

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Bruno Engler Faleiros

Investigação dos processos neuroinflamatórios em um modelo murino de encefalopatia hepática por falência hepática aguda

Belo Horizonte

2013

Bruno Engler Faleiros

Investigação dos processos neuroinflamatórios em um modelo murino de encefalopatia hepática por falência hepática aguda

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociência.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira

Belo Horizonte

2013

043 Faleiros, Bruno Engler.

Investigação dos processos neuroinflamatórios em um modelo murino de encefalopatia hepática por falência hepática aguda [manuscrito] / Bruno Engler Faleiros. - 2013.

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

Orientador: Antonio Lúcio Teixeira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Encefalopatia hepática - Teses. 2. Fígado - Insuficiência - Teses. 3. Falência hepática aguda. 4. Neuroinflamação. I. Teixeira, Antonio Lúcio. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
www.ufmg.br/neurociencias

“Investigação dos processos neuroinflamatórios em um modelo murino de encefalopatia hepática por falência hepática aguda”

Aluno: Bruno Engler Faleiros

Dissertação defendida em 04/02/2013.

Resultado: APROVADA

Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior
UFMG
(orientador)


Prof. Cristiano Xavier Lima
UFMG


Prof. Gustavo Batista de Menezes
UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
www.ufmg.br/neurociencias

Ata da Sessão Pública de defesa da dissertação de **Bruno Engler Faleiros n° de registro 2011720294** aluno do Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais. Aos quatro dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e treze, às oito e meia horas, na Sala Prof. Moacyr Gomes de Freitas, n° 208 (Sala da Congregação), Bloco F1, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, realizou-se a sessão pública de defesa da dissertação de **Bruno Engler Faleiros**, intitulada **“Investigação dos processos neuroinflamatórios em um modelo murino de encefalopatia hepática por falência hepática aguda”**. A Banca Examinadora, aprovada *Ad referendum* no dia 16 de janeiro de 2013, foi constituída pelos professores: Antônio Lúcio Teixeira Júnior (orientador) – UFMG, Cristiano Xavier Lima – UFMG, Gustavo Batista de Menezes – UFMG e Aline Cristina de Campos (suplente) – UFMG. A defesa constou da apresentação de seminário versando sobre o assunto da dissertação, seguida de arguição do candidato pelos membros da banca. Posteriormente, a Banca Examinadora reuniu-se em sala fechada para o julgamento final, tendo sido considerada APROVADA a dissertação de **Bruno Engler Faleiros**. O resultado foi comunicado ao público presente pelo prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior que, em seguida, declarou encerrada a sessão. Nada mais havendo a tratar, eu, Vanessa Aparecida de Oliveira Bastos (Secretária auxiliar), lavrei a presente Ata, que dato e assino após a assinatura dos membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, 04 de fevereiro de 2012.

Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior (orientador) _____

Prof. Cristiano Xavier Lima _____

Profa. Gustavo Batista Menezes _____

Vanessa Aparecida O. Bastos (Secretária auxiliar) _____

"Assim como a leitura, a mera experiência não
pode substituir o pensamento."

Arthur Schopenhauer em *A Arte de Escrever*

"Sentia a consciência aguçada de quão estéril é
toda especulação intelectual quando apartada da
ação e do experimento."

Oscar Wilde em *O Retrato de Dorian Gray*

Dedico este trabalho aos professores e mestres, peças fundamentais na formação do pensamento ponderado e do senso crítico, qualidades inerentes àqueles que transformam a sociedade e o mundo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me possibilitarem a conquista da liberdade através da educação.

Ao professor Antônio Lúcio Teixeira, pela oportunidade, incentivo e críticas fundamentais.

À Aline Miranda, pela recepção nessa caminhada, disponibilidade inesgotável e amizade inestimável.

À Alline Campos, pela criteriosa instrução e orientação em passos essenciais.

À professora Milena Rachid, pelo estímulo teórico e contribuição prática.

A todos do grupo de neuroinflamação, pela eterna companhia no dia-a-dia, desabafos e risadas.

Ao professor Gustavo Batista Menezes, pelas discussões científicas, roqueiras e divertidas.

À professora Elizabeth Ribeiro da Silva, pelo acolhimento e opiniões construtivas.

Aos professores Mauro Martins Teixeira e Helton José dos Reis, pelo apoio e estrutura.

Ao Lucas Kangussu e a todos os membros dos grupos Imunofarmacologia, Neurofarmacologia e Imunobiofotônica, pela ajuda, paciência e gentileza, novos amigos e novos colegas.

E, finalmente, mas nunca menos importante, à Ana Lúcia, inenarrável parceira, companhia essencial nessa aventura e a principal incentivadora do meu desenvolvimento e da minha auto-superação.

À todos, o meu muito obrigado.

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Imunofarmacologia e no Laboratório de Neurofarmacologia, do Departamento de Bioquímica e Imunologia e de Farmacologia, respectivamente, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Antônio Lúcio Teixeira, com o auxílio do CNPq e Capes.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT - Alanina aminotransferase

AOM - Azoximetano

APAP - *Acetaminophen*; Paracetamol

BHE - Barreira hemáto-encefálica

BSA - *Bovine serum albumin*; Albumina de soro bovina

C57BL/6 - C57 Black 6 - linhagem de camundongo

Ca²⁺ - Cálcio

CCL2/MCP-1 - *Chemokine ligand 2 / Monocyte chemotatic protein-1*

CCL3/MIP-1 α - *Chemokine ligand 3 / Macrophage inflammatory protein 1-alpha*

CCL5/RANTES - *Chemokine ligand 5 / Regulated and normal T cell expressed and secreted*

CEBIO - Centro de Bioterismo da UFMG

cGMP - Monofosfato cíclico de guanosina

cm - Centrímetro - unidade de medida de comprimento

CsA - Ciclosporina A

CXCL1/KC - *Chemokine ligand 1 / Keratinocyte derived chemokine*

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Etilenodiamino tetracético

EH - Encefalopatia hepática

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*; Ensaio imunoenzimático

eNOS - NOS endotelial

FHA - Falência hepática aguda

FHC - Falência hepática crônica

Gln - Glutamina

Gln-Tx - Transportador mitocondrial de glutamina

Glu - Glutamato

GS - Glutamina sintetase

GSH-Px - Glutathiona peroxidase

H&E - Hematoxilina-eosina

H₂O₂ - Peróxido de nitrogênio

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

i.p. - Intra-peritoneal

Iba-1 - *Ionized calcium-binding adaptor molecule-1*; Proteína adaptadora de ligação do cálcio ionizado-1

ICB - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-6 - Interleucina 6

iNOS - NOS induzível

ISHEN - Sociedade Internacional da Encefalopatia Hepática e do Metabolismo do Nitrogênio

KCl - Cloreto de potássio

keV - quilo elétron-volt - unidade de medida de energia

kg - Quilograma - unidade de medida de massa

KH₂PO₄ - Fosfato de potássio

LCF - Líquido céfalo-raquidiano

LDH - Lactato desidrogenase

M - Molar - unidade de medida de concentração

mg - Miligrama - unidade de medida de massa

ml - Mililitro - unidade de medida de volume

MPO - Mieloperoxidase

MPT - *Mitochondrial permeability transition*; Permeabilidade transitória mitocondrial

N - Número de repetições ou animais

Na₂HPO₄ - Fosfato dissódico

Na₃PO₄ - Fosfato trissódico

NAC - N-acetilcisteína

NaCl - Cloreto de sódio

NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH - Nicotinamida adenina dinucleótido hidreto

NAG - N-acetil- β -D-glicosaminidase

NaH₂PO₄ - Fosfato monossódico

NH₃ - Amônia

nm - Nanômetro - unidade de medida de comprimento

NMDA - N-metil D-aspartato

NO - *Nitric oxide*; Óxido nítrico

NOS - *Nitric oxide synthase*; Óxido nítrico sintetase

O₂^{•-} - Superóxido
ONOO⁻ - Peroxinitrito
p.i. - Pós-indução
p/v - Peso por volume - unidade de medida de concentração
PAG - *Phosphate-activated glutaminase*; Glutaminase dependente de fosfato
PBS - *Phosphate buffer saline*; Tampão fosfato-salina
PIC - Pressão intracraniana
PMSF - *Phenylmethanesulfonyl fluoride*; Fluoreto de fenilmetanosulfonil
R\$ - Reais - moeda brasileira
RNA - Ácido ribonucléico
RNAm - RNA mensageiro
RNS - *Reactive nitrogen species*; Espécies reativas de nitrogênio
ROS - *Reactive oxygen species*; Espécies reativas de oxigênio
rpm - Rotações por minuto
s.c. - Subcutâneo
SEM - *Standard error mean*; Erro padrão da média
SIRS - *Systemic inflammatory response syndrome*; Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SNC - Sistema nervoso central
SOD - Superóxido dismutase
sTNFR-2 - Receptor solúvel de TNF- α
TAA - Tioacetamida
TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α - *Tumor necrosis factor alpha*; Fator de necrose tumoral alfa
U - Unidade arbitrária
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
 μ l - Microlitro - unidade de medida de volume

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Diminuição da atividade locomotora dos animais que receberam TAA por via i.p.....	41
FIGURA 2. Evidência de lesão hepática significativa em 24 horas p.i. da EH com TAA.....	43
FIGURA 3. Alterações ultraestruturais no cérebro de animais com EH.....	45
FIGURA 4. Extravasamento do corante azul de Evans em tecido cerebral 24 horas após injeção de TAA.....	48
FIGURA 5. Aumento dos níveis de citocinas e quimiocinas cerebrais pelo tempo.....	50
FIGURA 6. Aumento dos níveis de citocinas e quimiocinas séricas pelo tempo.....	52
FIGURA 7. Diferença de concentração de TNF- α , CXCL1/KC e CCL3/MIP-1 α entre cérebro e soro.....	54
FIGURA 8. Redução significativa da atividade das enzimas antioxidantes no cérebro pós TAA.....	56
FIGURA 9. Comportamento de migração leucocitária para tecido cerebral.....	58
FIGURA 10. Atividade das enzimas MPO e NAG como quantificação de leucócitos em tecido cerebral.....	60
FIGURA 11. Corte histológico de cérebro em 48 horas p.i. da EH por TAA.....	62
FIGURA 12. Análise morfológica por imuno-histoquímica de córtex cerebral e mensuração da densidade celular.....	64

SUMÁRIO

RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Aspectos gerais.....	18
1.2. Fisiopatologia.....	19
1.3. Inflamação.....	21
1.4. Neuroinflamação.....	22
1.5. Estresse oxidativo/nitrosativo.....	23
1.6. Modelos animais de encefalopatia hepática.....	26
1.7. Tioacetamida.....	28
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. METODOLOGIA.....	30
3.1. Animais.....	30
3.2. Modelo experimental de encefalopatia hepática por falência hepática aguda.....	30
3.3. Avaliação do comportamento locomotor por meio do teste em campo aberto.....	31
3.4. Mensuração da lesão hepática por quantificação da alanina aminotransferase sérica.....	31
3.5. Análise histológica de fígado e cérebro.....	32
3.6. Análise morfológica de tecido cerebral por microscopia eletrônica.....	32
3.7. Avaliação funcional da barreira hemato-encefálica por extravazamento do corante azul de Evans em tecido cerebral.....	33
3.8. Avaliação da resposta inflamatória por dosagem de citocinas e quimiocinas em tecido cerebral e soro.....	33
3.8.1. Processamento de tecidos para quantificação de citocinas e quimiocinas.....	33
3.8.2. Determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas.....	34
3.9. Determinação do estado redox em tecido cerebral.....	34
3.9.1. Determinação dos níveis de peroxidação lipídica no cérebro.....	35

3.9.2. Determinação da atividade enzimática da glutathiona peroxidase no cérebro.....	35
3.9.3. Determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase no cérebro.....	35
3.9.4. Determinação da atividade enzimática da catalase no cérebro.....	36
3.9.5. Determinação da concentração de proteína nas amostras.....	36
3.10. Avaliação do recrutamento leucocitário por análise de rolamento e adesão em vasos cerebrais através de microscopia intravital.....	36
3.11. Estimativa da migração de neutrófilos e macrófagos para tecido cerebral através da dosagem da atividade das enzimas mieloperoxidase e N-acetil-β-D-glicosaminidase.....	37
3.11.1. Processamento do tecido cerebral para os ensaios de MPO e NAG.....	37
3.11.2. Dosagem da atividade da MPO.....	38
3.11.3. Dosagem da atividade da NAG.....	38
3.12. Investigação da ativação de micróglia por marcação imuno-histoquímica da proteína adaptadora de ligação ao cálcio ionizado-1.....	39
3.13. Análise estatística.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. A atividade locomotora está diminuída nos animais que receberam injeção de TAA.....	40
4.2. No momento em que os animais exibem diminuição da atividade locomotora, há intensa lesão hepática generalizada.....	41
4.3. Concomitante à lesão hepática extensa e à diminuição da atividade locomotora, há alterações ultraestruturais no cérebro.....	44
4.4. Há disfunção da barreira hemato-encefálica nos animais 24 horas após injeção de TAA.....	47
4.5. Há aumento dos níveis de citocinas e quimiocinas em tecido cerebral principalmente em 24 horas pós-injeção de TAA.....	49
4.6. Há aumento dos níveis de citocinas e quimiocinas séricas principalmente em 48 horas pós-injeção de TAA.....	51
4.7. Há um maior gradiente de TNF-α e de CCL3/MIP-1α no cérebro e de CXCL1/KC no soro.....	53
4.8. Há redução da atividade de enzimas antioxidantes no cérebro dos animais 24 horas p.i. da EH por TAA.....	55
4.9. Há aumento no rolamento de leucócitos em microvasos cerebrais em 48 horas p.i. da EH por TAA.....	57

4.10. A indução da EH por TAA leva ao aumento da atividade da N-Acetil-β-D-Glicosaminidase no cérebro.....	59
4.11. Avaliação histológica do cérebro em 48 horas p.i. da EH por TAA não revela infiltrado inflamatório compatível com macrófagos.....	61
4.12. Análise imuno-histoquímica de córtex cerebral não revelou maior densidade celular de micróglia.....	63
5. DISCUSSÃO.....	66
6. CONCLUSÕES.....	75
7. REFERÊNCIAS.....	76

RESUMO

A encefalopatia hepática (EH) é uma síndrome neuropsiquiátrica que resulta da falência hepática aguda (FHA), sendo uma de suas principais complicações. O seu surgimento implica em aumento da gravidade do quadro e da chance de morte nesses pacientes. Em seu processo fisiopatológico, a EH desenvolve-se por alterações cerebrais induzidas pelo aumento da amônia e resposta neuroinflamatória com aumento de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo/nitrosativo. A compreensão da neuroinflamação nesse cenário é fundamental para ampliar o espectro clínico de intervenção terapêutica na EH e aumentar a sobrevivência na FHA. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi de elucidar o envolvimento celular e o perfil de resposta inflamatória no cérebro de camundongos com EH induzida por tioacetamida, uma droga hepatotóxica.

A atividade locomotora foi utilizada como parâmetro clínico para avaliar a apresentação e a intensidade de sintomas nos modelos experimentais desse estudo. Observamos que, em 24, 36 e 48 horas pós-indução da EH, houve redução significativa da movimentação desses animais. Além disso, em 24 horas, essa redução foi mais relevante se comparados ao grupo controle. Em paralelo a esse quadro sintomático precoce e intenso, também notamos aumento no nível cerebral da citocina pró-inflamatória IL-1 β e das quimiocinas CXCL1/KC, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES. Além disso, houve maior gradiente cerebral da citocina TNF- α , quando comparado ao sangue, e queda na atividade das enzimas antioxidantes SOD, GSH-Px e catalase.

Ao investigarmos a participação celular nesse processo, não observamos infiltrado leucocitário ou ativação de micróglia, célula mielóide residente no sistema nervoso central, embora houve evidência de acometimento de astrócitos, célula-alvo nesse processo.

Dessa maneira, descrevemos, em um momento precoce no desenvolvimento da EH, um processo neuroinflamatório provavelmente relacionado ao astrócito, em que o estresse oxidativo e a produção de citocinas e quimiocinas cerebrais contribuem para a intensidade dos sintomas. Estudos posteriores serão necessários para elucidar mecanismos da participação do astrócito e de outras células na EH além de investigar a importância ponderada da inflamação e do estresse oxidativo em seu desenvolvimento.

ABSTRACT

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric syndrome that results from acute liver failure (ALF) and one of its major complications. HE emergence implies an increase in the severity and risk of death in these patients. In its pathophysiological process, HE develops in consequence of hyperammonemia in the brain and a neuroinflammatory response with increased proinflammatory cytokines and oxidative and nitrosative stress. The understanding of neuroinflammation in this scenario is important to expand the clinical spectrum of therapeutic intervention in HE and improve survival in ALF. Therefore, the objective of this study was to elucidate the cellular profile involvement and inflammatory response in the brain of mice with HE induced by thioacetamide, a hepatotoxic drug.

The locomotor activity was used as a parameter to evaluate clinical presentation and severity of symptoms in the experimental models of this study. We observed that in 24, 36 and 48 hours post-induction of HE, there was significant reduction in the movement of these animals. Furthermore, in 24 hours, this reduction was more relevant compared to the control group. In parallel with this early and intense symptomatic scenario, we also noticed an increase in the level of brain proinflammatory cytokine IL-1 β and chemokines CXCL1/KC, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α and CCL5/RANTES. Moreover, there was also a higher gradient of cytokine TNF- α in the brain when compared to blood, and a diminished activity of antioxidant enzymes SOD, GSH-Px and catalase.

By investigating the cellular participation in this process, we observed no leukocyte infiltration or activation of microglia, resident myeloid cells in the central nervous system, although there was evidence of involvement of astrocytes, the target cell in the process.

Thus, we describe in a moment early in the development of HE, a neuroinflammatory process that is probably related to astrocyte, wherein the oxidative stress and the production of cytokines and chemokines in the brain may contribute to the intensity of symptoms. Further studies are needed to elucidate the mechanisms of participation of astrocytes and other cells of HE in addition to investigate the weighted importance of inflammation and oxidative stress in its development.

1) INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais

A encefalopatia hepática (EH) é uma síndrome neuropsiquiátrica, potencialmente reversível, composta por um amplo espectro de sinais e sintomas que variam desde discreto prejuízo do sono e da atenção até pronunciadas disfunções cognitivas e motoras, confusão mental e coma (SHAWCROSS & WENDON, 2011). A EH é uma das possíveis complicações clínicas decorrentes da falência hepática aguda (FHA) ou crônica (FHC), nas quais substâncias potencialmente tóxicas, como a amônia (NH₃) não são metabolizadas pelo fígado (FERENCI *et al.*, 2002).

A etiologia mais comum da EH é a FHC, ou cirrose, que é listada como a 14^a causa de morte mais prevalente no mundo e a 10^a na América Latina (DÁVALOS MOSCOL & BUSTIO SANCHEZ, 2011). No contexto da FHC, a EH apresenta uma evolução indolente ao longo de meses, com períodos de exacerbações frequentes, o que gera uma enorme perda da qualidade de vida e da capacidade laborativa do paciente. Já na FHA, embora mais rara, a EH caracteriza-se por uma progressão dramática com rápida deterioração do quadro neurológico, edema cerebral, aumento da pressão intracraniana (PIC), coma e morte (VAQUERO *et al.*, 2003a).

A FHA é uma urgência médica com alta taxa de mortalidade, principalmente por hipertensão intracraniana em consequência de edema cerebral (O' GRADY *et al.*, 1993). Sua etiologia varia geograficamente sendo que, nos países em desenvolvimento, as hepatites virais são as causas mais frequentes, enquanto que, nos países desenvolvidos, esse lugar é ocupado pela hepatite medicamentosa (ICHAH & SAMUEL, 2011).

Conceitualmente, a FHA caracteriza-se pela perda da função hepática após extensa necrose celular, com surgimento de hiperbilirrubinemia, coagulopatia e EH, sendo esta um importante fator prognóstico. O período decorrente entre a lesão hepática inicial e a manifestação da EH estima a chance de sobrevivência do paciente e sua progressão para estágios mais graves aumenta o risco de morte (BERNAL *et al.*, 2010; LEE, 2012; O' GRADY *et al.*, 1993; STRAVITZ & KRAMER, 2009).

Atualmente, o transplante hepático é o único tratamento definitivo disponível para a FHA e cerca de apenas 15% dos pacientes que apresentam critérios para o procedimento

sobrevivem sem o mesmo (BERNAL *et al.*, 2010; VIANA *et al.*, 2008). Desse modo, o suporte clínico é o cerne principal dentre as abordagens terapêuticas da FHA, com o intuito de manter a funcionalidade e viabilidade do organismo do paciente até o transplante ou até a recuperação completa e espontânea do quadro (BERNAL *et al.*, 2010; MARQUES *et al.*, 2012; STRAVITZ & KRAMER, 2009; VIANA *et al.*, 2008).

Entre os pontos mais importantes do suporte clínico desse tipo de paciente está o manejo da EH, crucial para uma melhor evolução do quadro. Hoje, o foco de concentração médica está em medidas suportivas que tentam retardar a sua progressão e a elevação da PIC (MPABANZI & JALAN, 2012; SHAWCROSS & WENDON, 2012).

Dessa maneira, conhecer sua fisiopatologia torna-se fundamental, uma vez que possibilita explorar possíveis alvos de intervenção terapêutica específica. Ainda não totalmente elucidada, alguns poucos aspectos de sua patogenia estão bem estabelecidos enquanto a maioria permanece em discussão.

