic failure in the rabbit. *Gastroenterology*. 1978: 664 [PMID: 631503]

58 Sielaff TD, Hu MY, Rollins MD, Bloomer JR, Amiot B, Hu WS, Cerra FB. An anesthetized model of lethal canine galactosamine fulminant hepatic failure. *Hepatology* (Baltimore, Md). 1995: 796 [PMID: 7875678]

- 59 Diaz-Buxo JA, Blumenthal S, Hayes D, Gores P, Gordon B. Galactosamine-induced fulminant hepatic necrosis in unanesthetized canines. *Hepatology* (Baltimore, Md). 1997: 950 [PMID: 9096603 10.1002/hep.510250427: 10.1002/hep.510250427]
- 60 Leist M, Gantner F, Kunstle G, Bohlinger I, Tiegs G, Bluethmann H, Wendel A. The 55-kD tumor necrosis factor receptor and CD95 independently signal murine hepatocyte apoptosis and subsequent liver failure. *Molecular medicine* (Cambridge, Mass). 1996: 109 [PMID: 8900539]
- 61 Lee KK, Wu DB, Chow PY, Lee VW, Li H. Economic analysis between entecavir and lamivudine for the treatment of chronic hepatitis B in Hong Kong. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2012: 1167 [PMID: 22141402 10.1111/j.1440-1746.2011.07047.x: 10.1111/j.1440-1746.2011.07047.x]
- 62 Black M. Acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology*. 1980: 382 [PMID: 6985598]
- 63 Boyd EM, Berezky GM. Liver necrosis from paracetamol. *British journal of pharmacology and chemotherapy*. 1966: 606 [PMID: 5959211]
- 64 Boyd EM, Hogan SE. The chronic oral toxicity of paracetamol at the range of the LD50 (100 days) in albino rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1968: 239 [PMID: 5690725]
- 65 Davidson DG, Eastham WN. Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. *British Medical Journal*. 1966: 497 [PMID: PMC1943529]
- 66 Miller DJ, Hickman R, Fratter R, Terblanche J, Saunders SJ. An animal model of fulminant hepatic failure: a feasibility study. *Gastroenterology*. 1976: 109 [PMID: 1278635]
- 67 Gazzard BG, Hughes RD, Mellon PJ, Portmann B, Williams R. A dog model of fulminant hepatic failure produced by paracetamol administration. *British journal of experimental pathology*. 1975: 408 [PMID: PMC2072783]
- 68 Francavilla A, Makowka L, Polimeno L, Barone M, Demetris J, Prelich J, Van Thiel DH, Starzl TE. A Dog Model for Acetaminophen-Induced Fulminant Hepatic Failure. *Gastroenterology*. 1989: 470 [PMID: PMC2956441]

69 Baudouin SV, Howdle P, O'Grady JG, Webster NR. Acute lung injury in fulminant hepatic failure following paracetamol poisoning. *Thorax*. 1995: 399 [PMID: 7785015]

70 Eguia L, Materson BJ. Acetaminophen-related acute renal failure without fulminant liver failure. *Pharmacotherapy*. 1997: 363 [PMID: 9085330]

71 Fujimura H, Kawasaki N, Tanimoto T, Sasaki H, Suzuki T. Effects of acetaminophen on the ultrastructure of isolated rat hepatocytes. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 1995: 345 [https://doi.org/10.1016/S0940-2993\(11\)80345-3](https://doi.org/10.1016/S0940-2993(11)80345-3); [https://doi.org/10.1016/S0940-2993\(11\)80345-3](https://doi.org/10.1016/S0940-2993(11)80345-3)

72 Matkowskyj KA, Marrero JA, Carroll RE, Danilkovich AV, Green RM, Benya RV. Azoxymethane-induced fulminant hepatic failure in C57BL/6J mice: characterization of a new animal model. *The American journal of physiology*. 1999: G455 [PMID: 10444460]

73 Grant S, McMillin M, Frampton G, Petrescu AD, Williams E, Jaeger V, Kain J, DeMorrow S. Direct Comparison of the Thioacetamide and Azoxymethane Models of Type A Hepatic Encephalopathy in Mice. *Gene expression*. 2018: 171 [PMID: 29895352 [10.3727/105221618x15287315176503](https://doi.org/10.3727/105221618x15287315176503); [10.3727/105221618x15287315176503](https://doi.org/10.3727/105221618x15287315176503)]

