

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

Rafaela Pinto Coelho Santos

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E PATOLÓGICOS NO  
MODELO EXPERIMENTAL DE ENCEFALOPATIA HEPÁTICA EM  
CAMUNDONGOS DEFICIENTES PARA TNFR1**

Belo Horizonte

2024

Rafaela Pinto Coelho Santos

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E PATOLÓGICOS NO  
MODELO EXPERIMENTAL DE ENCEFALOPATIA HEPÁTICA EM  
CAMUNDONGOS DEFICIENTES PARA TNFR1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Patologia Investigativa.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Milene Alvarenga Rachid

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliana Cristina de Brito Toscano

Belo Horizonte

2024

043

Santos, Rafaela Pinto Coelho.

Avaliação dos parâmetros inflamatórios e patológicos no modelo experimental de encefalopatia hepática em camundongos deficientes para TNFR1 [manuscrito] / Rafaela Pinto Coelho Santos. – 2024.

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Milene Alvarenga Rachid. Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliana Cristina de Brito Toscano.

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

1. Patologia. 2. Encefalopatia Hepática. 3. Fatores de Necrose Tumoral. I. Rachid, Milene Alvarenga. II. Toscano, Eliana Cristina de Brito. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG - SECRETARIA

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO **Nº 484** DE RAFAELA PINTO COELHO SANTOS

Realizou-se, no dia 18 de julho de 2024, às 14 horas, on-line, a defesa de Tese, intitulada **“Avaliação dos Parâmetros Inflamatórios e Patológicos no Modelo Experimental de Encefalopatia Hepática em Camundongos Deficientes para o TNFR1”**, apresentada por **Rafaela Pinto Coelho Santos**, número de registro **2020673201**, graduada no curso de Ciências Biológicas, e como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Profa. Dra. Leticia Coutinho Lopes Moura**, UFJF; **Profa. Dra. Heloisa Maria Falcão Mendes**, UFVJM; **Prof. Dr. Rafael Leite Alves**, FM/UFMG; **Profa. Dra. Reane Fonseca Martins**, ICB/UFMG, **Profa. Dra. Eliana Cristina de Brito Toscano**, UFJF – **COORIENTADORA**; **Profa. Dra. Milene Alvarenga Rachid**, ICB/UFMG – **ORIENTADORA**.

A Comissão considerou a Tese:

- APROVADA**  
 **REPROVADA**

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

Belo Horizonte, 18 de julho de 2024.

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



Documento assinado eletronicamente por **Milene Alvarenga Rachid, Servidor(a)**, em 11/08/2024, às 23:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eliana Cristina de Brito Toscano, Usuário Externo**, em 14/08/2024, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Reane Fonseca Martins, Professora Magistério Superior-Substituta**, em 19/08/2024, às 08:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Coutinho Lopes Moura, Usuária Externa**, em 19/08/2024, às 10:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Leite Alves, Professor(a)**, em 19/08/2024, às 13:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Heloisa Maria Falcão Mendes, Usuário Externo**, em 22/08/2024, às 08:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3379523** e o código CRC **0AF5273D**.

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**“AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E PATOLÓGICOS NO MODELO EXPERIMENTAL DE ENCEFALOPATIA HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES PARA O TNFR1”**

**RAFAELA PINTO COELHO SANTOS**

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

Aprovada em 18 de julho de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Letícia Coutinho Lopes Moura, UFJF  
Profa. Dra. Heloisa Maria Falcão Mendes, UFVJM  
Prof. Dr. Rafael Leite Alves, Faculdade de Medicina/UFMG  
Profa. Dra. Reane Fonseca Martins, ICB/UFMG  
Profa. Dra. Eliana Cristina de Brito Toscano, UFJF - coorientadora  
Profa. Dra. Milene Alvarenga Rachid, ICB/UFMG - ORIENTADORA

Belo Horizonte, 18 de julho de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Milene Alvarenga Rachid, Servidor(a)**, em 11/08/2024, às 23:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eliana Cristina de Brito Toscano, Usuário Externo**, em 14/08/2024, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Reane Fonseca Martins, Professora Magistério Superior-Substituta**, em 19/08/2024, às 08:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Leite Alves, Professor(a)**, em 19/08/2024, às 13:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Letícia Coutinho Lopes Moura, Usuária Externa**, em 20/08/2024, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Heloisa Maria Falcão Mendes, Usuário Externo**, em 22/08/2024, às 08:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3379530** e o código CRC **0360A803**.