1.2. Fisiopatologia

O fígado possui uma capacidade metabólica extraordinária. É o órgão responsável pela síntese, degradação e neutralização de diversas substâncias potencialmente tóxicas ou essenciais ao funcionamento geral do organismo. Entre esses processos, a metabolização da NH_3 em ureia é de responsabilidade quase que exclusiva do fígado em um contexto normal (ADEVA *et al.*, 2012). Contudo, em vigiância de uma disfunção hepática suficientemente grave, como a FHA, capaz de reduzir a metabolização da NH_3 a níveis críticos, ocorre acúmulo dessa substância na corrente sanguínea. Consequentemente, outros órgãos, como o cérebro e os músculos, passam a ser os responsáveis por sua neutralização (ADEVA *et al.*, 2012).

No cérebro, a NH_3 é transformada em glutamina (Gln), a partir de glutamato (Glu), pela enzima glutamina sintetase (GS), localizada no citoplasma dos astrócitos (BRUSILOW *et al.*, 2010). Célula central no desenvolvimento da EH, o astrócito é pertencente à neuroglia - grupo de células nervosas outras que não os neurônios - e possui, entre suas principais funções, a manutenção da homeostase do meio extracelular para o funcionamento ótimo dos neurônios (PARPURA *et al.*, 2012). Sendo a NH_3 uma substância potencialmente tóxica, os astrócitos são os responsáveis pela sua neutralização em um cenário de hiperamonemia, produzindo uma quantidade excessiva de Gln e consequente hiperosmolaridade, com aumento

do volume aquoso intracelular e edema astrocitário, alteração patológica característica da EH (BRUSILOW *et al.*, 2010; CHAVARRIA *et al.*, 2010).

O papel da NH₃ na fisiopatologia da EH há muito é reconhecido. Seu nível arterial elevado e sua persistência por tempo prolongado está diretamente relacionado à ocorrência de aumento da PIC, herniação cerebral e morte em pacientes com FHA (BERNAL *et al.*, 2007; BHATIA *et al.*, 2006; CLEMMENSON *et al.*, 1999; KUMAR *et al.*, 2012). Em experimentos *in vitro* com cultura de astrócitos e tecido cerebral, foi observada a ocorrência de edema celular e tecidual na presença de NH₃, em uma maneira dose-tempo dependente (BACK *et al.*, 2011; NOREMBERG *et al.*, 1991). Além disso, foi demonstrado que a injeção intraperitoneal de NH₃ em ratos sem lesão hepática é capaz de induzir alterações neurológicas dose dependente, com coma e morte (GÖRG *et al.*, 2008; HERMENEGILDO *et al.*, 2000).

Contudo, o efeito da NH₃ na EH não parece se restringir ao estresse osmótico causado pela Gln e consideráveis evidências apontam para uma importante participação da inflamação e do estresse oxidativo (BOSOI & ROSE, 2012; BUTTERWORTH, 2011; SKOWROŃSKA & ALBRECHT, 2012). Em modelos animais sem lesão hepática, foi observado aumento dos níveis cerebrais de citocinas próinflamatórias, prostaglandinas e estresse oxidativo/nitrosativo quando administrado NH₃ por via oral ou intraperitoneal (GÖRG *et al.*, 2008; RODRIGO *et al.*, 2010). Ademais, a NH₃ também promove uma disfunção na atividade neuronal através da ativação de receptores excitatórios do tipo N-metil D-aspartato (NMDA) no cérebro, acarretando em dessincronização das redes neuronais, o que poderia explicar, em parte, a sintomatologia observada em pacientes com EH (HERMENEGILDO *et al.*, 2000; SCHWARZ *et al.*, 2012). Interessantemente, estudos que intencionaram avaliar os efeitos da redução plasmática e cerebral da NH₃, através de medidas expoliativas ou potencializadoras do metabolismo muscular, não demonstraram evidência de eficácia dessas estratégias em pacientes com falência hepática e EH (ALBA *et al.*, 2002; ALS-NIELSEN *et al.*, 2004; LUO *et al.*, 2011; PÉREZ HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

Nesse sentido, discute-se o conceito de sinergia na fisiopatologia da EH, na qual fatores como a inflamação e o estresse oxidativo tem seus papéis redefinidos, não como coadjuvantes, mas como personagens centrais e amplificadores da neurotoxicidade da NH₃ (BUTTERWORTH, 2008). Esse novo olhar sob a EH traz uma perspectiva animadora, uma vez que abre possibilidades e caminhos a serem explorados, no intuito de ampliar e melhorar o arsenal terapêutico, para a condução clínica desses pacientes.

1.3. Inflamação

Atualmente, é crescente o número de evidências que demonstram a inflamação como um dos pontos-chave na abordagem da EH e sua sinergia com a NH_3 e a Gln (BUTTERWORTH, 2011). A presença da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) em pacientes com FHA, mesmo sem o desenvolvimento de infecções, é um importante fator na progressão e piora da EH, sugerindo que a magnitude da resposta inflamatória do paciente estaria diretamente relacionada ao seu prognóstico (ROLANDO *et al.*, 2000; VAQUERO *et al.*, 2003b). Além disso, a própria EH predispõe esse paciente a uma chance maior de infecções com conseqüente surgimento ou piora da SIRS (ROLANDO *et al.*, 2000).

A SIRS trata-se da manifestação clínica de uma resposta inflamatória com ativação de leucócitos e maciça produção de citocinas proinflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) e as interleucinas 1-beta e 6 ($\text{IL-1}\beta$ e IL-6 , respectivamente) (ROLANDO *et al.*, 2000). As citocinas proinflamatórias são substâncias imunorreguladoras com a capacidade de estimular a resposta imunológica frente a vários distúrbios da homeostase. Esse aumento dos níveis de citocinas circulantes, principalmente a $\text{TNF-}\alpha$, é neurotóxico e está relacionado ao surgimento de sintomas neurológicos e progressão para estágios graves de EH na FHA (BÉMEUR & BUTTERWORTH, 2012; ODEH, 2007).

Em pacientes com FHA, Gupta e colaboradores (2010), através de espectroscopia de ressonância nuclear magnética, estabeleceram uma relação direta entre os níveis de NH_3 e Gln no cérebro e o de $\text{TNF-}\alpha$ no sangue. Outro estudo, envolvendo 29 pacientes com FHA por sobredose de paracetamol (APAP), uma droga hepatóxica, Rolando e colaboradores (1995) observaram que, embora todos os pacientes apresentavam níveis semelhantes de $\text{TNF-}\alpha$ circulante à admissão, houve aumento desses níveis nos pacientes que desenvolveram EH e coma ($n=15$), enquanto que, no restante ($n=14$), houve queda de $\text{TNF-}\alpha$ circulante e nenhum sinal de EH. A $\text{TNF-}\alpha$ também está diretamente relacionado ao aumento de fluxo sanguíneo cerebral em pacientes com FHA, o que contribui para elevação da PIC e progressão da EH (JALAN *et al.*, 2004).

Complementarmente, em ratos com EH induzida por TAA, foi observado maior nível circulante de $\text{TNF-}\alpha$ em paralelo à menor movimentação ativa dos animais, critério clínico utilizado nesse estudo (CHU *et al.*, 2001). Ademais, em um estudo recente, o uso de etanercept, um bloqueador do receptor solúvel de $\text{TNF-}\alpha$ (sTNFR-2), em camundongos com FHA tóxica por azoximetano (AOM), atrasou significativamente o desenvolvimento de coma

nesses animais, além de reduzir os níveis circulantes de TNF- α e IL-6 (CHASTRE *et al.*, 2012).

Além disso, atualmente, evidências consideráveis discutem o papel da inflamação na patogênese da EH sob outra perspectiva na qual, não só a resposta inflamatória sistêmica mas, também, a resposta neuroinflamatória participa desse processo (BÉMEUR & BUTTERWORTH, 2012; BUTTERWORTH, 2011).

1.4. Neuroinflamação

Em um estudo com pacientes com FHA, Wright e colaboradores (2007), através da diferença dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 entre a artéria carótida e a veia jugular, demonstraram uma boa correlação entre o efluxo cerebral de citocinas e o aumento da PIC, sugerindo maior produção cerebral dessas citocinas em paralelo à piora clínica do paciente.

Jiang e colaboradores (2009b) demonstraram, em ratos com FHA por desvascularização hepática, significativo edema cerebral com aumento dos níveis e da expressão de RNA mensageiro (RNAm) de TNF- α , IL-1 β e IL-6 *in situ*, quando esses animais desenvolviam coma. Bémeur e colaboradores (2010c) também reportaram aumento na expressão de RNAm de TNF- α e IL-1 β no córtex frontal de camundongos da linhagem C57BL-6, quando em coma. Nesse mesmo trabalho, Bémeur ainda utilizou camundongos *knock-out* para receptores de TNF- α e IL-1 β , TNFR1 e IL-1R1, respectivamente, e observou menor edema cerebral e maior tempo para atingir o coma nesses animais.

Assim, a neuroinflamação e a produção de citocinas no próprio cérebro ganham destaque e, somadas à disfunção astrocitária, a EH pode ser considerada uma gliopatia primária (BUTTERWORTH, 2012). Nesse sentido, outra célula da neuroglia, a micróglia, surge em um papel ainda em investigação.

A micróglia é uma célula fagocítica e mononuclear, residente do sistema nervoso central (SNC), embora seja derivada da linhagem mielóide da medula óssea (PRINZ & MILDNER, 2011). Entre suas funções, destaca-se a vigilância do SNC com o intuito de manter a homeostase. Frente a diversos estímulos, como debris celulares, estresse oxidativo e substâncias proinflamatórias, a micróglia muda seu fenótipo do estado de repouso para o ativado, quando inicia uma resposta imunológica com produção de citocinas proinflamatórias, óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (HANISCH & KETTENMANN, 2007).

Zemtsova e colaboradores (2011) demonstraram ativação de micróglia por aumento da expressão da proteína adaptadora de ligação do cálcio ionizado-1 (*ionized calcium-binding adaptor molecule-1*, Iba-1) em cultura celular exposta à NH₃. Os autores reportaram também maior produção de ROS sem, contudo, haver aumento na expressão de RNAm de citocinas pró-inflamatórias. No mesmo estudo, perfil semelhante foi observado *post mortem* em amostras de cérebro de pacientes cirróticos com EH comparado aos sem EH.

Em outro estudo, Jiang e colaboradores (2009a) demonstraram redução dos níveis de TNF- α , IL1- β e IL-6 no líquido céfalo-raquidiano (LCF) após tratar um modelo experimental de EH por isquemia hepática com minociclina, um antibiótico inibidor da ativação de micróglia. Comparados aos controles, a minociclina ainda diminuiu significativamente o edema cerebral e aumentou a latência até a instalação do coma.

Nesse sentido, abre-se um caminho interessante para descobertas acerca do mecanismo envolvido na fisiopatologia da EH e permite a utilização de fármacos como a minociclina. Sob o foco de se tratar de uma gliopatia primária, a relação imunológica entre astrócitos e micróglia, por meio da neuroinflamação e do estresse oxidativo/nitrosativo, deve ser aprofundada.

1.5. Estresse oxidativo/nitrosativo

O estresse oxidativo/nitrosativo ocorre quando há um desbalanço entre a produção de radicais livres - espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), como os superóxidos (O₂^{•-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), peroxinitrito (ONOO⁻) e óxido nítrico (NO) - e sua neutralização (BOSOI & ROSE, 2012). Enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GSH-Px) e a catalase, além de moléculas neutralizadoras como a glutatona e a albumina, são parte do arsenal biológico de defesa contra o estresse oxidativo e a redução de sua atividade pode resultar em lesão celular (BOSOI & ROSE; 2012). O aumento dos níveis de ROS e RNS acarreta, por sua vez, em desarranjos moleculares em nível protéico, lipídico e de ácidos nucleicos, levando à disfunção e ao edema celular (BOSOI & ROSE, 2012; HÄUSSINGER & GÖRG, 2010; SCHLISS *et al.*, 2006). Além disso, o edema celular é capaz de promover mais produção de ROS, instalando-se assim um círculo vicioso (REINEHR *et al.*, 2007).

Murthy e colaboradores (2001) demonstraram que a adição de NH₃ à cultura de astrócitos aumenta a produção de radicais livres e que esse efeito é revertido pela ação da SOD e da catalase. A exposição de astrócitos à NH₃ induz a produção de ROS e RNS,

potencializando seus efeitos deletérios, de maneira direta, por ativação de receptores excitatórios do tipo NMDA, e indireta, através de disfunção mitocondrial causada pela Gln (NOREMBERG *et al.*, 2009; RAMA RAO *et al.*, 2005; SKOWROŃSKA & ALBRECHT, 2012).

Experimentos *in vitro* e *in vivo* descreveram ativação da via cerebral Glu-monofosfato cíclico de guanosina (cGMP)-NO, pela NH₃, através da interação com receptores NMDA, acarretando em aumento de cálcio (Ca²⁺) intracelular e indução da produção de NO e RNS (HERMENEGILDO *et al.*, 2000; KOSENKO *et al.*, 2003; KRUCZEK *et al.*, 2011). Explorando o influxo de Ca²⁺ gerado pela NH₃, Jayakumar e colaboradores (2009) demonstraram, *in vitro*, que o aumento de ROS e RNS é prevenido tanto pela utilização de quelante de Ca²⁺ como por inibidores das enzimas produtoras de radicais livres, com redução do edema celular de astrócito.

A Gln também é uma importante indutora do estresse oxidativo no astrócito (ALBRECHT & NOREMBERG, 2006; ALBRECHT *et al.*, 2010; DESJARDINS *et al.*, 2012). Jayakumar e colaboradores (2004) demonstraram que a exposição de astrócitos diretamente à Gln desencadeia a produção de radicais livres. Albrecht e Norenberg, publicaram em 2006, uma revisão sobre o papel da Gln na fisiopatologia da HE e chamaram-na de "Cavalo de Tróia" da neurotoxicidade da NH₃. Segundo os autores, a Gln seria um veículo através do qual a NH₃ atinge o interior da mitocôndria astrocitária, onde exerce sua principal toxicidade: indução da permeabilidade transitória mitocondrial (MPT) e produção de radicais livres.

A Gln é conduzida ao interior da mitocôndria astrocitária por um transportador (Gln-Tx) com alta afinidade para diversos metabólitos, principalmente a histidina. No citoplasma mitocondrial, a Gln é hidrolizada novamente em NH₃ e Glu, através da enzima glutaminase dependente de fosfato (PAG), induzindo, conseqüentemente, a MPT e a produção de ROS (ALBRECHT & NOREMBERG, 2006; RAMA RAO *et al.*, 2003b). A MPT é um processo dependente de Ca²⁺, em que um influxo aumentado desse íon para o interior da mitocôndria acarreta em colapso do potencial de membrana com disfunção da cascata energética e mais produção de ROS (RAMA RAO *et al.*, 2003b, 2005). A MPT pode ser bloqueada pela ciclosporina-A (CsA) e estudos em que foram utilizados bloqueadores da PAG ou CsA demonstraram diminuição da produção de ROS e do edema celular (ALBRECHT *et al.*, 2000; JAYAKUMAR *et al.*, 2004; JAYAKUMAR *et al.*, 2006; PICHILI *et al.*, 2007; RAMA RAO *et al.*, 2003a).

O estresse nitrosativo também exerce um papel importante na fisiopatologia da EH. A inibição inespecífica da enzima produtora de NO, a óxido nítrico sintetase (NOS), em cultura de astrócitos, reduziu significativamente a indução da MPT e a produção de radicais livres (JAYAKUMAR *et al.*, 2004; RAMA RAO *et al.*, 2005). A NOS é expressa em diferentes isoformas e em um modelo animal de FHA por desvascularização hepática de ratos, Jiang e colaboradores (2009c) observaram aumento da expressão das isoformas NOS induzível (iNOS) e endotelial (eNOS) em cérebro e maior nível sérico de nitrito e nitrato, compostos estáveis derivados da produção de NO. Outro fenômeno observado é a nitração protéica pelo ONOO⁻, composto formado a partir de O₂^{•-} e NO, potencialmente bloqueada pela CsA e por inibidores da GS, da NOS, além de substâncias antioxidantes (SCHLIESS *et al.*, 2006). A nitração protéica ocorre principalmente em astrócitos perivascularares com prejuízo da função de diversas proteínas e edema celular quando expostos à NH₃ (HÄUSSINGER & GÖRG, 2010; SCHLIESS *et al.*, 2006).

Por fim, um notável desbalanço antioxidante foi demonstrado em modelos animais de EH. Kosenko e colaboradores (2003) demonstraram aumento na produção de O₂^{•-} e redução da atividade das enzimas catalase, GSH-Px e SOD no cérebro de ratos após injeção de NH₃. A redução dos níveis de glutatona e da atividade das enzimas catalase e GSH, com concomitante aumento da peroxidação lipídica, também foram observados no cérebro de modelos experimentais de EH por injeção de tioacetamida (TAA), uma droga hepatotóxica (REDDY *et al.*, 2004; SATHYASAIKUMAR *et al.*, 2007; TÚNEZ *et al.*, 2007).

Dessa maneira, acumulam-se evidências quanto a participação do estresse oxidativo/nitrosativo e seu sinergismo com a NH₃/Gln na fisiopatologia de EH, contribuindo para sua evolução e estabelecendo-se como um possível alvo terapêutico. Nesse sentido, o uso de drogas antioxidantes, como a N-acetilcisteína (NAC), são amplamente exploradas no tratamento da FHA em pacientes com resultados promissores (BERNAL *et al.*, 2010; MARQUES *et al.*, 2012; STRAVITZ & KRAMER, 2009). Além disso, o uso de anti-inflamatórios, como a indometacina, se mostrou capaz de reduzir a nitração de proteínas e oxidação de RNA, em ratos com EH induzida por ligadura da veia portal, com consequente melhora dos parâmetros clínicos avaliados (BRÜCK *et al.*, 2011).

Embora ainda haja poucos estudos acerca da relação da inflamação e do estresse oxidativo, já foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* que citocinas proinflamatórias aumentam a produção de ROS, NO e a nitrosação de proteínas em astrócitos (GÖRG *et al.*, 2006). Sob essa ótica, Alvarez e colaboradores (2011) utilizaram cultura de astrócitos para investigar essa

relação e, ao expôr o astrócito à uma solução de TNF- α , IL1- β e IL-6, os autores observaram indução da MPT, semelhante à NH₃, além de amplificação desse efeito quando colocadas as citocinas simultaneamente com a NH₃.

Mais estudos são necessários para elucidar, de maneira mais detalhada, a sinergia e a relação temporal entre a inflamação e o estresse oxidativo e, assim, mecanismos comuns entre as duas vias poderão se tornar pontos de intervenção com ampla resposta. Para isso, a utilização de modelos animais é uma ferramenta imprescindível, uma vez que o ambiente *in vivo* não é reproduzível fielmente *in vitro*, dado à complexidade dessas relações.

1.6. Modelos animais de encefalopatia hepática

Em 2008, uma comissão formada por membros da Sociedade Internacional da Encefalopatia Hepática e do Metabolismo do Nitrogênio (ISHEN) organizou e discutiu, no 13º Simpósio da ISHEN, em Pádova, Itália, diretrizes para o desenvolvimento de modelos animais de EH (BUTTERWORTH *et al.*, 2009).

Já no início do documento, os autores ressaltam sobre a dificuldade de se estabelecer um modelo animal satisfatório para a EH. A diversidade etiológica da disfunção hepática e os vários fatores que influenciam no desenvolvimento do quadro neurológico, tornam a EH uma síndrome complexa para ser reproduzida fielmente em animais. Os autores ainda destacam que, hoje, não existem modelos satisfatórios para a falência hepática causada por etanol, vírus ou APAP, suas principais etiologias nos seres humanos.

Quanto às espécies animais utilizadas, a EH já foi estudada em animais de médio porte (cachorros, porcos, cabras e coelhos) e em roedores (ratos e camundongos). Animais de médio porte possuem a vantagem de maior disponibilidade de tecidos e facilidade de avaliação neuropsiquiátrica. Entretanto, os custos, a logística de manutenção desses animais e as questões éticas envolvidas levaram sua utilização à raridade.

Desse modo, a comissão da ISHEN resalta as vantagens em se optar por um modelo utilizando roedores: maior conhecimento anatômico, comportamental e neurobiológico; genoma caracterizado, o que permite manipulações genéticas; maior disponibilidade de anticorpos e ferramentas de investigação; e, finalmente, mas não menos importante, baixo custo. Nesse sentido, optamos por utilizar roedores, mais especificamente camundongos da linhagem C57BL/6, pela facilidade de manejo, acomodação em biotério e disponibilidade de anticorpos e animais *knock-out* em nossa estrutura e realidade de trabalho, além da vasta experiência acumulada por nossa equipe.

Em relação ao desenvolvimento de um modelo animal de EH por FHA, as diretrizes ressaltam alguns pontos que devem ser observados durante sua padronização, muito embora, os próprios autores ratificam a dificuldade de se adequar a todos:

- a) quadro clínico reproduzível que permita avaliação e estagiamento neurológico;
- b) sintomas progressivos que culminem em edema cerebral e suas complicações;
- c) reversibilidade da doença;
- d) hiperamonemia sérica ou aumento de NH_3/Gln cerebral;
- e) patologia cerebral e hepática bem caracterizada;
- f) menor exposição possível da equipe a agentes tóxicos ou infectantes.

Levando esses fatores em consideração, e a indisponibilidade de modelos de EH por FHA viral, há, portanto, basicamente, dois tipos de modelos experimentais utilizados para se estudar a EH: (1) a desvascularização hepática e (2) a administração aguda de um hepatotóxica. A principal etiologia da FHA em países desenvolvidos é a hepatite medicamentosa e com a vacinação maciça e melhora das condições sanitárias, há uma tendência de que esse seja o painel etiológico também nos países em desenvolvimento. Optamos, então, pela utilização de um modelo de EH por FHA após administração de uma droga hepatotóxica.