74 Rappaport AM, Macdonald MH, Borowy ZJ. Hepatic coma following ischemia of the liver. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1953: 748 [PMID: 13113557]

75 Borghi-Scoazec G, Scoazec JY, Durand F, Bernuau J, Belghiti J, Feldmann G, Henin D, Degott C. Apoptosis after ischemia-reperfusion in human liver allografts. *Liver transplantation and surgery : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 1997: 407 [PMID: 9346771]

76 Gasbarrini A, Colantoni A, Di Campli C, De Notariis S, Masetti M, Iovine E, Mazziotti A, Massari I, Gasbarrini G, Pola P, Bernardi M. Intermittent Anoxia Reduces Oxygen Free Radicals Formation During Reoxygenation in Rat Hepatocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997: 1067 [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00141-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00141-X); [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00141-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00141-X)]

77 Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M, Oshima A, Shito M, Kawachi S, Karahashi T, Kumamoto Y, Yoshida M, Kitajima M. Up-regulation of oxygen-

derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*. 1997: 1398 [PMID: 9392301]

78 Arkadopoulos N, Defterevos G, Nastos C, Papalois A, Kalimeris K, Papoutsidakis N, Kampouroglou G, Kypriotis D, Pafiti A, Kostopanagiotou G, Smyrniotis V. Development of a porcine model of post-hepatectomy liver failure. *The Journal of surgical research*. 2011: e233 [PMID: 21816413 10.1016/j.jss.2011.06.006: 10.1016/j.jss.2011.06.006]

79 Emond JC, Mayes JT, Rouch DA, Thistlethwaite JR, Broelsch CE. Experience with radical resection in the management of proximal bile duct cancer. *HPB surgery : a world journal of hepatic, pancreatic and biliary surgery*. 1989: 297 [PMID: 2487069]

80 Kahn D, Hickman R, Terblanche J, von Sommoggy S. Partial hepatectomy and liver regeneration in pigs--the response to different resection sizes. *The Journal of surgical research*. 1988: 176 [PMID: 3404982]

81 Wang X, Andersson R, Ding J, Norgren L, Bengmark S. Reticuloendothelial system function following acute liver failure induced by 90% hepatectomy in the rat. *HPB surgery : a world journal of hepatic, pancreatic and biliary surgery*. 1993: 151 [PMID: 8489965]

82 Panis Y, McMullan DM, Emond JC. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery*. 1997: 142 [PMID: 9037225]

83 Li J, Xiao J, So K, editors. *Research progress on hepatic encephalopathy : animal models and disease mechanisms*2015.

84 Kahn D, van Hoorn-Hickman R, Terblanche J. Liver blood flow after partial hepatectomy in the pig. *The Journal of surgical research*. 1984: 290 [PMID: 6482422]

85 Roger V, Balladur P, Honiger J, Delelo R, Baudrimont M, Robert A, Calmus Y, Capeau J, Nordlinger B. [A good model of acute hepatic failure: 95% hepatectomy. Treatment by transplantation of hepatocytes]. *Chirurgie; memoires de l'Academie de chirurgie*. 1996: 470 [PMID: 8978143]

- 86 Ejlersen E, Larsen FS, Pott F, Gyrtrup HJ, Kirkegaard P, Secher NH. Hepatectomy corrects cerebral hyperperfusion in fulminant hepatic failure. *Transplantation proceedings*. 1994: 1794 [PMID: 8030141]
- 87 Rozga J, Podesta L, LePage E, Hoffman A, Morsiani E, Sher L, Woolf GM, Makowka L, Demetriou AA. Control of cerebral oedema by total hepatectomy and extracorporeal liver support in fulminant hepatic failure. *Lancet (London, England)*. 1993: 898 [PMID: 8105168]
- 88 Hindfelt B, Plum F, Duffy TE. Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portacaval shunts. *Journal of Clinical Investigation*. 1977: 386 [PMID: PMC333373]
- 89 Maddison JE, Dodd PR, Morrison M, Johnston GA, Farrell GC. Plasma GABA, GABA-like activity and the brain GABA-benzodiazepine receptor complex in rats with chronic hepatic encephalopathy. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1987: 621 [PMID: 3038721]
- 90 Das PK, Chopra P, Nayak NC. Hepatocellular tolerance to carbon tetrachloride induced injury in the rat: a study of its nature and possible mode of evolution. *Experimental and molecular pathology*. 1974: 218 [PMID: 4370063]
- 91 Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997: 10663 [PMID: 9380692]
- 92 Mullen KD, Birgisson S, Gacad RC, Conjeevaram H. Animal models of hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *Advances in experimental medicine and biology*. 1994: 1 [PMID: 7740998]
- 93 Chan CY, Huang SW, Wang TF, Lu RH, Lee FY, Chang FY, Chu CJ, Chen YC, Chan CC, Huang HC, Lee SD. Lack of detrimental effects of nitric oxide inhibition in bile duct-ligated rats with hepatic encephalopathy. *European journal of clinical investigation*. 2004: 122 [PMID: 14764075]
- 94 Greve JW, Gouma DJ, Soeters PB, Buurman WA. Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: a study with germ-free rats. *Gastroenterology*. 1990: 478 [PMID: 2295404]