---

*Aos meus pais, família, amigos e todas as mulheres da Ciência*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha orientadora Profa. Milene Alvarenga Rachid e à coorientadora Profa. Eliana Cristina de Brito Toscano por toda orientação, por estarem sempre presentes, por me acolherem com empatia, carinho, amizade, atenção e profissionalismo. Faltam-me palavras para descrever a gratidão que há em meu coração.

Aos professores Heloísa Maria Falcão Mendes, Letícia Coutinho Lopes Moura, Rafael Leite Alves, Reane Fonseca Martins e Edna Constanza Gómez Victoria por me darem a honra de participarem de minha banca.

Agradeço a Deus por toda minha vida. Aos meus pais, Dorotéa Pinto Coelho Santos e Nerilton Augusto dos Santos, por serem o pilar da minha vida, sou eternamente grata pelo apoio, dedicação, carinho e por me ajudarem a realizar todos os meus sonhos.

À toda minha família, em especial à Ana Carolina, João Gabriel, Benício, Margareth, Maria do Carmo, Maria de Fátima, Thaís, Maria Raimunda, Mayara, Solimar, Vovó Nerilda e muitas outras pessoas que guardo em meu coração, obrigada por permanecerem sempre ao meu lado, acolhendo e ajudando-me no doutorado e em todas as minhas escolhas da vida.

Ao Sketch Lanza (Sergio Henrique de Souza Lanza), pelo enorme apoio, carinho e auxílio sempre, e também pela confecção de ilustrações para a tese e para outros fins profissionais.

Ao Bira (Ubirajara Madeira Barbosa Teixeira), pelo apoio, conselhos e auxílio na apresentação.

Aos meus amigos e amigas, por trilharem ao meu lado a caminhada da vida e tornarem os dias tortuosos em brandos momentos passageiros, em particular à Alessandra Martins Cioletti e à Bruna Pizzolo Coura que foram essenciais em muitos momentos durante o doutorado.

Aos amigos do grupo Neuropatologia Translacional, do Laboratório de Patologia Celular e Molecular e do Laboratório Conceição Machado, em especial à Profa. Aline Miranda, à Isadora Sofia, Bruna Oliveira e Carolina Machado, pela troca de conhecimento, colaboração com o meu trabalho e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

“Ciência, poesia, amor e Arte, a conjunção da força propulsora da mudança, dos sonhos e da vida. Ingredientes para a resiliência em tempos áridos e para grandes conquistas em tempos fartos.”  
(Santos, R. P. C., 2023)

## RESUMO

A encefalopatia hepática (EH) é uma síndrome neuropsiquiátrica potencialmente reversível, com contribuição significativa da neuroinflamação, morte neuronal e desregulação de neurotransmissores nos sintomas neuropsiquiátricos associados. É amplamente conhecido que o fator de necrose tumoral (TNF) tem importante função no desenvolvimento e progressão da EH; entretanto, seu papel ainda não é completamente compreendido, especialmente nas fases mais precoces dessa síndrome. Modelos experimentais em roedores têm sido utilizados para investigar os mecanismos subjacentes e potenciais alvos terapêuticos para a EH. Este estudo visou examinar a histopatologia hepática e encefálica, atividade locomotora e memória em camundongos selvagens (WT) durante a EH experimental induzida por lesão hepática aguda (LHA), devido à administração de tioacetamida (TAA). Além disso, analisou-se a atividade locomotora e neuroinflamação em camundongos sem o receptor 1 de TNF (TNFR1<sup>-/-</sup>) com EH induzida por TAA. Para análises comportamentais e histopatológicas, camundongos C57BL/6 WT fêmeas receberam salina ou TAA intraperitonealmente (i.p.). A atividade locomotora foi avaliada no 1º, 3º e 7º dia após a indução (d.p.i.) da EH. Para avaliação da memória, foram realizados os testes de reconhecimento de novo objeto e labirinto em Y até o 8º dia, e o teste de Barnes até o 13º d.p.i. Fragmentos dos fígados e encéfalos foram coletados para análise histopatológica no 7º d.p.i. A EH foi associada ao déficit locomotor apenas no 1º d.p.i., e houve prejuízo cognitivo no teste de campo aberto em repetidas exposições; sem alterações na memória nos outros testes comportamentais ao longo do tempo. Na histopatologia do fígado, no 7º d.p.i. foram observados focos de necrose, circundados por infiltrado inflamatório, com predomínio de neutrófilos e alguns linfócitos. Além disso, foram observados nódulos inflamatórios compostos por macrófagos, linfócitos e células gigantes o fígado dos animais com LHA no 7º d.p.i.. O encéfalo não apresentou alterações histopatológicas no 7º d.p.i. Para as análises motora e neuroinflamatória, camundongos machos C57BL/6 WT ou TNFR1<sup>-/-</sup> receberam salina ou TAA i.p. Após 24 horas, avaliou-se a atividade locomotora e foram mensurados os níveis de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, CCL2, CX3CL1 e BDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo. A ausência do TNFR1 atenuou o déficit locomotor e induziu aumento dos níveis dos mediadores tanto pró-inflamatórios quanto da IL-10 no cérebro durante a EH induzida por LHA, 1º d.p.i. Os dados sugerem que o TNF desempenha um papel regulador no desenvolvimento e progressão da EH. Apesar da recuperação motora e cognitiva relativa ao longo do tempo, os animais com LH mostraram hepatite necrótica leve a moderada após sete dias, destacando a persistência da inflamação hepática mesmo após a melhora dos sintomas neurológicos.