Entre as drogas utilizadas para indução de FHA em roedores, há: galactosamina, paracetamol (APAP), azoximetano (AOM) e tioacetamida (TAA). Segundo os autores, a galactosamina e o APAP causam falência hepática embora o desenvolvimento da EH seja variável, com dificuldade de reprodutibilidade e patologia cerebral pouco caracterizada, necessitando de melhores e novas técnicas para alcançar um modelo eficiente. O AOM é uma droga relativamente nova nesse contexto da EH e foi demonstrado ser útil para o desenvolvimento desse modelo, com aspectos patológicos bem caracterizados (BÉLANGER *et al.*, 2006). Por fim, a TAA é uma droga hepatotóxica largamente utilizada em modelos de EH em ratos, demonstra boa reprodutibilidade e acometimento hepático e cerebral bem descritos (CHU *et al.*, 2000; FARJAM *et al.*, 2012; HILGIER *et al.*, 1983a; HILGIER, 1983b; KRAŚNICKA *et al.*, 1983; MLADENović *et al.*, 2012; PEELING *et al.*, 1993; PLUTA & ALBRETCH, 1984; ZIMMERMANN *et al.*, 1989).

Ademais, além de sua utilização bem estabelecida e da maior disponibilidade de informações na literatura internacional, a TAA ainda é vantajosa financeiramente quando comparada ao AOM. Segundo o sítio da Sigma-Aldrich, empresa fornecedora dessas drogas, o custo por 100mg de AOM é de R\$ 3.357,00, enquanto que o de TAA é de R\$ 0,18, sendo

que na indução da EH usa-se uma dose cerca de 6 vezes maior de TAA quando comparada ao AOM.

1.7. Tioacetamida

Previamente, nosso grupo desenvolveu um modelo de EH com camundongos C57BL/6 após injeção intra-peritoneal (i.p.) de TAA, dissolvida em salina, na dose de 600mg/kg (MIRANDA *et al.*, 2010). Foi observado uma taxa de mortalidade entre 30-40% no período de 24 a 48 horas pós-injeção da droga. A partir de 48 horas, os animais apresentavam tendência a melhora e a sobrevivência, evidenciando o caráter de reversibilidade da doença. A necrose hepática foi demonstrada por meio de análise histopatológica e de marcadores séricos de lesão hepatocelular. Além disso, esses animais apresentavam franca sintomatologia ao serem submetidos a uma bateria de avaliação neuropsiquiátrica e aumento significativo na quantidade do neurotransmissor Glu em seus cérebros.

A TAA (CH_3CSNH_2) é uma droga originalmente utilizada como fungicida e que depende da metabolização hepática, pela ação catalítica do complexo microsomal citocromo P-450, em S-dióxido de TAA, para que seu efeito seja tóxico (MANGIPUDY *et al.*, 1995). Esse metabólito reduz a atividade antioxidante no fígado, acentuando a peroxidação lipídica e estabelecendo uma condição de estresse oxidativo que leva à necrose celular (TÚNEZ *et al.*, 2005).

A TAA pode ser administrada de diferentes formas: oral (na água ou na ração ingerida), por intubação intragástrica (gavagem), ou por injeções subcutâneas ou i.p. (FONTANA *et al.*, 1996).

Nesse ínterim, a utilização de um modelo murino de EH induzida por TAA em camundongos da linhagem C57BL/6 nos permitirá avançar no estudo dos processos inflamatórios e do estresse oxidativo acerca dessa patologia. Uma elucidação detalhada de sua fisiopatologia irá possibilitar a exploração de vias das quais poderá advir um novo alvo terapêutico para a EH.

2) OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar os processos neuroinflamatórios envolvidos na fisiopatologia da encefalopatia hepática (EH) em um modelo animal de falência hepática aguda (FHA) por injeção intra-peritoneal (i.p.) de tioacetamida (TAA).

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Caracterizar os aspectos comportamentais do modelo animal de EH após injeção i.p. de TAA;

2.2.2. Caracterizar as alterações morfológicas dos astrócitos no cérebro do modelo animal de EH no momento inicial das alterações comportamentais;

2.2.3. Investigar o perfil inflamatório sistêmico e cerebral do modelo animal de EH através da quantificação de citocinas e quimiocinas pelo tempo;

2.2.4. Investigar a participação do estresse oxidativo/nitrosativo no modelo animal de EH através da peroxidação lipídica e consumo de reservas antioxidantes;

2.2.5. Investigar a participação de leucócitos no cérebro do modelo animal de EH;

2.2.6. Investigar se há participação da micróglia avaliando sua ativação no cérebro do modelo animal de EH.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

No presente estudo foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, com idade entre oito e dose semanas, obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB-UFMG). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (25°C) e luminonisidade (ciclo claro/escuro de 12/12 horas) com água e ração *ad libitum*. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob o número de protocolo 114/2009.

3.2. Modelo experimental de encefalopatia hepática por falência hepática aguda

O modelo utilizado foi o de encefalopatia hepática (EH) induzida por falência hepática aguda (FHA) causada após intoxicação por tioacetamida (TAA, CH₃CSNH₂, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA), previamente estabelecido por nosso grupo (MIRANDA *et al.*, 2010). A TAA foi administrada por via intra-peritoneal (i.p.), em injeção única, na dose de 600mg/kg, dissolvida em cloreto de sódio 0,9% (NaCl 0,9%) na concentração de 40mg/mL. Os animais controle recebiam NaCl 0,9% puro. Todos os volumes foram corrigidos pelo peso do animal.

As injeções ocorriam às 02 ou às 14 horas, a depender do tempo pós-indução (p.i.) em que o animal fosse estudado. Os grupos controle, 24 e 48 horas p.i. receberam a TAA às 14 horas, enquanto que os grupos 12 e 36 horas p.i. receberam-na às 02 horas. Dessa maneira, todos os animais eram avaliados e seus tecidos coletados no mesmo período do dia, às 14 horas.

Para evitar hipoglicemia e hipotermia, foi administrado aos animais, por injeção subcutânea (s.c.), 500µL de glicose 5% dissolvida em NaCl 0,9% e sua temperatura foi controlada por manta térmica. Antes de todos os experimentos, com exceção da avaliação comportamental, os animais foram devidamente anestesiados com uma injeção i.p. de quetamina (80mg/kg) e xilazina (15mg/kg).

3.3. Avaliação do comportamento locomotor por meio do teste em campo aberto

O teste comportamental em campo aberto foi desenvolvido para avaliação experimental da atividade locomotora e do nível de ansiedade em roedores (HALL & BALLACHEY, 1932; WALSH & CUMMINS, 1976). Para tanto, utiliza-se uma arena circular medindo 30,0 cm de diâmetro, dividida em três círculos concêntricos, cercada por uma parede de acrílico com 30,0 cm de altura (Insight, Brasil).

O animal em questão é colocado gentilmente no centro da arena, em uma sala vazia e silenciosa, e sua atividade locomotória espontânea é filmada por cinco minutos enquanto se movimenta livremente. Para gravação e análise dos vídeos, foi utilizado o programa de computador AnyMaze® (Stoelting Co., Wood Dale, EUA). Entre a avaliação de cada animal é realizada a limpeza da arena com álcool 70%.

Foram avaliados cinco grupos experimentais: controle (N=8), 12 (N=7), 24 (N=7), 36 (N=9) e 48 (N=8) horas p.i. Realizamos o teste em dois dias subsequentes, ambos às 14 horas, sendo no primeiro dia os grupos 12 e 24 horas p.i., além de 4 animais do grupo controle, e no segundo dia o restante dos animais.

3.4. Mensuração da lesão hepática por quantificação da alanina aminotransferase sérica

A alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima não-específica mais comumente associada ao fígado. A elevação de seus níveis séricos correlaciona-se diretamente com a lesão hepatocelular e é usada como teste primário para triagem de dano hepático (SENIOR, 2012).

Para determinar o nível da ALT sérica em camundongos, foi coletado o sangue através de secção da veia cava inferior, e sucção cuidadosa com pipeta de Pasteur, e centrifugados por 10 minutos, a 10.000 rpm, em temperatura ambiente, para separar o soro. Posteriormente, o kit *Transaminase ALT Cinética* (K049, Bioclin) foi utilizado segundo as instruções do fabricante. Resumidamente, o teste consiste em duas reações químicas com consequente oxidação de NADH em NAD⁺ na presença de ALT e lactato desidrogenase (LDH). São feitas quatro leituras por espectrofotometria, em intervalos de um minuto, e a magnitude da variação da absorbância reflete a quantidade de ALT no soro. As leituras são realizadas no comprimento de onda de 340 nm.

3.5. Análise histológica de fígado e cérebro

Após os animais serem devidamente anestesiados, foi realizada perfusão transcardíaca com uma solução de NaCl 0,9%. Os lobos hepáticos médio e esquerdo foram retirados de grupos controle e 24 horas p.i., enquanto que o lobo cerebral frontal foi retirado de grupos controle e 48 horas p.i. Todos os tecidos foram fixados em uma solução de formaldeído 10%, diluído em PBS, para análise histológica.

Em seguida, os tecidos foram desidratados em soluções de álcool etílico em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e absoluto), sendo que os fragmentos permaneceram imersos por um período de 30 minutos em cada solução. Após a desidratação, foi realizado o processo de diafanização, que tem como objetivo tornar o tecido translúcido, submetendo os fragmentos a dois banhos de xilol, com duração de 20 minutos cada. Posteriormente, os tecidos foram impregnados e incluídos em parafina.

Os blocos de parafina, contendo o fragmento do órgão, foram submetidos à microtomia, sendo obtidos cortes seriados com 4 µm de espessura. Esses cortes foram, então, corados pela técnica de hematoxilina-eosina (H&E). As lâminas histológicas foram examinadas em microscópio óptico (BX41, Olympus) e as imagens obtidas utilizando uma câmera acoplada (Moticam 2500, Motic) e o programa de computador Motic Image Plus 2.0ML (Ted Pella Inc., EUA).

3.6. Análise morfológica de tecido cerebral por microscopia eletrônica

Após os animais serem devidamente anestesiados, foi realizada perfusão transcardíaca com uma solução de glutaraldeído 2,5% para fixação *in situ* do tecido. O córtex cerebral frontal foi retirado de grupos controle e 24 horas p.i.

Em seguida, os tecidos foram desidratados em soluções de álcool etílico em concentrações crescentes (35%, 50%, 70%, 85%, 95% e absoluto) por um período de 10 minutos e em solução de acetona por 20 minutos. Posteriormente, foram imersos em Epon.

O tecido foi cortado em secções de 0,5-1,0 µm de espessura. Esses cortes foram, então, corados por Azul de Toluidina e contrastados com citrato de chumbo. As lâminas histológicas foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai G2-12 FEI Company) em 80keV.

3.7. Avaliação funcional da barreira hemato-encefálica por extravasamento do corante azul de Evans em tecido cerebral

A barreira hemato-encefálica (BHE) é uma interface dinâmica que separa o cérebro do sangue periférico. Possui, entre suas propriedades, permeabilidade seletiva, impedindo que moléculas indesejáveis cheguem ao SNC. Moléculas de grande peso molecular, como a albumina, são incapazes de atravessar a BHE em decorrência dessa permeabilidade seletiva (WILLIS, 2011).

Para a avaliação funcional da BHE através de sua permeabilidade seletiva, utilizou-se o corante azul de Evans como marcador, uma vez que ele se combina de maneira reversível com a albumina, podendo ser avaliado o extravasamento plasmático, como descrito por Saria & Lundberg (1983).

Os animais foram devidamente anestesiados, sua veia caudal foi canulada, por onde administrou-se 100 µL de azul de Evans 0,5% diluído em PBS. Ao final de trinta minutos, foi realizada perfusão transcardíaca dos animais com PBS. O cérebro foi retirado e colocado em placa de Petri para secagem por 24 horas em estufa a 40°C. Em seguida, as amostras foram pesadas e foi acrescentado ao tecido 1 mL de formamida, para extração do corante, que permaneceu por 24 horas em temperatura ambiente. O corante extraído do tecido foi quantificado por espectrofotometria utilizando-se o comprimento de onda de 620 nm e a concentração determinada através de uma curva-padrão variando de 0,375 a 10 µg/mL de azul de Evans. Os resultados foram normalizados pelo peso do tecido e expressos como quantidade (em µg) de azul de Evans por 100 mg de tecido.

3.8. Avaliação da resposta inflamatória por dosagem de citocinas e quimiocinas em tecido cerebral e soro

A avaliação do perfil de citocinas e quimiocinas produzidas após a indução da EH por TAA foi determinada através de ensaio imunoenzimático (*Enzyme linked immunosorbent assay* - ELISA) conforme previamente descrito (ENGVALL, 1977; VOLLER *et al.*, 1978).

3.8.1. Processamento de tecidos para quantificação de citocinas e quimiocinas

Adicionou-se 100 mg de cérebro, região frontal direita, em 1 mL de solução de extração de citocinas [NaCl 0,4 mol/L, Na₂HPO₄ 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), albumina bovina (BSA) 0,5% (p/v), aprotinina 20 UI] para o processamento em homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA). Logo após, as amostras foram centrifugadas (10.000 rpm; 4°C; 10 minutos), o sobrenadante foi recolhido e congelado a -80°C para a detecção de citocinas e quimiocinas por ELISA.

O soro foi separado do sangue através de secção da veia cava inferior, e sucção cuidadosa com pipeta de Pasteur com posterior centrifugação por 10 minutos, a 10.000 rpm, em temperatura ambiente, sendo armazenado à -80°C até análise posterior.

3.8.2. Determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas

Os níveis de IL-1 β , TNF- α , CXCL1/KC, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES foram quantificados no cérebro e TNF- α , CXCL1/KC e CCL3/MIP-1 α no soro dos animais controle e 24, 36 e 48 horas p.i. através da técnica de ELISA, utilizando-se kits adquiridos da R&D Systems (DuoSet, Minneapolis, EUA), segundo as instruções do fabricante.

Todos os protocolos foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7.4, sendo que a sensibilização da placa ocorreu durante 18 horas à 4°C. A reação foi bloqueada com PBS acrescido de 1% (p/v) de BSA (Sigma) por 1 hora. As amostras em diluição 1:3 em PBS, o padrão e o branco foram acrescentados aos seus respectivos poços. As placas foram incubadas a 4°C por mais 18 horas. O anticorpo de detecção foi adicionado aos poços por 2 horas. A reação foi incubada com estreptavidina conjugada com peroxidase (“HRP-Streptavidin Pharmingen” - 1:4000) e revelada com dihidroclorato de o-fenilenodiamina (Sigma). Após 30 minutos a reação foi interrompida com H₂SO₄ 1M. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) com filtro para um comprimento de onda de 492 nm.

3.9. Determinação do estado redox em tecido cerebral

O estado redox foi mensurado através da quantificação da peroxidação lipídica e da atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD) e catalase. Para tanto, 100 mg de cérebro, região frontal esquerda, foi homogeneizado

em 900 µL de solução tampão fosfato-PBS mmol/L: (137 NaCl, 1,5 NaH₂PO₄, 8,1 Na₂HPO₄, pH 7,4) e separado em alíquotas para posterior análise.

3.9.1. Determinação dos níveis de peroxidação lipídica no cérebro

A peroxidação lipídica foi determinada usando o ácido tiobarbitúrico que reage com o malonaldeído, um produto da peroxidação lipídica, formando as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A determinação dos níveis de TBARS foi realizada pelo método descrito por Ohkawa e colaboradores (1979). Alíquotas do homogeneizado (0,2 mL) foram adicionadas em 8,1% (p/v) de duodecil sulfato de sódio, 2,5 mol/L de ácido acético (pH 3,4), 0,8% de ácido tiobarbitúrico. A mistura foi incubada por 60 minutos a 95°C. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 532 nm.

3.9.2. Determinação da atividade enzimática da glutathiona peroxidase no cérebro

A determinação da atividade da GSH-Px foi realizada pelo monitoramento da oxidação do NADPH (PAGLIA & VALENTINE, 1967). A reação consiste na adição de 1300 µL de água destilada, 200 µL de tampão Tris/HCl (EDTA 1 mol/L; pH 8,0; 5 mmol/L), 200 µL de 10 U/mL de glutathiona redutase, 200 µL de NADPH (2,0 mmol/L), 40 µL de glutathiona (0,1mol/L) e 40 µL da amostra. A mistura foi agitada em vórtex durante 10 segundos. Em seguida, foi adicionado 20 µL de T-butil hidroperóxido (7 mmol/L) e a mistura foi mantida a 37°C durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340 nm. A atividade da GSH-Px foi expressa em unidades de atividade enzimática por mg de proteína (U/mg proteína).

3.9.3. Determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase no cérebro

A atividade da SOD foi avaliada conforme previamente descrito (GAO *et al.*, 1998). Após a homogeneização do tecido, foi adicionado 1,0 mL de tampão fosfato de sódio (50 mmol/L, pH 7,8) contendo 1 mmol/L de ácido dietilenotriaminopentacético. Alíquotas de 40 µL da amostra foram utilizadas e a reação foi iniciada com a adição de pirogalol (0,2 mmol/L). A leitura no espectrofotômetro foi realizada durante 3 minutos a 37°C a 420 nm. A

determinação da atividade da enzima, dada em U/mg, foi calculada como a capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol, onde 1U= 50% dessa reação.

3.9.4. Determinação da atividade enzimática da catalase no cérebro

O protocolo experimental para determinação da atividade da catalase foi realizado conforme descrito por Nelson e Kiesow (1972), de forma que depois que o tecido foi homogeneizado em PBS, a atividade da enzima foi determinada em 2 mL de tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7.0) e uma alíquota (40 µL) do homogeneizado foi adicionada. Em seguida foi adicionado 0,06 mL de substrato (H_2O_2 0,3 mol/L), e a leitura foi realizada durante 1 minuto a 25°C em 240 nm. A atividade da catalase foi calculada pela variação da atividade da enzima durante um minuto, e o resultado foi expresso como $nmol.min^{-1}$ por mg/proteína.

3.9.5. Determinação da concentração de proteína nas amostras

A determinação da concentração de proteínas de todos os ensaios foi feita pelo método de Bradford (1976) utilizando o corante Coomassie blue. A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Para quantificação das concentrações de proteínas nas amostras foi realizada uma curva padrão para albumina bovina. As concentrações utilizadas foram de 0,5 a 10 µg de albumina.

3.10. Avaliação do recrutamento leucocitário por análise de rolamento e adesão em vasos cerebrais através de microscopia intravital

A técnica de microscopia intravital foi utilizada com o intuito de visualizar o recrutamento de leucócitos através do endotélio da microvasculatura da pia-máter em cérebro de camundongos. Os animais foram devidamente anestesiados e a veia da cauda foi canulada para administração de Rodamina-6G Sigma (0,5mg/kg), um corante fluorescente capaz de marcar leucócitos. Para a visualização dos vasos sanguíneos da pia-máter, foi realizada a ressecção da pele na região do escalpo e, em seguida, uma craniotomia utilizando uma broca cirúrgica de alta velocidade. Abriu-se uma janela óssea de, aproximadamente, 0,5 cm de diâmetro e a dura-máter foi removida, expondo assim os vasos em questão.

O rolamento e adesão celular na parede desses vasos foi observada através de um microscópio óptico (Olympus BX40) com uma câmera de vídeo (Optronic) acoplada. As imagens foram gravadas para posterior análise. O rolamento foi considerado para os

leucócitos que migraram da região central para a margem do vaso e se moveram a uma velocidade menor que a velocidade dos eritrócitos. A adesão foi definida como leucócitos que permaneceram estacionados no endotélio vascular por um período mínimo de 30 segundos e quantificada pelo número total de células aderentes em 100 μ m de comprimento da vênula. Foram avaliados três a quatro vasos sanguíneos por animal e os resultados de rolamento e adesão foram expressos como número de células/min e número de células/100 μ m, respectivamente.

3.11. Estimativa da migração de neutrófilos e macrófagos para tecido cerebral através da dosagem da atividade das enzimas mieloperoxidase e N-acetil- β -D-glicosaminidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos. A quantificação de MPO é uma técnica que tem sido utilizada como um marcador bioquímico de recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório e permite demonstrar o componente inflamatório de forma quantitativa (MULLANE *et al.*, 1985). Já a N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. A dosagem de NAG é uma técnica utilizada como índice da infiltração dessas células nos sítios inflamatórios (BAILEY, 1988).

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

Adicionou-se 100 mg de cérebro, lobo frontal direito, a 1mL de solução de extração de citocinas (NaCl 0,4 mol/L, Na₂HPO₄ 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). Logo após, as amostras foram centrifugadas (10.000 rpm; 4°C; 10 minutos). 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 (10.000 rpm; 4°C; 10 minutos). 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 um período de aproximadamente 30 segundos. Decorrido esse tempo, foi feita a adição de 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 (10.000 rpm; 4°C; 10 minutos). O sobrenadante foi

novamente desprezado, cada tubo devidamente identificado (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 Na₃PO₄ e 0,5% (p/v) de hexadecil-trimetil brometo de amônia, pH 5,4] para o ensaio de MPO. Cada solução foi homogeneizada e congelada em freezer -80°C para posterior realização de ensaio enzimático.

3.11.2. Dosagem da atividade da MPO

O tecido processado foi submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido para liberação da enzima das vesículas citoplasmáticas e centrifugado (10.000 rpm; 4°C; 15 minutos). O sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático. A reação se inicia com a adição de 25 µL de tetrametilbenzidina (Sigma) diluída em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) na concentração final 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 80 mmol/L, pH 5,4; e em seguida foi feita uma nova incubação a 37°C por 10 minutos. Para o término da reação, adicionou-se 100 µL de H₂SO₄ 1 mol/L. A atividade da MPO foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica a 450 nm. Os resultados foram expressos como neutrófilos x 10⁵.