95 Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *British journal of experimental pathology*. 1984; 305 [PMID: 6743531]

96 Jover R, Rodrigo R, Felipo V, Insausti R, Saez-Valero J, Garcia-Ayllon MS, Suarez I, Candela A, Compan A, Esteban A, Cauli O, Auso E, Rodriguez E, Gutierrez A, Girona E, Erceg S, Berbel P, Perez-Mateo M. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2006; 1257 [PMID: 16729306 10.1002/hep.21180: 10.1002/hep.21180]

Figure Legends

Figure 1. Pathophysiological features of animal models of hepatic of hepatic encephalopathy.

APAP: acetaminophen; A/C Hamm: acute/chronic hyperammonia; BDL: bile duct-ligated; CCl₄: carbon tetrachloride; GP-VS: graded portal-vein stenosis; PCA: portosystemic anastomosis; TAA: thioacetamide.

Table 1 – Advantages and disadvantages of animal models of hepatic encephalopathy.

	Model features	Advantages	Disavantages
Type A Model. Encephalopathy associated with acute liver failure.	Type A models have been developed by exclusion (anhepatic models), partial removal of the liver or from the administration of a hepatotoxins.	<i>Anhepatic model:</i>	<i>Anhepatic model:</i>
		The course of HE is relatively rapid.	Neither procedure could lead to a potential recovery.
		Applied to studies of brain metabolism, neurotransmission abnormalities, gene expression and brain inflammation in ALF.	The surgical procedure lead to a great trauma to animal.
		The model responds to hypothermia, ammonia-lowering agents and anti-inflammatory drugs.	Absence of injured or necrotic hepatic cells.
			The toxic substances and inflammatory mediators present in the injured liver are not perfused into the blood circulation.
		<i>Hepatotoxic model:</i>	<i>Partial hepatectomy:</i>
		Different hepatotoxins could be used to create Type A model.	The surgery is difficult to control.
		Generally, these models produce hypothermia, hypoglycaemia and other systemic complications.	Severe hypoglycemia leads to death.
		<i>Thioacetamide:</i>	<i>Hepatotoxic model:</i>
		Model with good repeatability, easy operation, and high similarity to human HE.	Each of these toxins could produce hepatitis with variable pathological nature.
	Animal-to-animal variations leads to lack of reproducibility.		
<i>Acetaminophen:</i>	Some hepatotoxins shows extrahepatic toxicity.		
Easy preparation, low price and dose-dependence.	<i>Acetaminophen:</i>		
<i>D-galactosamine:</i>	Poor reproducibility.		
Good repeatability.	Show side effect to kidneys and other organs.		
Simulate the pathophysiological changes of acute liver failure.	<i>D-galactosamine:</i>		
Show manifestations of liver injury is similar to viral hepatic failure.	High cost, short survival time and poor stability.		
Type B Model.	Type B models have been developed by portosystemic shunting	<i>Portacaval anastomosis:</i>	<i>Portacaval anastomosis:</i>
	Can better simulate the	Cause severe coma due to	

Encephalopathy associated with portosystemic by-pass without liver disease.

(portacaval anastomosis, congenital portacaval shunts, graded portal vein stenosis, and biliary duct ligation). Different HE aspects could be assessed using different shunt methods and species (pig, dog, rabbit, rat, and mouse).

clinical mild HE phenotypes in different animal models.

(Dog) EEG changes and neurological status correlates with ammonia in the plasma.

hypersensitivity to ammonia.

(Rabbit) Portacaval anastomosis may lead to death of animal in most of the cases.

(Rat) Needs high surgical skills to perform.

Congenital portacaval shunts:

(Dogs) Naturally develop psychomotor dysfunction, reduced hepatic function, hyperammonemia, and are susceptible to high protein diets.

Congenital portacaval shunts:

Access to the animals with this congenital alteration.