Palavras-chave: encefalopatia hepática; TNFR1 KO; TNF; testes comportamentais; memória; histopatologia hepática; atividade locomotora.

## ABSTRACT

Hepatic encephalopathy (HE) is a potentially reversible neuropsychiatric syndrome, with a significant contribution by neuroinflammation, neuronal death, and neurotransmitter dysregulation in associated neuropsychiatric symptoms. It is well-known that tumor necrosis factor (TNF) plays an important role in the development and progression of HE; however, its role is not yet completely understood, especially in the earlier stages of this syndrome. Experimental rodent models have been used to investigate the underlying mechanisms and potential therapeutic targets for HE. This study aimed to evaluate hepatic and cerebral histopathology, locomotor activity, and memory in wild-type (WT) mice during experimental HE induced by acute liver injury (ALI) due to thioacetamide (TAA) administration. Additionally, locomotor activity and neuroinflammation were analyzed in mice lacking the TNF receptor 1 (TNFR1<sup>-/-</sup>) with TAA-induced HE. For behavioral and histopathological analyses, female C57BL/6 mice received TAA or saline intraperitoneally (i.p.). Locomotor activity was assessed on the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup>, and 7<sup>th</sup> day post-induction (d.p.i.) of HE. Memory assessment included novel object recognition and Y-maze tests up to 8<sup>th</sup> day, and the Barnes maze test until the 13<sup>th</sup> d.p.i. Liver and brain tissues were collected for histopathological analysis on the 7<sup>th</sup> d.p.i. HE was associated with locomotor deficits only on the 1<sup>st</sup> d.p.i., and cognitive impairment in the open field test in repeated exposures; no changes in memory were observed in the other behavioral tests over time. Hepatic histopathology, on the 7<sup>th</sup> d.p.i., revealed necrotic foci surrounded by inflammatory infiltrate, predominantly neutrophils and some lymphocytes. Moreover, inflammatory nodules composed of macrophages, lymphocytes, and giant cells were also observed in the liver of animals with ALI on the 7<sup>th</sup> d.p.i. No histopathological changes were observed in the brain on the 7<sup>th</sup> d.p.i. For locomotor and neuroinflammatory analysis, male C57BL/6 WT or TNFR1<sup>-/-</sup> mice received saline or TAA i.p. After 24 hours, locomotor activity was assessed, and levels of TNF, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, CCL2, CX3CL1, and BDNF were measured in the prefrontal cortex and hippocampus. The absence of TNFR1 attenuated locomotor deficits, and, in parallel, increased levels of both pro-inflammatory mediators and IL-10 in the brain during ALI-induced HE, on the 1<sup>st</sup> d.p.i. These data suggest that TNF plays a regulatory role in the development and progression of HE. Despite relative motor and cognitive recovery over time, animals with ALI showed mild to moderate necrotic hepatitis after seven days, indicating persistent hepatic inflammation even after neurological symptom improvement.