3.11.3. Dosagem da atividade da NAG

O tecido processado foi centrifugado (3.000 rpm; 4°C; 10 minutos) e o sobrenadante coletado. A reação iniciou-se com a adição de 100 µL das amostras em uma placa de 96 poços. Às amostras foram adicionados 100 µL do substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina, Sigma) diluído em tampão citrato/fosfato pH 4,5 na concentração de 2,24 mol/L. Sobrenadante e substrato foram incubados a 37°C durante 10 minutos. Após essa 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 405 nm. Os resultados foram expressos como NAG unidades relativas em 100 mg de tecido.

3.12. Investigação da ativação de micróglia por marcação imuno-histoquímica da proteína adaptadora de ligação ao cálcio ionizado-1

Para o estudo da ativação de micróglia foi utilizado o método de imuno-histoquímica e quantificação do total de células positivas para proteína adaptadora de ligação ao cálcio ionizado-1 (*ionized calcium-binding adaptor molecule-1*, Iba-1, Abcam 1:250). Após os animais serem devidamente anestesiados e perfundidos por via transcardíaca com paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (Na₂PO₄ 0,1M, NaHPO₄ 0,1M em pH 7,4), seus encéfalos serão retirados e colocados em solução de paraformaldeído por 24 horas. Após esse período, os tecidos foram transferidos para uma solução de sacarose 30%. Os encéfalos foram cortados em criostato na espessura de 20µm e colocados em solução crioprotetora.

Foram utilizadas as secções de córtex frontal para os procedimentos de imuno-histoquímica, colocadas em placas de 24 poços contendo PBS para a retirada do excesso de crioprotetor. Os cortes receberam lavagens sucessivas com PBS. Após o procedimento, as secções foram colocadas em solução de bloqueio de BSA 1% por 2 horas, seguidos de incubação por 12 horas com os anticorpos primários contra Iba-1. Depois do período de incubação, os cortes foram lavados e, em seguida, incubados por 1 hora com anticorpo secundário biotilado (1:1000; Kit Vecastein-Vector Lab). Após essa etapa, o tecido foi submetido à incubação por 1 hora com o complexo AB (1:1000) e revelação pelo método de DAB (3,3'-diaminobenzidina). Os cortes foram lavados em PBS e montados em lâminas e lamínulas com auxílio do meio de montagem Entelan. As imagens foram analisadas com auxílio de um microscópio de luz Zeiss e dos programas de computador AxioVision® 4.8.1 (Carl Zeiss) e ImageJ 1.6.0 (Wayne Rasband).

3.13. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (*standard error of the mean*, SEM). As diferenças entre as médias de dois grupos foram analisadas utilizando-se o teste T não-pareado. No caso de três ou mais grupos, foi utilizado One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Turkey. No caso de duas ou mais variáveis a serem analisadas, foi utilizado Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa de computador GraphPad Prism® (GraphPad Software Corporation, versão 5.00, EUA, 2007). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$.

4) RESULTADOS

4.1. A atividade locomotora está diminuída nos animais que receberam injeção de TAA

Com intuito de avaliarmos qual seria o momento mais precoce do aparecimento de sintomas nos animais que receberam TAA i.p., foi utilizado o teste comportamental em campo aberto. Podemos observar uma tendência à queda na atividade locomotora 12 horas p.i. da EH (7105 ± 1315 , N=7), entretanto sem diferença estatística quando comparado ao controle. Contudo, em 24 horas p.i. ($3845 \pm 325,5$, N=7), há significativa redução na movimentação ativa desses animais, quando comparada ao controle (9818 ± 1326 , N=8) ($p < 0.001$). Observamos tendência à melhora em 36 ($4594 \pm 410,2$, N=9) e 48 horas p.i. ($5917 \pm 804,4$, N=8), quando há aumento da locomoção, ainda estatisticamente significativa se comparada ao grupo controle ($p < 0.01$ e $p < 0.05$, respectivamente) (Figura 1).

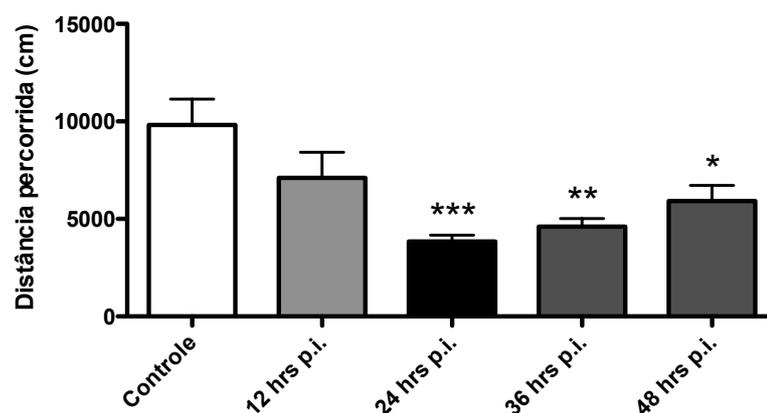


Figura 1. Diminuição da atividade locomotora dos animais que receberam TAA por via i.p.

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais e avaliados por meio do teste em campo aberto. Sua movimentação livre em uma arena foi filmada por 5 minutos e analisada pelo AnyMaze®. Quando comparados ao controle, os grupos 24, 36 e 48 horas p.i. apresentam redução estatisticamente significativa na atividade locomotora. Não houve diferença entre os grupos 12, 24, 36 e 48 horas p.i. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, resultados expressos em média \pm SEM, N: controle=8, 12 hrs p.i.=7, 24 hrs p.i.=7, 36 hrs p.i.=9, 48 hrs p.i.=8, teste estatístico One-Way ANOVA com teste de Turkey).

4.2. No momento em que os animais tornam-se sintomáticos, há intensa lesão hepática generalizada

Em 24 horas p.i. da EH por TAA, momento em que os animais tornaram-se estatisticamente sintomáticos por diminuição da atividade locomotora, optamos por investigar se a injeção de TAA foi suficiente para causar lesão hepática. Observamos então intensa necrose hemorrágica centrolobular em cortes histológicos de fígado em 24 hrs p.i. da EH (Figura 2B) quando comparados ao controle (Figura 2A). Em paralelo, há elevação dos níveis séricos de ALT (24 hrs p.i. $2903 \pm 349,7$, N=7 *versus* controle $34,51 \pm 8,61$, N=5, $p < 0.001$).

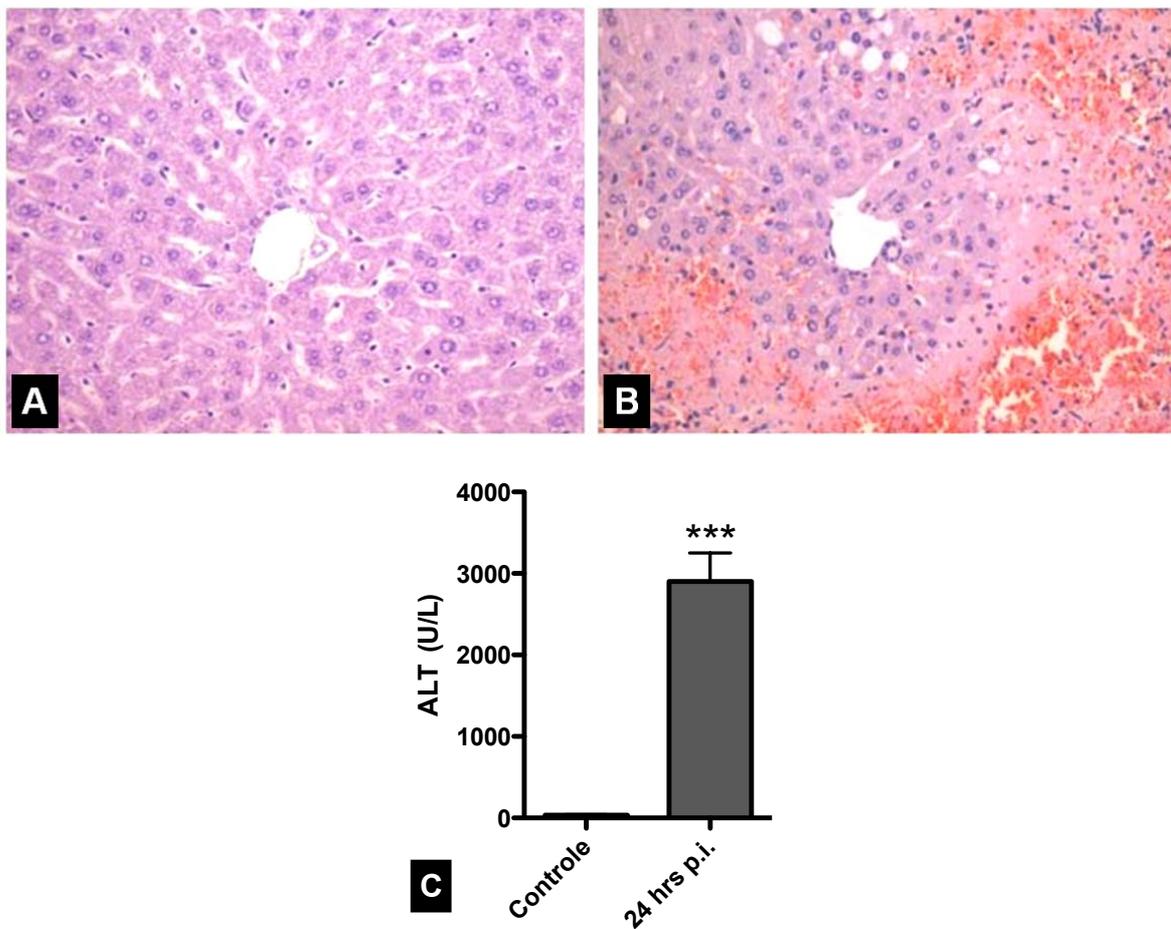


Figura 2. Evidência de lesão hepática significativa em 24 horas p.i. da EH com TAA.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais. O sangue foi retirado e o soro separado por centrifugação enquanto o fígado formolizado. **(A)** Corte histológico de fígado dos animais controle demonstrando parênquima hepático conservado com tríade portal e hepatócitos íntegros. **(B)** 24 horas após injeção de TAA, observa-se intensa necrose hemorrágica centrolobular com infiltrado leucocitário discreto e vacuolização de alguns hepatócitos. H&E, x200. **(C)** Elevação do nível sérico de ALT 24 horas após injeção de TAA comparado ao controle (***) $p < 0.001$, resultados expressos em média \pm SEM, N: controle=5, 24 hrs p.i.=7, teste de t não pareado).

4.3. Concomitante à lesão hepática extensa e à diminuição da atividade locomotora, há alterações ultraestruturais no cérebro

Com o intuito de identificar alterações ultraestruturais no cérebro desses animais no momento em que se tornam sintomáticos, realizamos análise em microscopia eletrônica. Quando comparados ao controle (Figura 3A, C, E), pudemos observar alargamento de processos perivasculares com rarefação do conteúdo citoplasmático sugestivos de edema de astrócito (Figura 3D). Além disso, notamos aumento do volume das células endoteliais (Figura 3B), tumefação das mitocôndrias (Figura 3F) e vacuolização celular (Figura 3G, H), denotando processos degenerativos.

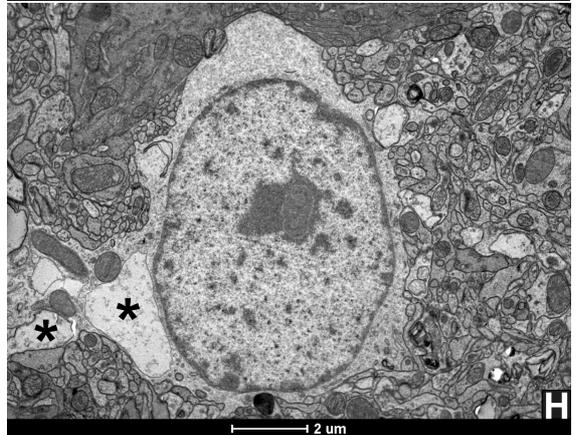
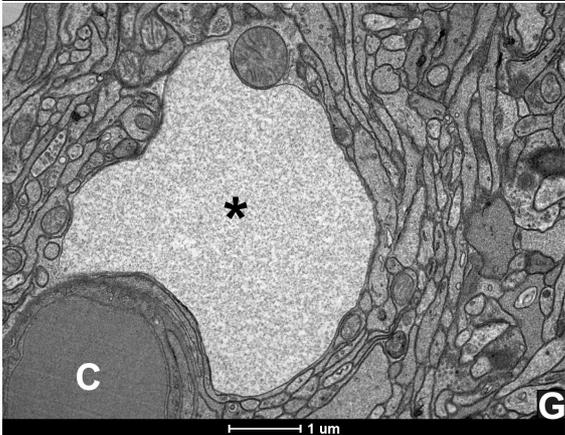
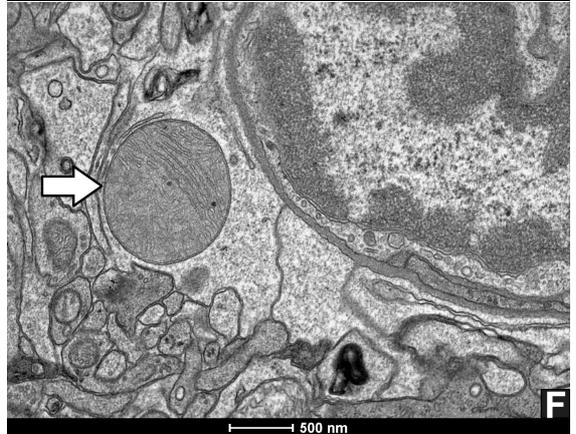
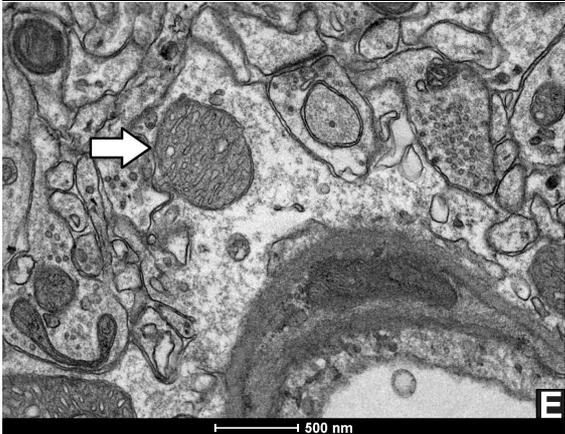
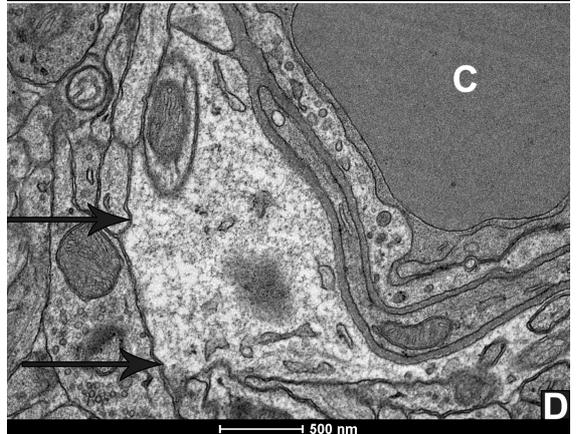
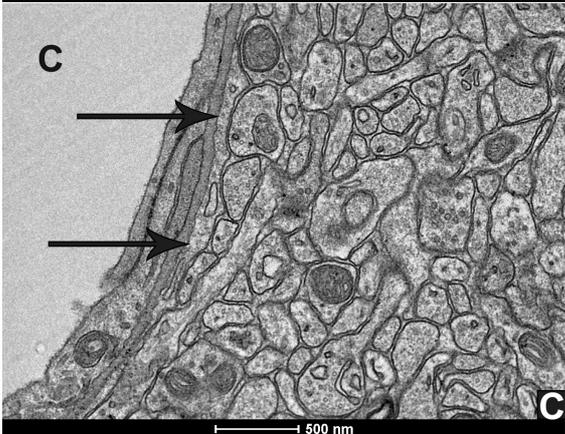
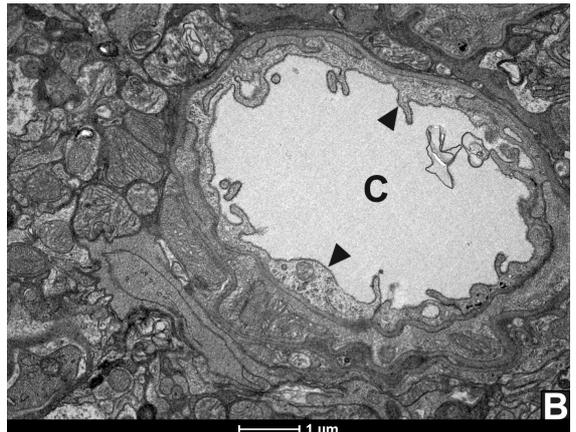
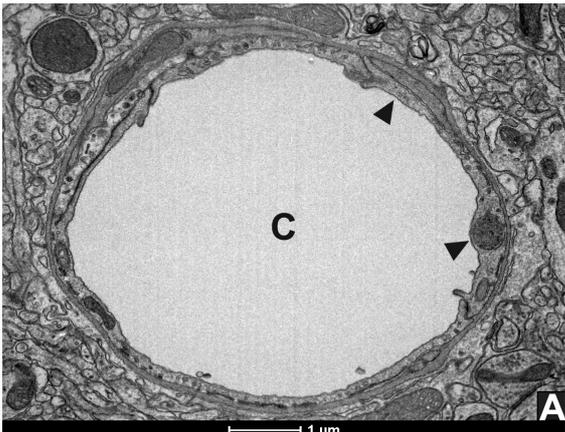


Figura 3. Alterações ultraestruturais no cérebro de animais com EH.

Os animais foram divididos em dois grupos e após perfusão transcardíaca, seus cérebros retirados e processados para análise em microscopia eletrônica. **(A & B)** Capilar cerebral e região perivascular nos animais controle **(A)** comparado aos animais com EH em 24 horas p.i. **(B)** demonstrando edema de células endoteliais (cabeça de setas pretas). **(C & D)** Corte em maior aumento da região perivascular de animais controle **(C)** comparados aos animais com EH em 24 horas p.i. **(D)** demonstrando edema de processos astrocitários perivasculares (setas pretas). **(E & F)** Corte em maior aumento mostrando mitocôndria (seta branca) nos animais controle **(E)** comparado aos animais com EH em 24 horas p.i. **(F)** evidenciando tumefação da organela com apagamento das cristas mitocondriais. **(G & H)** Vacuolização (*) celular nos animais com EH em 24 horas p.i. C= capilar

4.4. Há disfunção da barreira hemato-encefálica nos animais 24 horas após injeção de TAA

Frente aos achados de alterações celulares ultraestruturais em região perivascular cerebral, decidimos investigar a manutenção da funcionalidade da BHE. Observamos extravasamento do corante azul de Evans em tecido cerebral dos animais 24 horas p.i. da EH ($11,49 \pm 1,23$, N=5) comparado ao controle ($2,12 \pm 0,49$, N=5) ($p < 0.001$) (Figura 4), sugerindo perda da permeabilidade seletiva da BHE.

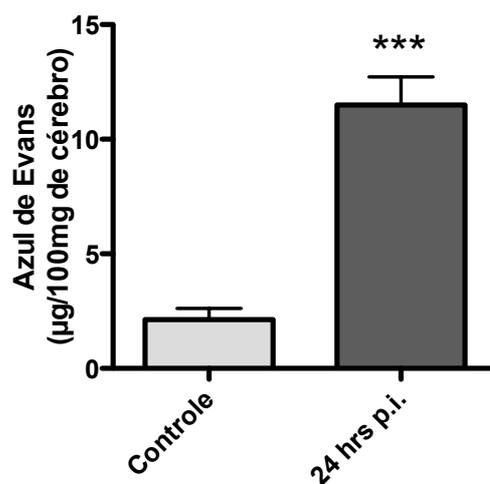


Figura 4. Extravasamento do corante azul de Evans em tecido cerebral 24 horas após injeção de TAA.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais e todos receberam injeção intravenosa do corante azul de Evans. Houve aumento significativo do extravasamento do corante para tecido cerebral 24 horas após injeção de TAA quando comparado ao controle (***) $p < 0.001$, resultados expressos em média \pm SEM, N=5, teste de t não pareado).

4.5. Há aumento dos níveis de citocinas e quimiocinas em tecido cerebral principalmente em 24 horas pós-injeção de TAA

Através da mensuração dos níveis das citocinas TNF- α e IL-1 β e das quimiocinas CXCL1/KC, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES em tecido cerebral, observamos aumento da resposta inflamatória local principalmente em 24 e 36 horas p.i. da EH por TAA.

O TNF- α apresentou maior nível em 36 horas p.i. da EH ($390,1 \pm 56,01$, N=6) quando comparado ao controle ($171,8 \pm 22,86$, N=6) ($p < 0.05$). Em 24 horas p.i. ($378,5 \pm 57,91$, N=6) houve aumento semelhante ao grupo de 36 horas, embora sem diferença estatística. Em 48 horas p.i. da EH ($308,9 \pm 64,47$, N=6), o nível de TNF- α apresentou queda, sem diferença estatística quando comparado aos outros grupos (Figura 5A).

A IL-1 β apresentou maior nível em 24 horas p.i. da EH ($143,7 \pm 14,07$, N=6) quando comparada ao controle ($94,56 \pm 9,83$, N=6) ($p < 0.05$). Em 36 ($129,2 \pm 9,47$, N=6) e 48 horas p.i. da EH ($104,4 \pm 8,93$, N=6), os níveis da citocina apresentaram queda sem diferença estatística quando comparadas aos outros grupos (Figura 5B).