Graded portal vein stenosis:

Easy to perform.

The surgery may be reversed.

(Rat) Provides a Minimal Hepatic Encephalopathy model.

(Rat) Develop loss of activity, altered circadian rhythm, hyperammonemia, and altered ammonia/glutamine in the brain.

Type C Model.

Encephalopathy associated with liver disease.

HE associated with cirrhosis and portal hypertension (Type C) is the most common form of HE in patients. At present, there is no appropriate model to study HE that occurs in liver cirrhosis, nevertheless some models have been developed.

Biliary duct ligation:

Animals develop liver failure, jaundice, portal hypertension, immune system dysfunction, and bacterial translocation.

(Rat) Reproducible model of biliary cirrhosis with the development of hyperammonemia, low-grade encephalopathy, and decreased locomotor activity.

(Rat) Bile duct-ligated animals fed with ammonium salts provides a model which reproduces the human Alzheimer Type II astrocytosis.

No satisfactory Type C animal model induced by alcoholic liver disease or viral hepatitis exist at the present time.

Biliary duct ligation:

Immune system dysfunction and other diseases may affect the final HE phenotypes. (Rat) Weight loss due to hunger suppression.

CCl₄:

Animal-to-animal variations leads to lack of reproducibility.

Limited neurobehavioral assessment due to presence of ascites.

Possible health damage when a researcher uses this chemical.

Models of acute/chronic hyperammonia.

These models are designed to study the effects of hyperammonia on brain function without liver dysfunction.

Inexpensive and simple to perform.

The model show alterations of multiple neurotransmitter systems in the brain.

The model shows impairment in learning and memory.

Limited to rats and mice.

Time-consuming; not suitable for long-term studies.

Lacks liver failure.

Table 2 – Brief description of type A animal models of hepatic encephalopathy

1. Surgical models	Species used	Main findings
1.1-Hepatic devascularization	Rat, rabbit, pig	Increased AST, hypoglycemia, lethargy and coma
1.2-Hepatectomy	Rat, pig	Increased AST, TNF, PT, NH ₃ , lactate, hypoglycemia, hepatic necrosis
2. Pharmacological models	Species used	Main findings
2.1-Galactosamine (IP, IV, SC)	Rat, rabbit, guinea pig	Increased AST, PT, NH ₃ , hepatic necrosis
2.2-Acetaminophen (IP, IV, SC, oral)	Rat, dog, pig	Increased AST, NH ₃ , bilirubin, hypoglycemia, metabolic acidosis, centrilobular coagulative necrosis
2.3-Thioacetamide (IP, oral)	Rat	Increased AST, PT, NH ₃ , metabolic acidosis, centrilobular necrosis
2.4-Azoxymethane (IP, SC)	Mouse	Increased AST, NH ₃ and bilirubin, hepatic necrosis.

Legend: AST - aspartate transaminase, TNF - tumor necrosis factor, PT - prothrombin time, NH₃ - ammonia, IP - intra-peritoneal, IV - intravenous, SC - subcutaneous

Table 3 – Brief description of findings obtained with type B and C experimental models of hepatic encephalopathy.

Experimental model	Animal species	Biological findings	Clinical Signs
Portacaval anastomosis	Rats, dog, rabbit, pig	Increased brain ammonia/glutamine	Altered circadian cycle, hypokinesia, reduced memory and learning ability
Congenital portacaval shunts	Dogs, cats	Hyperammonemia,	Hepatic dysfunction, psychomotor dysfunction, motor signs
Graded portal vein stenosis	Rats	Increased brain ammonia/glutamine	Minimal hepatic encephalopathy, loss of activity, altered circadian cycle
Carbon Tetrachloride (CCl ₄)	Rats, mice	Generation of free radicals, lipoperoxidation, tissue fibrosis, increased hepatic membrane permeability	Hepatic failure, motor activity dysfunction
Bile duct ligation	Rats	Bacterial translocation, immune system dysfunction, hyperammonaemia	Liver failure, portal hypertension, decreased locomotor activities due to low grade encephalopathy

ANEXO II



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: [393/2017](#)
Título do projeto: Estudos dos mecanismos associados às alterações clinicopatológicas e parâmetros imunes e neuroquímicos na encefalopatia hepática experimental.
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Milene Alvarenga Rachid
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Patologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 21/05/2018. Validade: 21/05/2018 à 20/05/2023

Belo Horizonte, 21/05/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade 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 - ceua@proq.ufmg.br