Keywords: hepatic encephalopathy; TNFR1 KO; TNF; behavioral tests; memory; hepatic histopathology; locomotor activity.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação da EH e seus principais sintomas .....	22
Quadro 2 - Grupo experimental 1 .....	47
Quadro 3 - Grupo experimental 2.....	56

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Conectividade funcional da DMN nos grupos controle (sadios) e dos pacientes com EHM .....	26
Figura 2 - Hiperamonemia na EH .....	31
Figura 3 - Hiperamonemia e inflamação contribuem para o desenvolvimento da EH .....	32
Figura 4 - Encefalopatia hepática induzida por tioacetamida .....	43
Figura 5 - Delineamento experimental 1 .....	48
Figura 6 – Desenho representativo do aparato do teste de campo aberto .....	49
Figura 7 - Desenho representativo do aparato do teste de reconhecimento de novo objeto .....	50
Figura 8 - Desenho representativo do aparato do teste do labirinto em Y .....	51
Figura 9 - Desenho representativo da sala de experimentação no teste de Barnes .....	52
Figura 10 - Delineamento experimental 2 .....	57
Figura 11 - Artigo original .....	63
Figura 12 - Artigo de revisão .....	74

## ABREVIATURAS

AASLD	<i>American Association for the Study of Liver Disease</i>
ACLF	<i>acute-on-chronic liver failure</i>
ALT	alanina aminotransferase
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolpropionato
AOM	Azoximetano
AST	aspartato aminotransferase
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BHE	barreira hematoencefálica
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CBD	Canabidiol
CCA	córtex cingulado anterior
CCL2	quimiocina ligante 2
CCP	córtex cingulado posterior
CEBIO	Centro de Bioterismo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COX-2	Ciclooxygenase 2
CTLA4	proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico
CX3CL1	<i>C-X3-C motif chemokine ligand 1</i> ; fractalquina
CX3CR1	receptor de CX3CL1
CYP1B1	citocromo P450 família 2 subfamília E membro 1
d.p.i.	dia após a indução
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DILI	<i>drug-induced liver injury</i>
DNM	<i>default mode network</i>
EASLD	<i>European Association for the Study of Liver Diseases</i>
EC	<i>endothelial cell</i>
EH	encefalopatia hepática
EHM	encefalopatia hepática mínima
EH-TNFR1 <sup>-/-</sup>	camundongo deficiente para o TNFR1 com EH
EH-WT	camundongo selvagem com EH
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ETA	Etanercepte
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FH	falência hepática
FHA	falência hepática aguda
FHC	falência hepática crônica
FHF	falência hepática fulminante
GABA	ácido $\gamma$ -aminobutírico
Gln	glutamina
GLS-1	glutaminase

Glu	glutamato
GPH	giro para-hipocampal
GS	glutamina sintetase
H&E	hematoxilina e eosina
HMGBs	proteínas de caixa de grupo de alta mobilidade
HO-1	heme oxigenase 1
i.p.	intraperitoneal
Iba-1	<i>ionized calcium-binding adaptor molecule 1</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN- $\gamma$	interferon $\gamma$
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintetase induzível
LDB	ligação de ducto biliar
LHA	lesão hepática aguda
LOLA	L-ornitina-L-aspartato
LPS	lipopolissacarídeos
mCPF	córtex pré-frontal medial
mGlu	receptor metabotrópico para Glu
NF-kB	fator nuclear kB
NH <sub>3</sub>	amônia
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	amônio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	<i>nitric oxide</i>
p55 ou TNFR1	receptor 1 de TNF
p75 ou TNFR2	receptor 2 de TNF
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered salin</i>
PCUN	precuneus
PHEs	<i>Psychometric Hepatic Encephalopathy Score</i>
RNO	teste de reconhecimento do novo objeto
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
S100	proteína S100
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SNAT	transportador de glutamina astrocítico
SNC	sistema nervoso central
sTNF	TNF solúvel
TAA	Tioacetamida
TASO <sub>2</sub>	sulfóxido de tioacetamida
TLR4	<i>toll-like receptor 4</i>
tmTNF	TNF transmembrana
TNF	fator de necrose tumoral
TNFR1 ou p55	receptor 1 do TNF