A CXCL1/KC apresentou os maiores níveis cerebrais em 24 ($167,0 \pm 20,62$, N=6) e 36 horas p.i. da EH com TAA ($140,5 \pm 12,38$, N=6) com significativa diferença estatística quando comparados aos grupos controle ($77,74 \pm 4,29$, N=6) e 48 horas p.i. da EH ($80,58 \pm 16,12$, N=6) (Figura 5C).

A CCL2/MCP-1 apresentou maior nível em 24 horas p.i. da EH ($70,74 \pm 6,93$, N=6) com diferença estatística quando comparada ao controle ($27,13 \pm 5,06$, N=6) e ao grupo 48 horas p.i. da EH ($34,60 \pm 4,93$, N=6) (Figura 5D). Comportamento semelhante foi observado nos níveis cerebrais de CCL3/MIP-1 α com aumento significativo em 24 horas p.i. da EH ($272,4 \pm 27,42$, N=6) quando comparado ao controle ($140,3 \pm 9,21$, N=6) e ao grupo 48 horas p.i. da EH ($174,4 \pm 24,19$, N=6) (Figura 5E).

A CCL5/RANTES também apresentou maiores níveis em 24 ($5521 \pm 705,5$, N=6) e 36 horas p.i. da EH ($5043 \pm 352,1$, N=6) quando comparada ao controle ($2576 \pm 321,7$, N=6) e ao grupo 48 horas p.i. (2814 ± 261 , N=6) (Figura 5F).

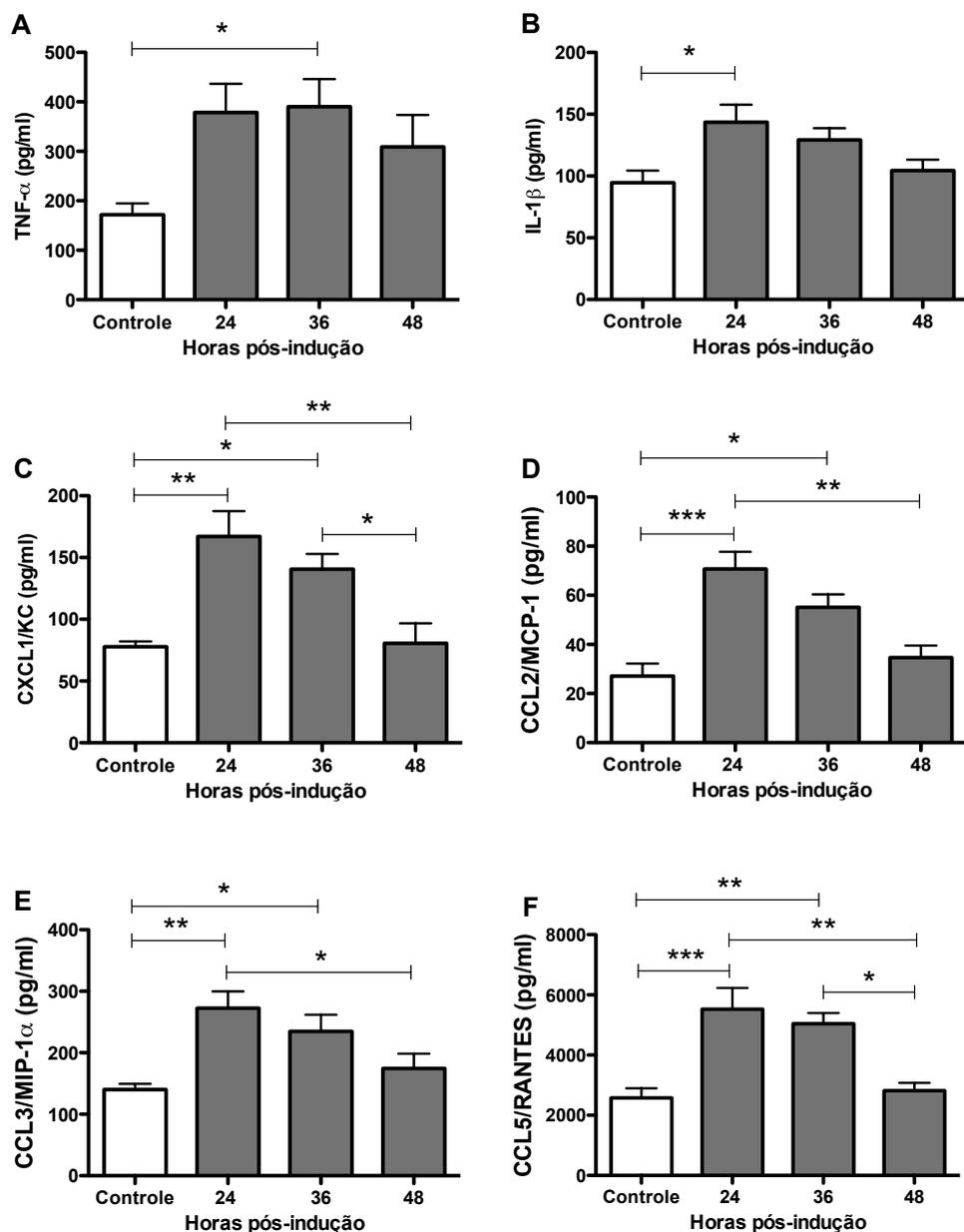


Figura 5. Aumento dos níveis de citocinas e quimionas cerebrais pelo tempo.

O animais foram divididos em quatro grupos experimentais. O lobo cerebral frontal direito foi retirado e homogeneizado. Foi observado aumento de IL-1 β (B), CXCL1/KC (C), CCL2/MCP-1 (D), CCL3/MIP-1 α (E) e CCL5/RANTES (F) principalmente em 24 horas p.i. da EH por TAA, enquanto que o aumento de TNF- α (A) foi estatisticamente diferente do controle em 36 horas p.i. da EH por TAA. Em todas as citocinas e quimiocinas mensuradas, houve tendência à queda de seus níveis pelo tempo (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, resultados expressos em média \pm SEM, N=6, teste estatístico One-Way ANOVA com teste de Turkey).

4.6. Há aumento dos níveis de citocinas e quimiocinas séricas principalmente em 48 horas pós-injeção de TAA

Através da mensuração dos níveis das citocinas TNF- α e das quimiocinas CXCL1/KC e CCL3/MIP-1 α em soro, observamos aumento da resposta inflamatória sistêmica principalmente em 48 horas p.i. da EH por TAA.

O TNF- α apresentou maior nível em 36 ($154,8 \pm 28,04$, N=4) e 48 horas p.i. da EH ($150,1 \pm 11,61$, N=4) quando comparado ao controle ($12,05 \pm 10,17$, N=4) e ao grupo 24 horas p.i. da EH ($43,91 \pm 13,47$, N=4) (Figura 6A).

A CXCL1/KC apresentou o maior nível sérico em 48 horas p.i. da EH com TAA ($735,9 \pm 205,7$, N=4) com significativa diferença estatística quando comparado ao grupo controle ($31,92 \pm 7,57$, N=4) (Figura 6B). Comportamento semelhante foi observado no nível sérico de CCL3/MIP-1 α com aumento significativo em 48 horas p.i. da EH ($79,93 \pm 4,08$, N=4) quando comparado ao controle ($30,55 \pm 4,13$, N=4) (Figura 5C).

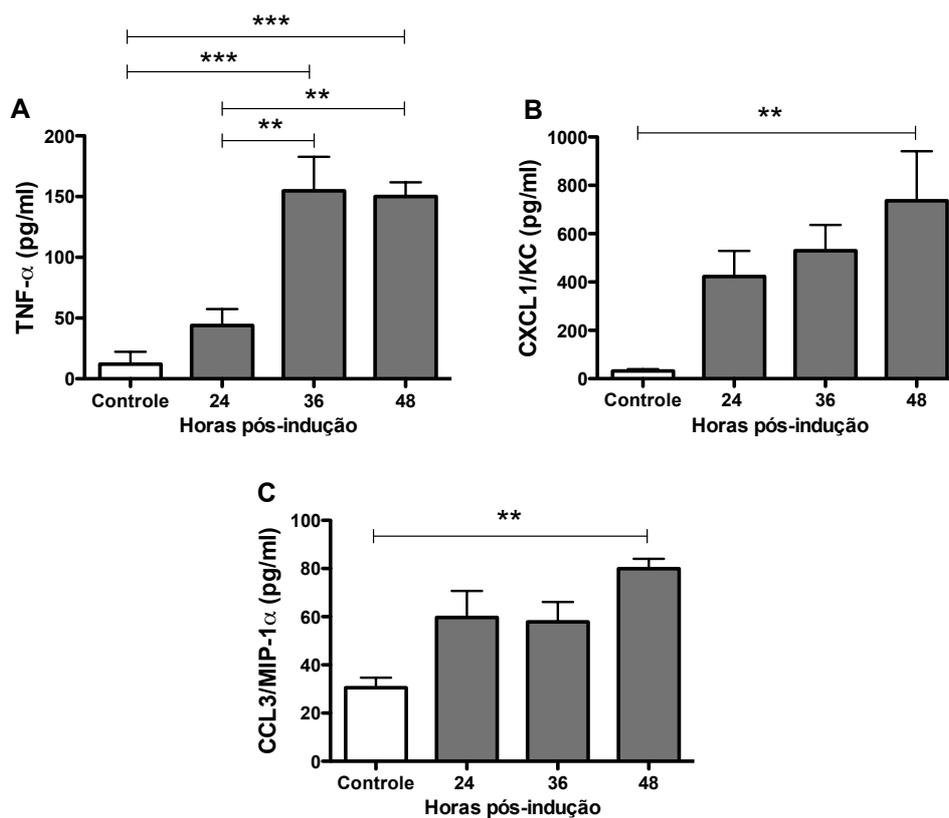


Figura 6. Aumento dos níveis de citocinas e quimionas séricas pelo tempo.

O animais foram divididos em quatro grupos experimentais. O sangue foi coletado e o soro separado por centrifugação. Foi observado aumento de CXCL1/KC (**B**) e CCL3/MIP-1 α (**C**) principalmente em 48 horas p.i. da EH por TAA, enquanto que o aumento de TNF- α (**A**) foi estatisticamente diferente do controle em 36 e 48 horas p.i. da EH por TAA (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, resultados expressos em média \pm SEM, N=4, teste estatístico One-Way ANOVA com teste de Turkey).

4.7. Há um maior gradiente de TNF- α e de CCL3/MIP-1 α no cérebro e de CXCL1/KC no soro

Comparando os níveis de TNF- α , CCL3/MIP-1 α e CXCL1/KC entre o cérebro e o soro, observamos concentrações maiores de TNF- α e de CCL3/MIP-1 α no cérebro e gradiente intertecidual maior em 24 e 36 horas p.i. da EH com TAA (Figura 7A e 7B, respectivamente). Por outro lado, a CXCL1/KC apresentou concentração maior no soro e gradiente maior em 36 e 48 horas p.i. da EH (Figura 7C).

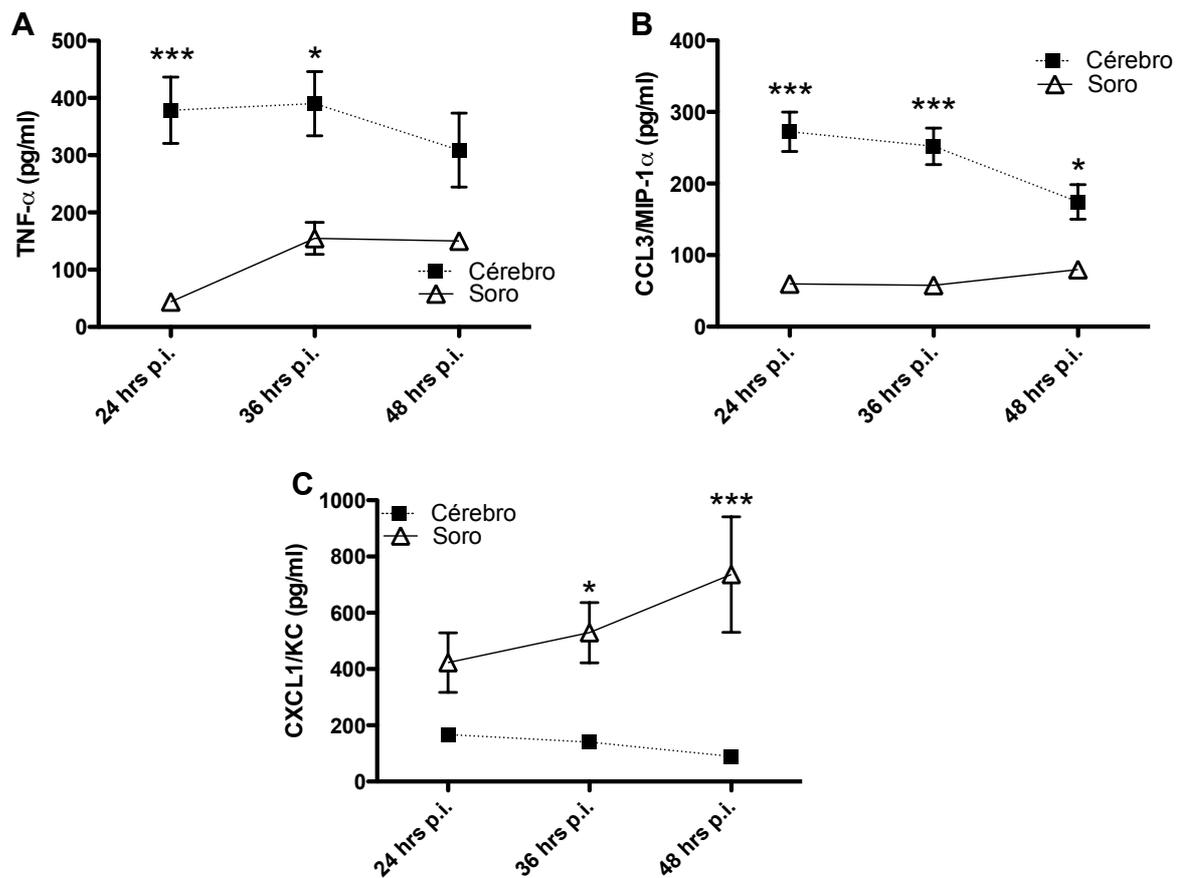


Figura 7. Diferença de concentração de TNF- α , CXCL1/KC e CCL3/MIP-1 α entre cérebro e soro.

Os níveis da citocina TNF- α e das quimiocinas CXCL1/KC e CCL3/MIP-1 α encontrados nos experimentos anteriores foram plotados em um mesmo gráfico para comparação entre si. Há maior concentração cerebral de TNF- α (**A**) e de CCL3/MIP-1 α (**B**) no cérebro, com gradiente de citocinas mais significativo em 24 e 36 horas p.i. Por outro lado, a concentração de CXCL1/KC (**C**) é maior no soro e gradiente de citocinas mais significativo em 36 e 48 horas p.i. (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, resultados expressos em média \pm SEM, teste estatístico Two-Way ANOVA com teste de Bonferroni).

4.8. Há redução da atividade de enzimas antioxidantes no cérebro dos animais 24 horas p.i. da EH por TAA

Há redução significativa da atividade da enzimas SOD no cérebro de animais 24 horas p.i. da EH por TAA ($2,19 \pm 0,15$, N=3) quando comparados ao controle ($2,85 \pm 0,18$, N=4) ($p < 0.05$, figura 8A). O mesmo comportamento foi observado na atividade da enzima GSH-Px ($25,90 \pm 2,25$, N=3) comparado ao controle ($37,68 \pm 2,56$, N=5) ($p < 0.05$, figura 8B) e na atividade da enzima catalase ($316,75 \pm 38,39$, N=3) comparado ao controle ($467,86 \pm 35,62$, N=4) ($p < 0.05$, figura 8C). Ao avaliarmos indiretamente o nível de peroxidação lipídica, no cérebro dos animais 24 horas pós injeção de TAA, pela dosagem de TBARS, observamos tendência ao aumento ($163,70 \pm 11,73$, N=3) quando comparados aos controles ($116,12 \pm 4,74$, N=4), embora sem diferença estatística (figura 8D).

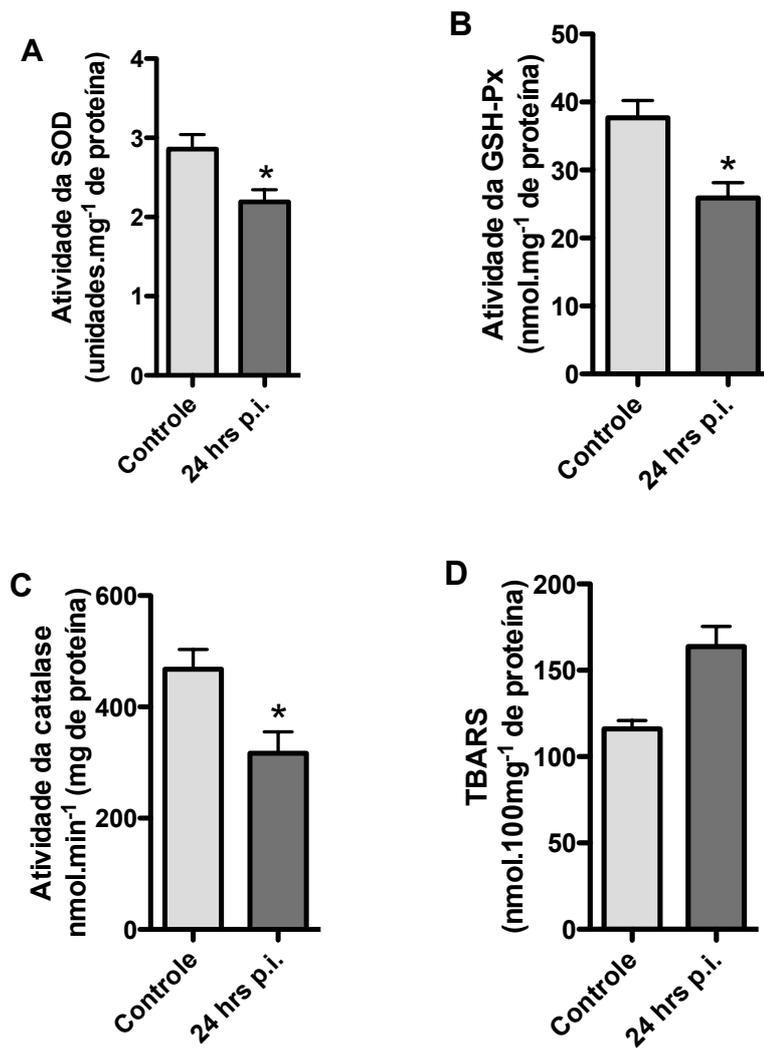


Figura 8. Redução significativa da atividade das enzimas antioxidantes no cérebro pós TAA.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais e o lobo frontal esquerdo do cérebro retirado e homogeneizado. Houve redução estatisticamente significativa na atividade das enzimas SOD (A), GSH-Px (B) e catalase (C). Os níveis de TBARS (D) apresentaram tendência ao aumento entretanto sem diferença estatística. (* $p < 0.05$, resultados expressos em média \pm SEM, teste de t não pareado).

4.9. Há aumento no rolamento de leucócitos em microvasos cerebrais em 48 horas p.i. da EH por TAA

Em decorrência do gradiente de citocinas encontrado entre cérebro e soro, decidimos avaliar o comportamento da migração leucocitária para tecido cerebral através de microscopia intravital. Observamos aumento do rolamento de leucócitos por minuto em 48 horas p.i. da EH por TAA ($10,33 \pm 0,87$, N=4) quando comparado ao controle ($1,65 \pm 0,47$, N=4) e aos grupos 12 ($1,77 \pm 0,96$, N=3), 24 ($1,66 \pm 0,66$, N=5) e 36 horas p.i. ($4,19 \pm 1,05$, N=6) ($p < 0.001$, Figura 9A). Por outro lado, não houve diferença estatística na adesão leucocitária entre os grupos controle ($0,15 \pm 0,08$, N=4), 12 ($1,33 \pm 0,86$, N=3), 24 ($1,53 \pm 0,68$, N=5), 36 ($2,33 \pm 0,76$, N=6) e 48 horas p.i. ($2,75 \pm 1,01$, N=4) (Figura 9B).

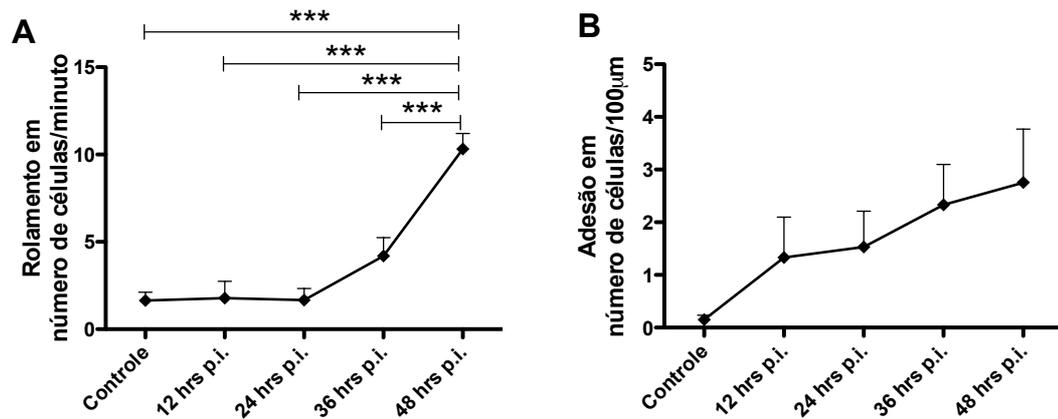


Figura 9. Comportamento de migração leucocitária para tecido cerebral.