TNFR1 <sup>-/-</sup> ou TNFR1 KO	camundongos deficientes para o receptor 1 do TNF
TNFR2 ou p75	receptor 2 do TNF
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHC	<i>West Haven Criteria</i>
WT	<i>wild type</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>21</b>
2.1	Classificação da EH quanto à gravidade	21
2.2	Tratamento	22
2.3	Dados epidemiológicos	23
2.4	Alterações no SNC de pacientes com EH	25
2.5	Alterações macroscópicas e microscópicas do fígado de pacientes com FHF e EH	28
2.6	Fisiopatologia da EH	29
2.6.1	Hiperamonemia	29
2.6.2	Inflamação	32
2.6.2.1	Inflamação periférica e neuroinflamação	33
2.6.2.2	Célula endotelial (EC)	33
2.6.2.3	Micróglia	34
2.6.2.4	Astrócito	35
2.6.2.5	TNF e EH	36
2.6.2.6	Mediadores inflamatórios na EH	38
2.6.2.7	Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)	39
2.7	Modelo experimental da EH com tioacetamida (TAA)	40
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>45</b>
	<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>47</b>
6.1	Animais	47
6.2	Indução da lesão hepática aguda	47
6.3	Delineamento experimental	48
6.4	Testes comportamentais	48
6.4.1	Teste de campo aberto	49
6.4.2	Teste de reconhecimento de novo objeto	49
6.4.3	Teste do labirinto em Y	50
6.4.4	Teste de Barnes	51
6.4.4.1	Teste de Barnes: habituação e treino	52

6.4.4.2	Teste de Barnes: dia do teste.....	53
6.5	Eutanásia e armazenamento das amostras.....	53
6.6	Análise histopatológica do encéfalo e do fígado.....	53
6.7	Análises estatísticas.....	54
<b>CAPÍTULO 2</b>	.....	<b>55</b>
<b>7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	.....	<b>55</b>
<b>8 MATERIAL E MÉTODOS</b>	.....	<b>56</b>
8.1	Animais.....	56
8.2	Indução da lesão hepática aguda.....	56
8.3	Delineamento experimental.....	56
8.4	Teste de campo aberto.....	57
8.5	Eutanásia e armazenamento das amostras.....	57
8.6	Análise das citocinas por CBA no córtex pré-frontal e no hipocampo.....	57
8.7	Avaliação dos níveis da CX3CL1 e do BDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo por ELISA.....	58
8.8	Análises estatísticas.....	58
<b>9 CONCLUSÃO</b>	.....	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	.....	<b>59</b>
<b>APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL</b>	.....	<b>73</b>
<b>APÊNDICE B – ARTIGO DE REVISÃO</b>	.....	<b>74</b>

A encefalopatia hepática (EH) é uma síndrome neuropsiquiátrica que se desenvolve em decorrência da falência do fígado (Ferenci, 2017; Vilstrup *et al.*, 2014). Existem três tipos de EH: tipo A, que ocorre a partir da falência hepática aguda (FHA); tipo B, caracterizada pelo desvio portossistêmico; e tipo C, relacionada à falência hepática crônica (FHC), por exemplo, um quadro avançado da cirrose hepática. A EH pode apresentar diversos sintomas como confusão mental, déficit cognitivo e motor, prejuízo do sono, coma e morte (Ferenci, 2017).

Os tipos da EH são categorizados de acordo com as suas causas; entretanto, as manifestações clínicas são bem semelhantes, com alterações cognitivas e motoras nas três categorias, sendo as principais diferenças entre elas o tempo de início, o tempo de progressão e a recorrência. Na EH tipo A, geralmente os sintomas aparecem mais cedo, logo após o início da FHA, com rápida evolução, podendo levar ao coma e à morte (Bessone *et al.*, 2021; European Association for the Study of the Liver, 2017). Na EH tipo C, a doença desenvolve-se depois de anos do início da doença hepática e, após o primeiro episódio da EH, há maior chance de advirem recorrências ao longo da vida (Chirapongsathorn *et al.*, 2018; Patidar *et al.*, 2017; Tapper; Halbert; Mellinger, 2016).

A FHA é caracterizada por episódio agudo do comprometimento da função do fígado, desencadeando síndrome icterícia/bilirrubinemia, coagulopatia e EH (Bessone *et al.*, 2021; European Association for the Study of the Liver, 2017). É observado aumento sérico das enzimas hepáticas – alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), importantes marcadores da lesão dos hepatócitos (Ferenci *et al.*, 2002). A FHA é causada por agentes assépticos, como intoxicação, overdose medicamentosa ou por outras substâncias, comprometimento vascular, síndrome metabólica, gravidez, hepatite autoimune, linfoma e hipertermia, bem como por agentes infecciosos, como vírus, principalmente vírus da hepatite (A, B e E), citomegalovírus, *Herpes simplex* e vírus da dengue (Bessone *et al.*, 2021; European Association for the Study of the Liver, 2017). Pacientes com FHA manifestam alterações imunológicas, aumento sérico de mediadores inflamatórios e, portanto, maior risco de infecções e sepse. Além disso, durante o quadro de falência hepática (FH), outros órgãos podem ser comprometidos, como o sistema cardiovascular, gastrointestinal, pulmões, rins e sistema nervoso central (SNC). As consequências da FH no SNC resultam, muitas vezes, em alterações morfológicas e bioquímicas, que levam a disfunções neurológicas e psiquiátricas, características da EH (European Association for the Study of the Liver, 2017).

### 2.1 Classificação da EH quanto à gravidade

Pacientes com EH apresentam, em geral, diversas alterações neurológicas e psiquiátricas. Os principais sintomas são alterações na personalidade (apatia, irritabilidade e desinibição), alteração na consciência e na função motora, distúrbios no ciclo sono-vigília, desorientação progressiva do tempo e espaço, comportamento inapropriado, estado confusional agudo com agitação ou sonolência, estupor e coma (Patidar; Bajaj, 2015; Stewart; Smith, 2007; Vilstrup *et al.*, 2014; Wijdicks, 2016).

A EH, além de ser denominada quanto a sua causa, de acordo com o tipo de FH, também se classifica quanto à gravidade. Segundo *West Haven Criteria* (WHC), tem-se EH mínima (EHM) e EH graus I, II, III e IV. Na EHM, os pacientes exibem algumas dificuldades na execução das tarefas do dia a dia, porém sem grandes manifestações clínicas. Na EH grau I, possuem sintomas leves, como desorientação no tempo e espaço, ansiedade e déficit de atenção. Na EH grau II, os pacientes tendem a desenvolver letargia, comportamento inapropriado e desorientação no tempo. Na EH grau III, sonolência, confusão e comportamento bizarro são sintomas frequentes. A EH grau IV, por sua vez, compreende os pacientes em coma [(Vilstrup *et al.*, 2014; Weissenborn, 2019) (Quadro 1)]. A *American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD) e a *European Association for the Study of Liver Diseases* (EASLD) classificam a EH em duas categorias: a EH oculta e a evidente. A EH oculta inclui a EHM e grau I, e a EH evidente comporta a EH grau II, III e IV [(Bajaj, 2018; Patidar; Bajaj, 2015; Patidar *et al.*, 2017; Vilstrup *et al.*, 2014; Weissenborn, 2019) (Quadro 1)].

O teste psicométrico quantitativo WHC é considerado padrão ouro para o diagnóstico da EH (Vilstrup *et al.*, 2014). No entanto, esse teste possui algumas limitações para detectar alterações mínimas, sendo recomendado para o diagnóstico da EHM o teste de Escore Psicométrico de Encefalopatia / *Psychometric Hepatic Encephalopathy Score* (PHES). O PHES é composto por uma bateria de testes que avaliam atenção, percepção espacial, acurácia motora, entre outras características que podem estar minimamente alteradas devido à EH (Weissenborn, 2008). Utiliza-se a Escala de Coma de Glasgow para avaliar o nível de consciência em pacientes comatosos ou com estado de consciência fortemente comprometido (Vilstrup *et al.*, 2014). Além das manifestações clínicas e dos testes psicométricos, outras estratégias auxiliam no diagnóstico da EH, como eletroencefalograma e exames de imagem, incluindo a tomografia computadorizada (Wijdicks, 2016).

Algumas evidências apontam para o papel de mediadores inflamatórios periféricos como potenciais biomarcadores da EH, que, futuramente, poderão contribuir para o diagnóstico da síndrome. Por exemplo, há uma correlação positiva entre os níveis séricos da citocina inflamatória interleucina (IL)-6 e a gravidade da EHM (Luo *et al.*, 2012) e da EH evidente (Luo *et al.*, 2013), entretanto mais estudos são necessários.