Os animais foram divididos em cinco grupos, devidamente anestesiados, e uma craniotomia foi realizada para estudo *in vivo* do comportamento leucocitário. Houve aumento do rolamento de leucócitos estatisticamente significativo em 48 horas p.i. da EH por TAA (**A**) sem diferença de adesão celular entre os grupos (**B**) (***) $p < 0.001$, resultados expressos em média \pm SEM, N: controle=4, 12 hrs p.i.=3, 24 hrs p.i.=5, 36 hrs p.i.=6, 48 hrs p.i.=4, teste estatístico One-Way ANOVA com teste de Turkey).

4.10. A indução da EH por TAA leva ao aumento da atividade da N-Acetil- β -D-Glicosaminidase no cérebro

Ao constatar aumento de rolamento em 48 horas p.i. e uma tendência ao aumento da adesão leucocitária pelo tempo, embora sem diferença estatística, decidimos investigar a presença de leucócitos em tecido cerebral pela atividade das enzimas MPO e NAG. Notamos então que não houve diferença estatisticamente relevante entre os grupos controle ($920,3 \pm 107,1$, N=8), 12 ($1046,0 \pm 92,6$, N=8), 24 ($1183,0 \pm 96,9$, N=9), 36 ($1018,0 \pm 136,2$, N=9) e 48 horas p.i. da EH por TAA ($1339,0 \pm 188,8$, N=8) quanto ao número de neutrófilos, quantificado pela atividade da MPO (Figura 10A). Por outro lado, a atividade da enzima NAG mostrou-se aumentada quando comparado o grupo 36 ($7,78 \pm 0,34$, N=9) e 48 ($7,65 \pm 0,66$, N=8) com 12 horas p.i. da EH ($6,63 \pm 0,22$, N=6) ($p < 0.01$ e $p < 0.05$, respectivamente) (Figura 10B).

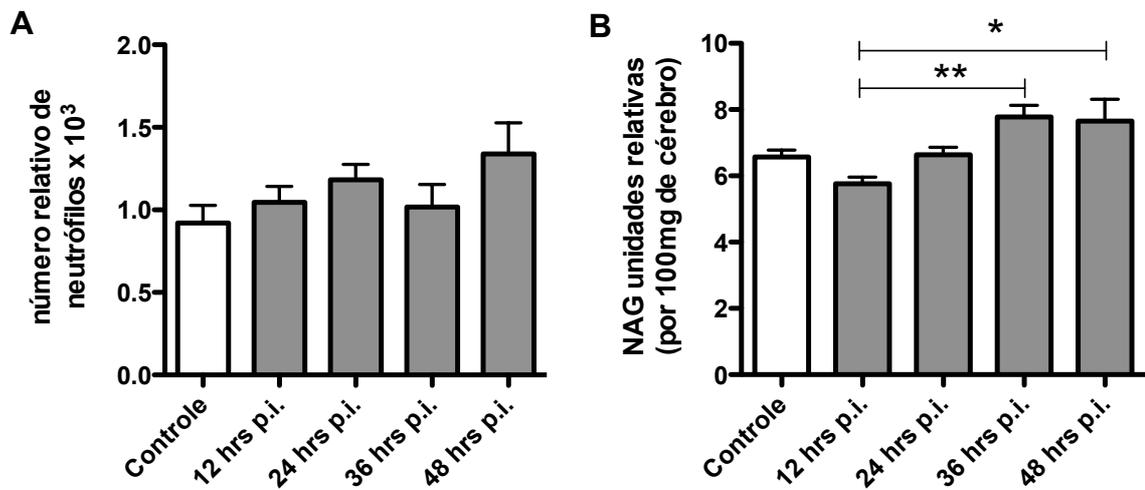


Figura 10. Atividade das enzimas MPO e NAG como quantificação de leucócitos em tecido cerebral

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais e o lobo frontal direito retirado e homogeneizado. Nota-se aumento da atividade da NAG em 36 e 48 horas p.i. da EH quando comparado ao grupo 12 horas p.i. **(B)**. Demais comparações entre os grupos não demonstraram diferença estatística. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, resultados expressos em média \pm SEM, N: controle=8, 12 hrs p.i.=8, 24 hrs p.i.=9, 36 hrs p.i.=9, 48 hrs p.i.=8, teste estatístico One-Way ANOVA com teste de Turkey).

4.11. Avaliação histológica do cérebro em 48 horas p.i. da EH por TAA não revela infiltrado inflamatório compatível com macrófagos

Partindo do princípio de que em 48 horas p.i. da EH há gradiente quimiotático, aumento do rolamento leucocitário e aumento da atividade da NAG, utilizamos a técnica H&E para investigar a presença de macrófagos em tecido cerebral. Contudo, sem demonstrar infiltrado inflamatório, foi observado presença de edema proteináceo perivascular (Figura 11B, setas) e hemorragia (Figura C) quando comparados ao grupo controle (Figura 11A). No detalhe, notamos células astrocitárias Alzheimer tipo II.

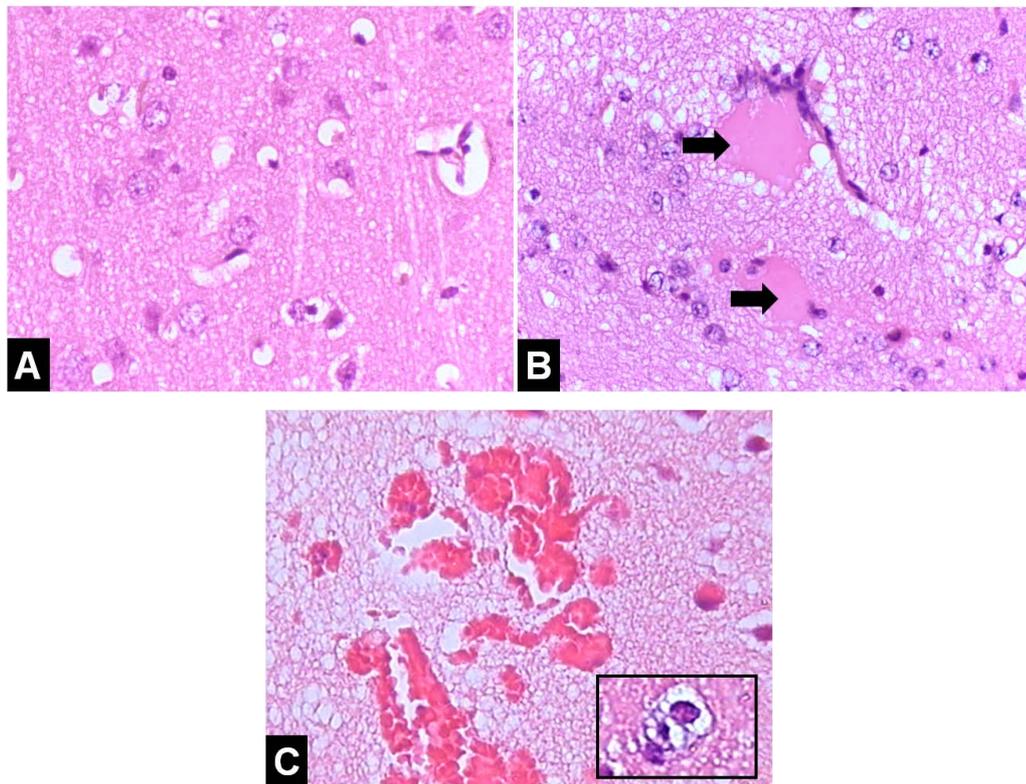


Figura 11. Corte histológico de cérebro em 48 horas p.i. da EH por TAA.

(A) Tecido cerebral normal de animais contole; (B) Tecido cerebral dos animais que receberam TAA mostrando edema proteináceo perivascular (setas) e (C) presença de hemorragia. No detalhe (C), astrócito Alzheimer tipo II. H&E, x400, detalhe x1000.

4.12. Análise imuno-histoquímica de córtex cerebral não revelou maior densidade celular de micróglia

Para investigarmos a ativação de micróglia e sua possível participação no processo neuroinflamatório, optamos por avaliar a densidade celular por marcação imuno-histoquímica da proteína Iba-1. A quantidade de células por área de córtex cerebral não foi estatisticamente diferente entre os grupos controle (2.017 ± 0.22 , N=5), 24 (2.592 ± 0.25 , N=5) e 36 horas p.i. da EH (2.408 ± 0.37 , N=4). Além disso, também não notamos diferença morfológica entre as células marcadas de cada grupo avaliado. Foi observado aparência estrelada com prologamentos finos ramificados do corpo celular.

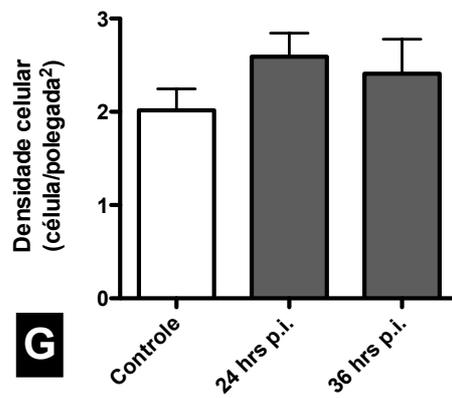
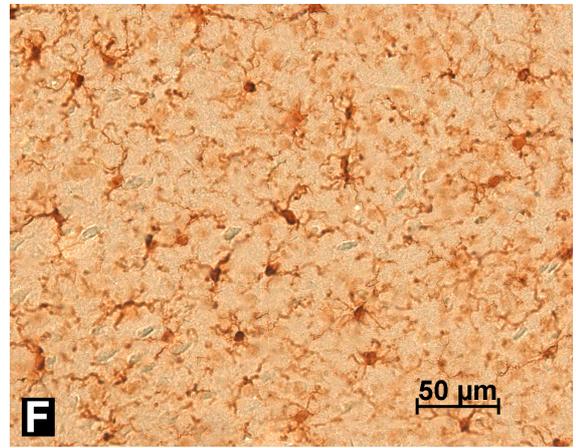
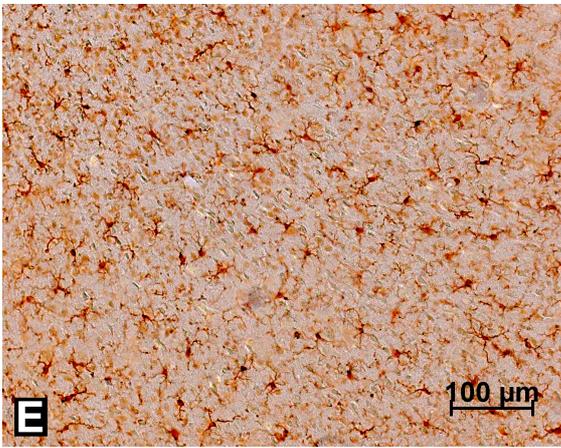
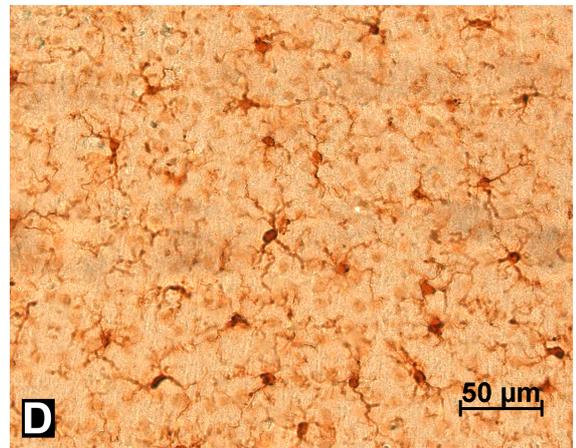
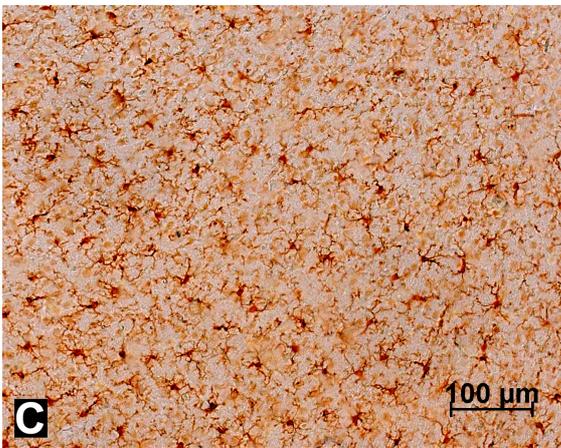
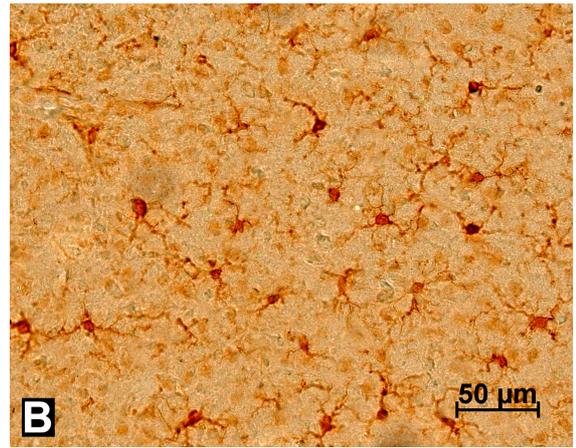
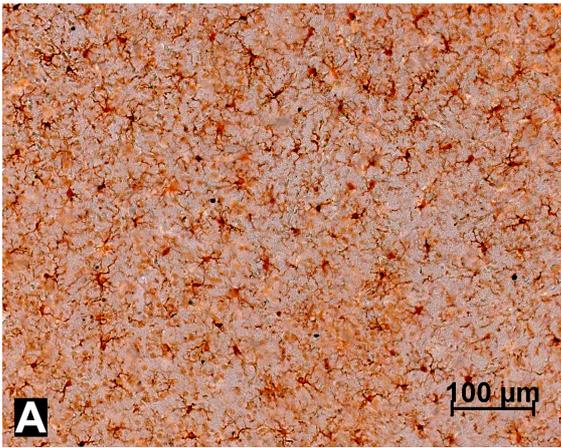


Figura 12. Análise morfológica por imuno-histoquímica de córtex cerebral e mensuração da densidade celular.

Os animais foram divididos em dois grupos e após perfusão transcardíaca, seus cérebros retirados e processados para análise em microscopia óptica. **(A & B)** Marcação da proteína Iba-1 em tecido de córtex cerebral normal dos animais controle. Micróglia em estado de repouso com prolongamentos finos em aspecto ramificado. **(C & D e E & F)** Marcação de Iba-1 nos grupos 24 e 36 horas, respectivamente, também com aspecto celular de repouso. **(G)** Densidade celular por número de células em uma área de uma polegada (*inch*) ao quadrado, sem diferença estatística entre os grupos. (A, C & E: imuno-histoquímica de Iba-1, x20; B, D & F: imuno-histoquímica de Iba-1, x40; G: resultados expressos em média \pm SEM, N: controle=5, 24=5, 36=4).

5) DISCUSSÃO

A EH é uma síndrome neuropsiquiátrica grave e progressiva que se desenvolve em pacientes com FHA em torno de 1-2 semanas após a instalação dos sintomas hepáticos, como náusea e vômitos ou aumento sérico de bilirrubinas. A taxa de sobrevivência de pacientes com FHA varia de acordo com a etiologia da lesão hepática e a gravidade da EH (LEE, 2012).

Atualmente, o único tratamento definitivo para a FHA é o transplante hepático, procedimento médico de grande complexidade técnica, alto custo financeiro e com necessidade de imunossupressão permanente do paciente pós-cirurgia (BERNAL *et al.*, 2010; STRAVITZ & KRAMER, 2009). Em uma análise de 1696 pacientes com FHA, 39% foram indicados ao transplante, entretanto, apenas 24% foram submetidos à cirurgia e, destes, 9% morreram durante o procedimento. Dos 1696, apenas 49% sobreviveram recebendo tratamento exclusivamente clínico e 27% foram a óbito (LEE, 2012). Embora o surgimento do transplante tenha mudado o painel de mortalidade dos pacientes com FHA, hoje, a taxa de sobrevivência em 1 ano pós-transplante é de 79% em estatística europeia (GERMANI *et al.*, 2012).

Em um estudo recente, todos os pacientes (N=90) avaliados apresentavam algum grau de EH e foram submetidos ao transplante hepático. Desses, foi observado sinais de edema cerebral em 33% através de neuroimagem. Após o procedimento, 7 (7,8%) pacientes evoluíram com déficits neurológicos permanentes, desde prejuízo funcional até morte encefálica. Desses sete, 5 apresentavam edema cerebral grave pré-transplante (TAN *et al.*, 2012).

A EH é uma patologia cuja evolução culmina em edema cerebral, hipertensão intracraniana, herniação cerebral e morte (VAQUERO *et al.*, 2003a). Rolando e colaboradores (2000) investigaram a relação entre a inflamação sistêmica e a FHA. Nesse estudo, pacientes com SIRS à admissão, foram comparados aos sem SIRS e evoluíram com pior progressão da EH, aumento da PIC durante a internação ($p = 0.022$) e maior chance de ir a óbito ($p = 0.002$). Nos casos em que houve concomitância de SIRS e bacteremia, a taxa de mortalidade chegou a 76,9%. Além disso, nos pacientes com EH grave ou aumento da PIC, a chance de desenvolver SIRS e infecções foi significativamente maior ($p < 0.001$). Outro estudo realizado com 227 pacientes apresentando FHA medicamentosa, a presença de SIRS também estava relacionada à piora da EH quando comparado aos que não desenvolveram SIRS ($p < 0.05$) (VAQUERO *et al.*, 2003b). Nesse grupo, aqueles que apresentavam FHA por

intoxicação com APAP (N=96), apresentaram rápida piora da EH quando adquiriram algum quadro infeccioso ($p < 0.01$).

Dessa maneira, observamos evidências de um cenário sobre a EH e seu envolvimento estreito com o prognóstico e evolução do paciente com FHA. Em paralelo a essa relação, caminha o quadro inflamatório sistêmico colaborando para acelerar a deterioração do quadro. A partir dessa premissa, desenvolvemos um modelo animal de EH com o intuito de estudar essa relação em um momento anterior ao quadro grave, quando seria ideal para realizar alguma intervenção efetiva no sentido de lentificar a evolução da EH. Assim, poderia-se evitar complicações infecciosas, aumentar as chances de uma boa evolução pós-transplante, recuperação espontânea do fígado, além de maior sobrevida e melhor qualidade de vida do paciente.

Ao avaliarmos o camundongo com FHA induzida por TAA através de teste em campo aberto, encontramos o momento mais precoce de manifestação sintomática em 24 horas p.i. da EH. Interessantemente, esse também foi o momento em que os animais apresentavam-se com menor atividade locomotora, denotando maior gravidade dos sintomas. O fato de realizarmos o experimento com grupos distintos e nosso modelo apresentar o auge de sua mortalidade entre 24 e 48 horas poderia explicar esse achado (MIRANDA *et al.*, 2010). Os animais clinicamente piores tendem a morrer nesse período e os grupos de 36 e 48 horas p.i. da EH seriam formados majoritariamente pelos potenciais sobreviventes. Dessa maneira, seriam animais que podem ter desenvolvido uma EH menos grave. Esse é um aspecto do nosso modelo que deve sempre ser levado em consideração, pois pode dificultar a interpretação dos resultados observados em 36 horas p.i. da EH, já que o grupo representa alguns animais em estágio mais grave e outros em recuperação.

A análise do comportamento locomotor é um parâmetro largamente utilizado em experimentos animais para estudar a EH (BRÜCK *et al.*, 2011; CHANG *et al.*, 2011; RANGROO THRANE *et al.*, 2012). A presença de letargia e diminuição da movimentação é um sinal precoce, fácil de monitorizar, objetivo e sua reversão indica recuperação do quadro (BRÜCK *et al.*, 2011).

A atividade locomotora do animal é fundamental para outros testes cognitivos, como para a exploração de objetos e o nado no labirinto aquático de Morris usados para avaliar memória e aprendizado. Dessa maneira, inviabiliza o uso de outros testes comportamentais, pois cria um viés de resultado pela baixa movimentação. Uma bateria de avaliação neurológica baseada em reflexos motores e de tronco encefálico também pode ser usada.

Baseia-se na perda progressiva desses reflexos conforme a EH progride e apresenta boa correlação com a movimentação (AVRAHAM *et al.*, 2011; JAYAKUMAR *et al.*, 2011).

Frente ao quadro sintomático encontrado em nosso modelo, consideramos 24 horas como um bom momento para avaliarmos os parâmetros inflamatórios desencadeados pela indução da EH pela TAA, pois trata-se de um momento precoce, quando surgem os sintomas e ainda não há mortalidade (MIRANDA *et al.*, 2010). Mas, antes, investigamos se, concomitante às alterações comportamentais, havia lesão hepática e alteração morfológica cerebral que justificasse o quadro.

Apesar de haver muitos modelos animais com TAA, a grande maioria utiliza ratos. Esse é um fator limitante para fazermos comparações ao nosso modelo, uma vez que diferenças interespecíficas podem gerar resultados divergentes. Em um estudo cinético sobre as alterações provocadas por uma dose única de TAA em ratos pelo tempo, Chen e colaboradores (2008) demonstraram que a lesão hepática varia de maneira dose-dependente. Os autores encontraram o pico sérico de ALT em 24 horas pós-injeção para uma dose menor (70 mg/kg) e em 48 horas para uma dose maior (280 mg/kg). Em ambas as doses, o pico sérico de NH₃ ocorreu em 24 horas p.i. da lesão hepática.

A lesão hepática causada pela TAA apresenta um padrão histológico de necrose centrolobular, local onde há maior concentração da enzima CYP2E1, pertencente ao complexo microsomal do citocromo P450, responsável por transformar a TAA em seu metabólito ativo S-dióxido de TAA (ASHWORTH *et al.*, 1965; CHEN *et al.*, 2008; CHILAKAPATI *et al.*, 2005; FORKERT *et al.* 1991). O padrão de lesão histológica observado em nossos animais está de acordo com o descrito na literatura e ocorre concomitantemente ao aumento sérico de ALT, corroborando a lesão hepática causada pela TAA em 24 horas p.i. da EH. Embora não tenha sido realizado um estudo cinético da variação da ALT, Miranda e colaboradores (2010) já descreveram que seu nível sérico é estável comparando animais que receberam 600mg/kg de TAA 24 e 48 horas após a injeção. Como nosso objetivo não é descrever a lesão hepática, mas estudar as alterações neurológicas no momento de aparecimento dos sintomas, nos restringimos apenas à constatação da existência de necrose hepatocelular.

Apesar de não terem sido mensurados os níveis de NH₃ ou Gln em nosso modelo, demonstramos, por microscopia eletrônica, a presença de alterações ultraestruturais em células cerebrais. O edema celular de astrócito, mais especificamente na região dos prolongamentos perivasculares, conhecidos por pé de astrócito, é uma característica típica da

EH (KATO *et al.*, 1992; NORENBORG & LAPHAM, 1974). Em um estudo da região perivascular cerebral de pacientes com FHA, Kato e colaboradores (1992), utilizando microscopia eletrônica, relataram diversas alterações morfológicas semelhantes às observadas em nosso modelo, corroborando nossos achados e engrossando nossas evidências de que o animal desenvolve a EH após a injeção de TAA. Nesse trabalho, foi descrito edema celular de processos perivasculares de astrócitos, de pericitos e de células endoteliais - componentes da unidade neurovascular, que forma a BHE. Além disso, os autores também descreveram alargamento da membrana basal e presença de vacuolização celular principalmente em pericitos. Outro estudo investigou, por microscopia eletrônica, mitocôndrias não-sinápticas isoladas de cérebro de ratos com EH induzida por TAA e demonstraram importante edema dessas estruturas semelhante ao observado em nossos animais (CHADIPIRALLA *et al.*, 2012).

Por fim, foi investigado a integralidade das junções endoteliais e observou-se que, mesmo frente às alterações celulares observadas, elas permanecem intactas (KATO *et al.*, 1992). Assim sendo, o edema celular da EH é classificado como do tipo citotóxico - ou seja, gerado principalmente por edema celular e não por aumento do conteúdo aquoso através de extravazamento de plasma sanguíneo pela BHE. Chavarria e colaboradores (2010) corroboram essa hipótese ao avaliar, por ressonância magnética, o encéfalo de ratos com FHA induzida por desvascularização hepática. Nesse trabalho, os autores demonstraram edema cerebral com BHE intacta em animais pré-coma e em coma.

Em nosso trabalho, investigamos a funcionalidade da BHE através da técnica de extravazamento vascular do corante azul de Evans e demonstramos disfunção da permeabilidade seletiva. Entretanto, esse resultado não foi reproduzível em outro grupo de pesquisa do nosso instituto utilizando o mesmo modelo (dados não publicados).

A disfunção da BHE é um ponto de discussão intensa na fisiopatologia da EH quando resultados divergentes foram descritos na literatura. Em dois trabalhos utilizando modelo murino de EH induzida por AOM, Shimojima e colaboradores (2008) reportaram aumento do extravazamento de fluoresceína de sódio no estágio de coma enquanto Bémeur e colaboradores (2010a) não encontraram os mesmos achados utilizando a imunoglobulina G para avaliar a integralidade da BHE. A ruptura e disfunção da BHE não parece ser um evento essencial ao desenvolvimento da EH, surgindo, aparentemente, como uma consequência do processo evolutivo da doença e em estágios mais avançados (RANGROO THRANE *et al.*, 2012). É altamente sugestivo que o principal componente na gênese do edema cerebral seja o

citotóxico. Os achados referentes a integralidade da BHE precisam ser aprofundados e melhor estudados para definirmos essa variabilidade de comportamento da BHE. Além disso, outros processos simultâneos, como os níveis séricos de TNF- α , podem influenciar diretamente a funcionalidade da BHE (WANG *et al.*, 2011).

O TNF- α é uma citocina proinflamatória diretamente envolvida no desenvolvimento e gravidade da EH como demonstrado em estudos com pacientes com FHA (GUPTA *et al.*, 2010; JALAN *et al.*, 2004; ROLANDO *et al.*, 1995). Avaliando o nível sérico de TNF- α , observamos aumento em 36 e 48 horas p.i. da EH, com baixos níveis em 24 horas, embora o número de animais foi relativamente pequeno por grupo. Chastre em colaboradores (2012), em seu estudo utilizando o etanercept em animais com EH induzida por AOM, relatou aumento do nível sérico do TNF- α pelo tempo, embora discreto. Interessantemente, o bloqueio do sTNFR-2 acarretou em melhora importante da EH, com atraso na instalação do coma, compatível com o observado por Bêmeur e colaboradores (2010c) ao utilizar animais *knock-out* para TNFR-1, evidenciando o importante papel do TNF- α no tempo de evolução e piora da EH.

No cérebro, observamos aumento significativo de TNF- α somente em 36 horas p.i. da EH com redução em 48 horas p.i. da EH, em um comportamento inverso ao observado na atividade locomotora, quando essa aumenta, embora sem diferença significativa, se comparado com o grupo 36 horas p.i. da EH. Contudo, não é possível estabelecer uma correlação direta entre o nível dessa citocina e a sintomatologia dos animais, por se tratarem de dois experimentos distintos.

Ao compararmos os níveis de TNF- α no sangue e no cérebro do nosso modelo, observamos uma diferença máxima em 24 horas p.i. da EH, com maior nível cerebral do que sérico (Figura 7A). É interessante ressaltar que esse achado coincide com o momento em que os animais apresentam maior diminuição da atividade locomotora. Essa relação também foi observada em pacientes com FHA nos quais a diferença entre os níveis de TNF- α da veia jugular interna, por onde drena o fluxo sanguíneo cerebral, e da artéria carótida interna, por onde entra o fluxo sanguíneo cerebral, era maior naqueles que apresentaram hipertensão intracraniana mais grave (WRIGHT *et al.*, 2007). O alto nível cerebral de TNF- α também parece estar relacionado à gravidade do quadro da EH em modelos animais, quando estes atingem o coma (BÉMEUR *et al.*, 2010c; JIANG *et al.*, 2009a; JIANG *et al.*, 2009b). Em um estudo em que foi avaliado a concentração de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no sangue e no líquido de ratos pós-desvascularização hepática, observou-se aumento significativo apenas de IL-6, em

ambos os tecidos, 6 horas após indução da FHA, e ausência de edema cerebral. Por outro lado, ao atingir o coma, esses animais apresentavam aumento significativo nos níveis cerebrais de TNF- α , IL-1 β e IL-6, além de franco edema cerebral (JIANG *et al.*, 2009b).

Utilizando esse mesmo modelo e tempo de avaliação, mas em outro estudo, os autores observaram aumento significativo da expressão da eNOS e da iNOS, mas sem produção de nitrato, no cérebro dos animais com FHA por isquemia hepática já em 6 horas p.i. da EH (JIANG *et al.*, 2009c). Interessante observar que, se colocados lado a lado, os estudos em conjunto demonstram que, antes do aumento expressivo de TNF- α e IL-1 β no cérebro e do edema, há aumento de IL-6 e aumento da expressão de enzimas produtoras de NO.

Em um estudo utilizando cultura celular de astrócito e de micróglia separadamente, a exposição à NH₃ desencadeou a expressão de Iba-1 na micróglia, demonstrando sua ativação, com produção de ROS e expressão de iNOS, mas sem aumento dos níveis de citocinas. Já na cultura de astrócitos houve aumento da expressão de mRNA para IL-1 β e de iNOS (ZEMTSOVA *et al.*, 2011). Infelizmente, os autores não realizaram co-cultura desses tipos celulares e esses resultados devem ser considerados com cautela, uma vez que há uma enorme diferença entre o ambiente *in vivo* e *in vitro*.

Em nosso modelo experimental, observamos aumento significativo de IL-1 β em tecido cerebral já em 24 horas p.i., em congruência com os achados nesse trabalho. Animais *knock-out* para receptor de IL-1 β também apresentam melhor evolução com redução do edema e aumento do tempo necessário para desenvolver coma (BÉMEUR *et al.*, 2010c). Dessa maneira, a IL-1 β também parece estar envolvida na evolução da EH, e em sua gravidade, mas com um papel mais precoce do que a TNF- α .

Ao avaliarmos o estresse oxidativo por medida indireta da atividade de enzimas antioxidantes, observamos, em 24 horas p.i. da EH, concomitante ao aumento de citocinas, queda da atividade da SOD, GSH-Px e catalase. Embora essa seja uma medida indireta, em um estudo avaliando os mesmos parâmetros, Kosenko e colaboradores (2003) observaram o mesmo perfil em ratos que receberam injeção intraperitoneal de NH₃. Os autores também descreveram maior produção de ROS. Um fato intrigante é que esses achados foram todos revertidos por um inibidor de receptor NMDA, o qual está envolvido na via Glu-cGMP-NO, cujo produto final é o NO. Embora nós não avaliemos diretamente os níveis de ROS e RNS em nossos animais, essas são evidências importantes para tentarmos entender o panorama inflamatório e oxidativo, e sua relação, em nosso modelo. Um ponto fundamental a ser

investigado é o nível de produção de NO em nosso modelo e sua importância contemporânea à redução das enzimas antioxidantes e à produção das citocinas pró-inflamatórias.

Dessa maneira, trabalhando com o modelo de EH em 24 horas p.i. por TAA, podemos inferir que estamos lidando com um momento interessante do ponto de vista terapêutico. Notamos que, nesse momento, o animal apresenta sintomas exuberantes sem ainda haver aumento estatisticamente significativo de TNF- α no cérebro ou no soro. Observamos também estresse oxidativo e aumento dos níveis cerebrais de IL-1 β , fenômenos relativamente precoces na fisiopatologia da EH, como demonstrado por outros estudos. Por outro lado, outros trabalhos evidenciaram a IL-1 β como uma citocina expressa em tecido cerebral em um momento posterior ao aumento dos níveis de IL-6 e expressão de enzimas produtoras de NO no cérebro de ratos com EH (JIANG *et al.*, 2009c). Dessa maneira, devemos considerar a importância de investigarmos o cenário fisiopatológico em um momento anterior ao de 24 horas e posterior à 12 horas p.i. da EH. Assim, poderemos elucidar alguns pontos importantes na relação entre as citocinas e o estresse oxidativo. Ademais, a avaliação da citocina IL-6, ainda não realizada nesse estudo, será de suma relevância.

Nós observamos também, em nosso modelo, aumento significativo dos níveis cerebrais das quimiocinas CXCL1/KC, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES. Na literatura não há quaisquer relatos sobre a produção dessas quimiocinas em animais com EH. A CCL2/MCP-1 é uma quimiocina extensivamente estudada no SNC (MADRIGAL *et al.*, 2010; SEMPLE *et al.*, 2010; THOMPSON & VAN ELDIK, 2009). Um estudo descreveu sua produção pela micróglia dependente de ROS, um aspecto que pode ocorrer na EH em virtude do importante estresse oxidativo (QUAN *et al.*, 2011). A CCL5/RANTES já foi descrita como responsável por ativar um fenótipo pró-inflamatório na micróglia e consequente aumento da produção de NO (SKULJEC *et al.*, 2011). Além disso, foi demonstrado em cultura de astrócitos produção de CCL5/RANTES mediada por TNF- α e IL-1 β (CHEN *et al.*, 2011). Johnson e colaboradores (2011) descreveram a produção de CXCL1/KC e CCL3/MIP-1 α no cérebro de ratos após *status epilepticus*. Segundo os autores, a produção de CXCL1/KC é mediada por neurônios e células endoteliais enquanto CCL3/MIP-1 α por neurônios e micróglia. Após o aumento dessas quimiocinas no cérebro, houve intensa invasão do tecido por neutrófilos.

Dessa maneira, decidimos investigar o gradiente quimiotático dessas quimiocinas em nosso modelo dosando seus níveis também no sangue. Além disso, avaliamos o comportamento dos leucócitos e se houve migração de algum desse tipo celular para o

cérebro, o que poderia explicar parte da inflamação local observada. Notamos então que houve diferença significativa entre cérebro e soro de ambas as quimiocinas, entretanto com padrão antagônico. Enquanto a CXCL1/KC apresentou maior nível sérico com gradiente mais significativo em 48 horas p.i. da EH, a CCL3/MIP-1 α apresentou maior nível cerebral com gradiente mais significativo em 24 horas p.i. da EH (Figuras 7B & 7C, respectivamente).

Desse modo, prosseguimos com a investigação pela microscopia intravital para avaliar adesão e rolamento leucocitário. Paradoxalmente ao maior gradiente quimiotático para o cérebro, houve maior rolamento em 48 horas p.i. da EH, embora sem diferença de adesão de células na parede endotelial - processo este fundamental para a migração. De qualquer maneira, há gradiente quimiotático estatisticamente significativo de CCL3/MIP-1 α em 48 horas p.i. da EH. Prosseguimos então com a dosagem da atividade de MPO e NAG como inferência da presença de neutrófilos e monócitos, respectivamente, em tecido cerebral. Não houve diferença significativa entre os grupos para MPO, entretanto, encontramos aumento na atividade de NAG em 36 e 48 horas comparado ao grupo 12 horas p.i. da EH. Esse resultado deve ser avaliado com cautela. Em primeiro lugar, não houve diferença estatística com o grupo controle. E em segundo lugar, a NAG é uma enzima presente no lisossomo de monócitos e, sendo a micróglia uma célula de origem e função semelhante ao macrófago, a atividade de NAG mensurada no cérebro pode advir da micróglia (GUILLEMIN & BREW, 2004; PRINZ & MILDNER, 2011). Frente à esse cenário, procedemos com a investigação histopatológica por meio de H&E para nos certificar da aparente ausência de infiltrado inflamatório periférico em tecido cerebral. Não observamos alteração tecidual que contrariasse tal suposição e, sendo assim, confirmamos a não participação dos leucócitos no cérebro.

Nesse contexto imunológico observado, onde, aparentemente, há uma relação intrínseca entre a neuroinflamação e o estresse oxidativo, sem a participação de leucócitos periféricos, é imprescindível o estudo do envolvimento da micróglia. O papel da micróglia num momento de maior gravidade na EH está sendo estabelecido e a utilização de medicamentos que interferem nesse processo, como a minociclina, estão se mostrando benéficos (JIANG *et al.*, 2009a; RANGROO THRANE *et al.*, 2012). Entretanto, novos aspectos, mais precoces, devem ser explorados quanto ao papel das células da neuroglia. Em nosso estudo, através da marcação da expressão da proteína Iba-1, não observamos aumento da quantidade de micróglia em córtex cerebral após induzir a EH. Além disso, não houve alteração morfológica típica da sua ativação, quando a micróglia apresenta edema de seus

prolongamentos e aumento de sua ramificação, até chegar na forma amebóide (TADOWAKI *et al.*, 2007).

Estudos prévios, realizados em modelos experimentais, relataram a ativação da micróglia precocemente, muito embora não tenha sido observada produção de mediadores inflamatórios em paralelo (JIANG *et al.*, 2009b; ZEMTSOVA *et al.*, 2011). Outro estudo, investigando o comportamento dessa célula pelo tempo, em um modelo animal de EH por AOM, relatou ativação da mesma somente em estágio tardio mas não em um momento precoce (RANGROO THRANE *et al.*, 2011).

No grupo animal de 24 horas p.i. da EH, apesar de haver produção de citocinas próinflamatórias, não houve aumento na expressão de Iba-1 pela micróglia. Talvez, esse seja um momento inicial da doença em que a neuroinflamação possa ser regida pelo próprio astrócito. Além disso, é importante lembrar que, no grupo de 36 horas p.i. da EH, os animais avaliados possam ser possíveis sobreviventes com menor grau de EH e sem ativação da micróglia. Por outro lado, houve uma tendência ao aumento da densidade celular em 24 horas p.i. da EH, embora sem diferença estatística. Dessa maneira, seria fundamental realizar uma investigação mais detalhada e, possivelmente, com outros métodos científicos para se determinar a importância da participação na EH de cada tipo celular constituinte da neuroglia.

Explorar a neuroinflamação será fundamental para se entender a EH em um futuro próximo e retardar a sua evolução, aumentando o tempo de sobrevivência desses pacientes. Nesse cenário, ainda deverá ser melhor determinado a relação temporal entre os processos inflamatórios e oxidativos envolvidos nessa doença, buscando um gatilho inicial comum às duas vias.

Nosso trabalho é apenas uma navegação inicial nesse campo. A participação de processos que agem em sinergia ao insulto inicial amplia as possibilidades de intervenção clínica e renova a perspectiva neuroimunológica no desenvolvimento da EH. Podemos destacar, entre os pontos discutidos, a importância de estabelecer um modelo murino para a EH induzido por TAA pelas diversas vantagens em relação ao custo-benefício. Por fim, abrimos uma porta antes não descrita na literatura sobre o papel das quimiocinas nesse processo, em cuja intervenção poderá trazer resultados benéficos. As perspectivas são enormes e, assim como outros grupos de pesquisa, ainda nos confrontamos com algumas divergências a serem esclarecidas.

6) CONCLUSÕES

A EH é uma complicação importante da FHA em cuja fisiopatologia há um envolvimento estreito com processos inflamatórios que parecem contribuir com sua gravidade. Em nosso modelo murino de EH, pudemos observar que em 24 horas os animais tornam-se estatisticamente mais sintomáticos e apresentam um taxa de mortalidade de 40% entre 24-48 horas p.i. da EH. Desse modo, prosseguimos com nossa investigação em 24 horas p.i. da EH pela premissa de avaliarmos um momento em que houvesse sintomas, embora antes do quadro se tornar demasiadamente grave.

Demonstramos que, em 24 p.i. da EH, a neuroinflamação participa principalmente através do aumento do nível cerebral da citocina proinflamatória IL-1 β e de uma maior diferença entre a concentração cerebral e sérica da TNF- α . Houve também, no cérebro, um aumento generalizado de quimiocinas e uma redução na atividade de enzimas antioxidantes, uma medida indireta do estresse oxidativo.

Ao investigarmos o perfil celular dentro desse cenário imunológico, pudemos notar alterações morfológicas de astrócitos, as células-alvo na EH, mas ainda sem ativação da micróglia. De fato, outros trabalhos responsabilizam a micróglia apenas em um momento tardio na evolução da EH (coma e pré-coma) e nós avaliamos nossos animais precocemente, embora estavam mais sintomáticos.

Dessa maneira, podemos inferir que a neuroinflamação possa advir do acometimento do astrócito *per se*, e que a micróglia seja importante em estágios mais terminais. O papel das quimiocinas permanece em aberto e abre precedente para estudar seu envolvimento com a progressão da doença e ativação da micróglia. Por fim, a investigação da relação entre as citocinas, as quimiocinas e o estresse oxidativo deverá ser aprofundada.

7) REFERÊNCIAS

ADEVA MM, SOUTO G, BLANCO N, DONAPETRY C. Ammonium metabolism in humans. *Metabolism*. **2012** Nov;61(11):1495-511.

ALBA L, HAY J, ANGULO P, LEE WM. Lactulose therapy in acute liver failure. *J Hepatol* **2002**; 36:33A.

ALBRECHT J, DOLINSKA M, HILGIER W, LIPKOWSKI AW, NOWACKI J. Modulation of glutamine uptake and phosphate-activated glutaminase activity in rat brain mitochondria by amino acids and their synthetic analogues. *Neurochem Int* **2000**;36:341-347.

ALBRECHT J, NOREMBERG MD. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* **2006** Oct;44(4):788-94.

ALBRECHT J, ZIELIŃSKA M, NOREMBERG MD. Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. *Biochem Pharmacol*. **2010** Nov 1;80(9):1303-8.

ALS-NIELSEN B, GLUUD LL, GLUUD C. Non-absorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: systematic review of randomised trials. *BMJ*. **2004** May 1; 328(7447): 1046.

ALVAREZ VM, RAMA RAO KV, BRAHMBHATT M, NOREMBERG MD. Interaction between cytokines and ammonia in the mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *J Neurosci Res*. **2011** Dec;89(12):2028-40.

ASHWORTH CT, WERNER DJ, GLASS MD, ARNOLD NJ. Spectrum of fine structural changes in hepatocellular injury due to thioacetamide. *Am J Pathol*. **1965** Dec;47(6):917-51.

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

BAILEY PJ. Sponge implants as models. *Methods Enzymol*, **1988**; 162: 327-34.

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

BÉMEUR C, BUTTERWORTH RF. Liver-brain proinflammatory signalling in acute liver failure: Role in the pathogenesis of hepatic encephalopathy and brain edema. *Metab Brain Dis*. **2012** Dec 5.

BÉMEUR C, CHASTRE A, DESJARDINS P, BUTTERWORTH RF. No changes in expression of tight junction proteins or blood– brain barrier permeability in azoxymethane-induced experimental acute liver failure [Letter to the editor]. *Neurochem Int*, **2010a** Jan;56: 205-207.

BÉMEUR C, DESJARDINS P, BUTTERWORTH RF. Antioxidant and anti-inflammatory effects of mild hypothermia in the attenuation of liver injury due to azoxymethane toxicity in the mouse. *Metab Brain Dis*. **2010b** Mar;25(1):23-9.

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

BÉMEUR C, VAQUERO J, DESJARDINS P, BUTTERWORTH RF. N-acetylcysteine attenuates cerebral complications of non-acetaminophen-induced acute liver failure in mice: antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *Metab Brain Dis*. **2010d** Jun;25(2):241-9.

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

BERNAL W, HALL C, KARVELLAS CJ, AUZINGER G, SIZER E, WENDON J. Arterial ammonia and clinical risk factors for encephalopathy and intracranial hypertension in acute liver failure. *Hepatology* **2007** Dec;46(6):1844-52.

BHATIA V, SINGH R, ACHARYA SK Predictive value of arterial ammonia for complications and outcome in acute liver failure. *Gut* **2006** Jan;55(1):98-104.

BOSOI CR, ROSE CF. Oxidative stress: a systemic factor implicated in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*. **2012** Nov 6. [Epub ahead of print]

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

BRUSILOW SW, KOEHLER RC, TRAYSTMAN RJ, COOPER AJ. Astrocyte glutamine synthetase: importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy. *Neurotherapeutics*. **2010** Oct;7(4):452-70.

BUTTERWORTH RF, NORENBURG MD, FELIPO V, FERENCI P, ALBRECHT J, BLEI AT; Members of the ISHEN Commission on Experimental Models of HE. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int*. **2009** Jul;29(6):783-8.

BUTTERWORTH RF. Brain edema and encephalopathy in acute liver failure: a primary neurogliopathy? *Neurochem Int*. **2012** Jun;60(7):661.

BUTTERWORTH RF. Hepatic encephalopathy: a central neuroinflammatory disorder? *Hepatology*. **2011** Apr;53(4):1372-6.

BUTTERWORTH RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: The concept of synergism. *Hepatol Res*. **2008** Nov;38 Suppl 1:S116-21.

CHADIPIRALLA K, REDDANNA P, CHINTA RM, REDDY PV. Thioacetamide-induced fulminant hepatic failure induces cerebral mitochondrial dysfunction by altering the electron transport chain complexes. *Neurochem Res*. **2012** Jan;37(1):59-68.

CHANG CC, WANG SS, HUANG HC, CHAN CY, LEE FY, LIN HC, NONG JY, CHUANG CL, LEE SD. Selective cyclooxygenase inhibition improves hepatic encephalopathy in fulminant hepatic failure of rat. *Eur J Pharmacol*. **2011** Sep;666(1-3):226-32.

CHASTRE A, BÉLANGER M, BEAUCHESNE E, NGUYEN BN, DESJARDINS P, BUTTERWORTH RF. Inflammatory cascades driven by tumor necrosis factor-alpha play a major role in the progression of acute liver failure and its neurological complications. *PLoS One*. **2012**;7(11):e49670.

CHAVARRIA L, ORIA M, ROMERO-GIMENEZ J, ALONSO J, LOPE-PIEDRAFITA S, CORDOBA J. Diffusion tensor imaging supports the cytotoxic origin of brain edema in a rat model of acute liver failure. *Gastroenterology*. **2010** Apr;138(4):1566-73.

CHAVARRIA L, ORIA M, ROMERO-GIMENEZ J, ALONSO J, LOPE-PIEDRAFITA S, CORDOBA J. Diffusion tensor imaging supports the cytotoxic origin of brain edema in a rat model of acute liver failure. *Gastroenterology*. **2010** Apr;138(4):1566-73.

CHEN CJ, OU YC, CHANG CY, PAN HC, LIAO SL, RAUNG SL, CHEN SY. TNF- α and IL-1 β mediate Japanese encephalitis virus-induced RANTES gene expression in astrocytes. *Neurochem Int*. **2011** Feb;58(2):234-42.

CHEN TM, SUBEQ YM, LEE RP, CHIOU TW, HSU BG. Single dose intravenous thioacetamide administration as a model of acute liver damage in rats. *Int J Exp Pathol*. **2008** Aug;89(4):223-31.

CHILAKAPATI J, SHANKAR K, KORRAPATI MC, HILL RA, MEHENDALE HM. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: role in initiation of liver injury. *Drug Metab Dispos*. **2005** Dec;33(12):1877-85.

CHU CJ, HSIAO CC, WANG TF, CHAN CY, LEE FY, CHANG FY, CHEN YC, HUANG HC, WANG SS, LEE SD. Prostacyclin inhibition by indomethacin aggravates hepatic damage

and encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *World J Gastroenterol.* **2005** Jan 14;11(2):232-6.

CHU CJ, LEE FY, WANG SS, CHANG FY, LIN HC, WU SL, CHAN CC, TSAI YT, LEE SD. Establishment of an animal model of hepatic encephalopathy. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei).* **2000** Apr;63(4):263-9.

CHU CJ, WANG SS, LEE FY, CHANG FY, LIN HC, HOU MC, CHAN CC, WU SL, CHEN CT, HUANG HC, LEE SD. Detrimental effects of nitric oxide inhibition on hepatic encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *Eur J Clin Invest.* **2001** Feb;31(2):156-63.

CLEMMESSEN JO, LARSEN FS, KONDRUP J, HANSEN BA, OTT P. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* **1999**;29(3):648-53.

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

DESJARDINS P, DU T, JIANG W, PENG L, BUTTERWORTH RF. Pathogenesis of hepatic encephalopathy and brain edema in acute liver failure: role of glutamine redefined. *Neurochem Int.* **2012** Jun;60(7):690-6.

ENGVALL E. Quantitative enzyme immunoassay (ELISA) in microbiology. *Med Biol,* **1977**; 55(4): 193-200.

FARJAM M, DEHDAB P, ABBASSNIA F, MEHRABANI D, TANIDEH N, PAKBAZ S, IMANIEH MH. Thioacetamide-induced acute hepatic encephalopathy in rat: behavioral, biochemical and histological changes. *Iran Red Crescent Med J.* **2012** Mar;14(3):164-70

FERENCI P, LOCKWOOD A, MULLEN K, TARTER R, WEISSENBORN K & BLEI AT. Hepatic encephalopathy - definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report

of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* **2002**;35(3):716-21.

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

FORKERT PG, MASSEY TE, JONES AB, PARK SS, GELBOIN HV, ANDERSON LM. Distribution of cytochrome CYP2E1 in murine liver after ethanol and acetone administration. *Carcinogenesis*. **1991** Dec;12(12):2259-68.

GAO RM, YUAN ZB, ZHAO ZQ, GAO XR. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **1998**; 45(1): 41-45.

GERMANI G, THEOCHARIDOU E, ADAM R, KARAM V, WENDON J, O'GRADY J, BURRA P, SENZOLO M, MIRZA D, CASTAING D, KLEMPNAUER J, POLLARD S, PAUL A, BELGHITI J, TSOCHATZIS E, BURROUGHS AK. Liver transplantation for acute liver failure in Europe: outcomes over 20 years from the ELTR database. *J Hepatol*. **2012** Aug;57(2):288-96.

GÖRG B, BIDMON HJ, KEITEL V, FOSTER N, GOERLICH R, SCHLISS F, HÄUSSINGER D. Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *Arch Biochem Biophys*. **2006** May 15;449(1-2):104-14.

GÖRG B, QVARTSKHAVA N, KEITEL V, BIDMON HJ, SELBACH O, SCHLISS F, HÄUSSINGER D. Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. *Hepatology*. **2008** Aug;48(2):567-79.

GUILLEMIN GJ, BREW BJ. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol*. **2004** Mar;75(3):388-97.

GUPTA RK, YADAV SK, RANGAN M, RATHORE RK, THOMAS MA, PRASAD KN, PANDEY CM, SARASWAT VA. Serum proinflammatory cytokines correlate with diffusion tensor imaging derived metrics and 1H-MR spectroscopy in patients with acute liver failure. *Metab Brain Dis.* **2010** Sep;25(3):355-61.

HALL CS, BALLACHEY EL. A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology*, **1932**; 6: 1–12.

HANISCH UK, KETTENMANN H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* **2007** Nov;10(11):1387-94.

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

HERMENEGILDO C, MONFORT P, FELIPO V. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology.* **2000** Mar;31(3):709-15.

HILGIER W, ALBRECHT J, KRAŚNICKA Z. Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. I. Preliminary morphological and biochemical observations. *Neuropatol Pol.* **1983a**;21(4):487-94.

HILGIER W. Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. III Ammonia level and its metabolic substrates in the brain. *Neuropatol Pol.* **1983b**;21(4):511-8.

ICHAH P, SAMUEL D. Epidemiology of liver failure. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* **2011**;35(10):610-7.

JALAN R, OLDE DAMINK SW, HAYES PC, DEUTZ NE, LEE A. Pathogenesis of intracranial hypertension in acute liver failure: inflammation, ammonia and cerebral blood flow. *J Hepatol.* **2004** Oct;41(4):613-20.

JAYAKUMAR AR, BETHEA JR, TONG XY, GOMEZ J, NOREMBERG MD. NF- κ B in the mechanism of brain edema in acute liver failure: studies in transgenic mice. *Neurobiol Dis.* **2011** Feb;41(2):498-507.

JAYAKUMAR AR, RAMA RAO KV, SCHOUSBOE A, NOREMBERG MD. Glutamine-induced free radical production in cultured astrocytes. *Glia.* **2004** May;46(3):296-301.

JAYAKUMAR AR, RAMA RAO KV, TONG XY, NOREMBERG MD. Calcium in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *J Neurochem.* **2009** May;109 Suppl 1:252-7.

JAYAKUMAR AR, RAO KV, MURTHY CHR, NOREMBERG MD. Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Neurochem Int.* **2006** May-Jun;48(6-7):623-8.

JIANG W, DESJARDINS P, BUTTERWORTH RF. Cerebral inflammation contributes to encephalopathy and brain edema in acute liver failure: protective effect of minocycline. *J Neurochem.* **2009a** Apr;109(2):485-93.

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

JIANG W, DESJARDINS P, BUTTERWORTH RF. Hypothermia attenuates oxidative/nitrosative stress, encephalopathy and brain edema in acute (ischemic) liver failure. *Neurochem Int.* **2009c** Jul-Aug;55(1-3):124-8.

JOHNSON EA, DAO TL, GUIGNET MA, GEDDES CE, KOEMETER-COX AI, KAN RK. Increased expression of the chemokines CXCL1 and MIP-1 α by resident brain cells precedes neutrophil infiltration in the brain following prolonged soman-induced status epilepticus in rats. *J Neuroinflammation.* **2011** May 2;8:41.

KADOWAKI T, NAKADATE K, SAKAKIBARA S, HIRATA K, UEDA S. Expression of Iba1 protein in microglial cells of zitter mutant rat. *Neurosci Lett*. **2007** Jan 3;411(1):26-31.

KATO M, HUGHES RD, KEAYS RT, WILLIAMS R. Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. *Hepatology*. **1992** Jun;15(6):1060-6.

KOSENKO E, VENEDIKTOVA N, KAMINSKY Y, MONTOLIU C, FELIPO V. Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication in vivo. *Brain Res*. **2003** Aug 15;981(1-2):193-200.

KRAŚNICKA Z, ALBRECHT J, GAJKOWSKA B, MOSSAKOWSKI MJ. Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. II. Cytochemical and ultrastructural studies on astrocytes cultured in vitro. *Neuropatol Pol*. **1983**;21(4):495-510.

KUMAR R, SHALIMAR, SHARMA H, PRAKASH S, PANDA SK, KHANAL S, ACHARYA SK. Persistent hyperammonemia is associated with complications and poor outcomes in patients with acute liver failure. *Clin Gastroenterol Hepatol*. **2012** Aug;10(8):925-31.

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

LUO M, LI L, LU CZ, CAO WK. Clinical efficacy and safety of lactulose for minimal hepatic encephalopathy: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. **2011** Nov;23(12):1250-7.

MADRIGAL JL, GARCIA-BUENO B, HINOJOSA AE, POLAK P, FEINSTEIN DL, LEZA JC. Regulation of MCP-1 production in brain by stress and noradrenaline-modulating drugs. *J Neurochem*. **2010** Apr;113(2):543-51.

MANGIPUDY RS, CHANDA S, MEHENDALE HM. Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity. *Environ Health Perspect*. **1995** Mar;103(3):260-7.

MARQUES PE, FALEIROS BE, MENEZES GB. Anti-inflammatory intervention for acute liver failure: recent patents and future interventions. *Recent Patents on Biomarkers* **2012**;2(2):147-155.

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

MLADENOVIĆ D, RADOSAVLJEVIĆ T, HRNČIĆ D, RAŠIĆ-MARKOVIĆ A, PUŠKAŠ N, MAKSIĆ N, DJURIC D, STANOJLOVIĆ O. Behavioral and electroencephalographic manifestations of thioacetamide-induced encephalopathy in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. **2012** Sep;90(9):1219-27.

MPABANZI L, JALAN R. Neurological complications of acute liver failure: pathophysiological basis of current management and emerging therapies. *Neurochem Int*. **2012** Jun;60(7):736-42.

MULLANE KM, KRAEMER R, SMITH B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods*, **1985**; 14(3): 157-67.

MURTHY CR, RAMA RAO KV, BAI G, NORENBERG MD. Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res*. **2001** Oct 15;66(2):282-8.

NELSON DP, KIESOW LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem*, **1972**; 49(2): 474-8.

NORENBERG MD, LAPHAM LW. The astrocyte response in experimental portal-systemic encephalopathy: an electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol*. **1974** Jul;33(3):422-35.

NORENBERG MD, RAMA RAO KV, JAYAKUMAR AR. Signaling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity. *Metab Brain Dis*. **2009** Mar;24(1):103-17.

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

ODEH M. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: the tumour necrosis factor-alpha theory. *Eur J Clin Invest*. **2007** Apr;37(4):291-304.

OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, **1979**; 95(2): 351-8.

PAGLIA DE, VALENTINE WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, **1967**; 70(1): 158-69.

PARPURA V, HENEKA MT, MONTANA V, OLIET SH, SCHOUSBOE A, HAYDON PG, STOUT RF JR, SPRAY DC, REICHENBACH A, PANNICKE T, PEKNY M, PEKNA M, ZOREC R, VERKHRATSKY A. Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem*. **2012** Apr;121(1):4-27.

PEELING J, SHOEMAKER L, GAUTHIER T, BENARROCH A, SUTHERLAND GR, MINUK GY. Cerebral metabolic and histological effects of thioacetamide-induced liver failure. *Am J Physiol*. **1993** Sep;265(3 Pt 1):G572-8.

PÉREZ HERNÁNDEZ JL, HIGUERA DE LA TIJERA F, SERRALDE-ZÚÑIGA AE, ABDO FRANCIS JM. Critical analysis of studies evaluating the efficacy of infusion of L-ornithine L-aspartate in clinical hepatic encephalopathy in patients with liver failure. *Ann Hepatol*. **2011** Jun;10 Suppl 2:S66-9.

PICHILI VB, RAO KV, JAYAKUMAR AR, NORENBERG MD. Inhibition of glutamine transport into mitochondria protects astrocytes from ammonia toxicity. *Glia*. **2007** Jun;55(8):801-9.

PLUTA R, ALBRECHT J. Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. Clinical observations. *Neuropatol Pol.* **1984**;22(3):379-85.

PRINZ M, MILDNER A. Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia.* **2011** Feb;59(2):177-87.

QUAN Y, JIANG CT, XUE B, ZHU SG, WANG X. High glucose stimulates TNF α and MCP-1 expression in rat microglia via ROS and NF- κ B pathways. *Acta Pharmacol Sin.* **2011** Feb;32(2):188-93.

RAMA RAO KV, CHEN M, SIMARD JM, NOREMBERG MD. Suppression of ammonia-induced astrocyte swelling by cyclosporin A. *J Neurosci Res.* **2003a** Dec 15;74(6):891-7.

RAMA RAO KV, JAYAKUMAR AR, NOREMBERG DM. Ammonia neurotoxicity: role of the mitochondrial permeability transition. *Metab Brain Dis.* **2003b** Jun;18(2):113-27.

RAMA RAO KV, JAYAKUMAR AR, NOREMBERG MD. Role of oxidative stress in the ammonia-induced mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *Neurochem Int.* **2005** Jul;47(1-2):31-8.

RANGROO THRANE V, THRANE AS, CHANAG J, ALLELUIA V, NAGELHUS EA, NEDERGAARD M. Real-time analysis of microglial activation and motility in hepatic and hyperammonemic encephalopathy. *Neuroscience.* **2012** Sep 18;220:247-55.

REDDY PV, MURTHY CHR, REDDANNA P. Fulminant hepatic failure induced oxidative stress in nonsynaptic mitochondria of cerebral cortex in rats. *Neurosci Lett.* **2004** Sep 16;368(1):15-20.

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

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

ROLANDO N, ELLIS AJ, DE GROOTE D, WENDON J, WILLIAMS R. Correlation of serial cytokines levels with progression to coma (Grade IV) in patients with acute liver failure (ALF). *Hepatology* **1995**;22(Suppl):366A.

ROLANDO N, WADE J, DAVALOS M, WENDON J, PHILPOTT-HOWARD J, WILLIAMS R. The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology*. **2000** Oct;32(4 Pt 1):734-9.

SARIA A, LUNDBERG JM. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *J Neurosci Methods* **1983**; 8 (1): 41-9.

SATHYASAIKUMAR KV, SWAPNA I, REDDY PV, MURTHY CHR, DUTTA GUPTA A, SENTHILKUMARAN B, REDDANNA P. Fulminant hepatic failure in rats induces oxidative stress differentially in cerebral cortex, cerebellum and pons medulla. *Neurochem Res*. **2007** Mar;32(3):517-24.

SCHLISS F, GÖRG B, HÄUSSINGER D. Pathogenetic interplay between osmotic and oxidative stress: the hepatic encephalopathy paradigm. *Biol Chem*. **2006** Oct-Nov;387(10-11):1363-70.

SCHWARZ CS, FERREA S, QUASTHOFF K, WALTER J, GÖRG B, HÄUSSINGER D, SCHNITZLER A, HARTUNG HP, DIHNÉ M. Ammonium chloride influences in vitro-neuronal network activity. *Exp Neurol*. **2012** May;235(1):368-73.

SEMPLE BD, FRUGIER T, MORGANTI-KOSSMANN MC. CCL2 modulates cytokine production in cultured mouse astrocytes. *J Neuroinflammation*. **2010** Oct 14;7:67.

SENIOR JR. Alanine aminotransferase: a clinical and regulatory tool for detecting liver injury-past, present, and future. *Clin Pharmacol Ther.* **2012** Sep;92(3):332-9.

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

SHIMOJIMA N, ECKMAN CB, MCKINNEY M, SEVLEVER D, YAMAMOTO S, LIN W, DICKSON DW, NGUYEN JH. Altered expression of zonula occludens-2 precedes increased blood-brain barrier permeability in a murine model of fulminant hepatic failure. *J Invest Surg.* **2008** May-Jun;21(3):101-8.

SKOWROŃSKA M, ALBRECHT J. Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity. *Neurochem Int.* **2012** Nov 7. [Epub ahead of print]

SKULJEC J, SUN H, PUL R, BÉNARDAIS K, RAGANCOKOVA D, MOHARREGH-KHIABANI D, KOTSIARI A, TREBST C, STANGEL M. CCL5 induces a pro-inflammatory profile in microglia in vitro. *Cell Immunol.* **2011**;270(2):164-71.

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

TAN WF, STEADMAN RH, FARMER DG, HONG JC, BUSUTTIL RW, APINYACHON W, XIA VW. Pretransplant neurological presentation and severe posttransplant brain injury in patients with acute liver failure. *Transplantation.* **2012** Oct 15;94(7):768-74.

THOMPSON WL, VAN ELDIK LJ. Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-3 through NFkB and MAPK dependent pathways in rat astrocytes [corrected]. *Brain Res.* **2009** Sep 1;1287:47-57.

TÚNEZ I, MUÑOZ MC, MEDINA FJ, SALCEDO M, FEIJÓO M, MONTILLA P. Comparison of melatonin, vitamin E and L-carnitine in the treatment of neuro and hepatotoxicity induced by thioacetamide. *Cell Biochem Funct.* **2007** Mar-Apr;25(2):119-27.

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

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

VAQUERO J, POLSON J, CHUNG C, HELENOWSKI I, SCHIODT FV, REISCH J, LEE WM, BLEI AT. Infection and the progression of hepatic encephalopathy in acute liver failure. *Gastroenterology.* **2003b** Sep;125(3):755-64.

VERMA A, SARASWAT VA, RADHA KRISHNA Y, NATH K, THOMAS MA, GUPTA RK. In vivo 1H magnetic resonance spectroscopy-derived metabolite variations between acute-on-chronic liver failure and acute liver failure. *Liver Int.* **2008** Sep;28(8):1095-103.

VIANA CFG, ROCHA TDS, CAVALCANTE FP, VALENÇA JR JT, COELHO GR, GARCIA JHP. Liver transplantation for acute liver failure: a 5 years experience. *Arq. Gastroenterol.* **2008**;45(3):192-194.

VOLLER A, BARTLETT A, BIDWELL DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol*, **1978**; 31(6): 507-20.

WALSH RN, CUMMINS RA. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull.* **1976** May;83(3):482-504.

WANG W, LV S, ZHOU Y, FU J, LI C, LIU P. Tumor necrosis factor- α affects blood-brain barrier permeability in acetaminophen-induced acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **2011** Jul;23(7):552-8.

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

WILLIS CL. Glia-induced reversible disruption of blood-brain barrier integrity and neuropathological response of the neurovascular unit. *Toxicol Pathol.* **2011** Jan;39(1):172-85.

WRIGHT G, SHAWCROSS D, OLDE DAMINK SW, JALAN R. Brain cytokine flux in acute liver failure and its relationship with intracranial hypertension. *Metab Brain Dis.* **2007** Dec;22(3-4):375-88.

ZEMTSOVA I, GÖRG B, KEITEL V, BIDMON HJ, SCHRÖR K, HÄUSSINGER D. Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. *Hepatology.* **2011** Jul;54(1):204-15.

ZIMMERMANN C, FERENCI P, PIFL C, YURDAYDIN C, EBNER J, LASSMANN H, ROTH E, HÖRTNAGL H. 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.