**Quadro 1 - Classificação da EH e seus principais sintomas**

AASLD/EASL	WHC	Sintomas clínicos
EH oculta	Mínima	Alguma alteração em testes psicométricos ou neuropsicológicos, porém sem manifestações clínicas ou alterações evidentes no <i>status</i> mental.
	Grau I	Leve redução na capacidade cognitiva e atenção, leve falta de consciência, euforia, ansiedade, alteração no ciclo sono-vigília.
EH evidente	Grau II	Alterações motoras e cognitivas, letargia, apatia, desorientação no tempo, alteração de personalidade, comportamento inapropriado, dispraxia e Asterix.
	Grau III	Sonolência, estupor, confusão, desorientação de tempo e espaço, comportamento bizarro; presença de resposta a estímulos.
	Grau IV	Coma; ausência de resposta a estímulos.

AASLD: Association American Association for the Study of Liver Diseases. EASL: European Association for the Study of the Liver. EH: encefalopatia hepática. WHC: West Haven Criteria. Fonte: elaborado pela autora segundo Vilstrup *et al.* (2014) e Wijdicks (2016).

## 2.2 Tratamento

Durante o quadro de FH, seja aguda ou crônica, os principais procedimentos terapêuticos são aplicados principalmente para melhorar ou impedir a piora na deterioração do fígado, sendo prováveis de reduzirem ou não as consequências desencadeadas em outros órgãos. Na EH, ainda não foi desenvolvida uma conduta terapêutica efetiva para seu tratamento, sendo as principais estratégias baseadas na redução da absorção da amônia e no controle da microbiota intestinal. O uso da lactulose, um dissacarídeo não absorvível, é considerado o tratamento padrão para EH, o qual tem efeito laxativo e reduz a produção intestinal de amônia (Wijdicks, 2016; Yanny *et al.*, 2019). A lactulose tende a reduzir a mortalidade em pacientes com EH evidente, mas não com EHM. Em alguns casos, a lactulose vem combinada com a rifaximina, um antibiótico pouco absorvível para auxiliar no controle da microbiota intestinal e

na redução da amônia produzida por microrganismos. A rifaximina reduz as chances da remissão da doença e a necessidade de hospitalizações em pacientes com EH (Yanny *et al.*, 2019).

Outras condutas também são aplicadas para o tratamento da EH. O uso da L-ornitina-L-aspartato (LOLA), que reduz os níveis séricos da amônia e geralmente é ministrada a pacientes que não respondem ao tratamento com lactulose (Wijdicks, 2016). Em pacientes com EHM, o tratamento com LOLA melhorou a função cognitiva (Yanny *et al.*, 2019). O uso de probióticos, por exemplo, a suplementação alimentar com *Lactobacillus* ou *Saccharomyces* (Wijdicks, 2016) e outras substâncias como zinco, aminoácidos de cadeia ramificada e benzoato de sódio também são apontado como alternativas para o tratamento da EH. O antibiótico pouco absorvível neomicina é aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso no tratamento da EH tipo A, por FHA, mas não para a EH do tipo C (Yanny *et al.*, 2019).

De maneira geral, essas substâncias objetivam a diminuição dos níveis da amônia, reduzindo sua absorção ou acelerando o seu metabolismo. Esses tratamentos são capazes de reduzir os sintomas e melhorar a EH de forma parcial. Muitos pacientes acusam efeitos colaterais como diarreia e febre, baixa eficácia e tolerabilidade – fatores que dificultam a aderência ao tratamento. Além disso, muitos deles não respondem aos tratamentos recomendados e/ou não apresentam alteração nos níveis de amônia; nem sempre a hiperamonemia acarreta o agravamento da EH. Todos esses dados reforçam a necessidade de estudos que ofereçam novas estratégias terapêuticas para o tratamento da EH, tanto em pacientes com FH aguda quanto crônica (Wijdicks, 2016).

### **2.3 Dados epidemiológicos**

A EH é uma complicação comum e debilitante das doenças hepáticas agudas e crônicas que impacta diretamente o estado de saúde, a qualidade de vida e a taxa de sobrevivência do paciente (Bajaj *et al.*, 2011; Bustamante *et al.*, 1999; Patidar *et al.*, 2017; Yanny *et al.*, 2019; Wong; Gish; Ahmed, 2014). A EH permeia muitas áreas da vida do paciente, não apenas a saúde, mas a vida pessoal, financeira e familiar (Yanny *et al.*, 2019). Pacientes com cirrose associada à EH possuem maior dificuldade na execução das atividades diárias e requerem um manejo terapêutico mais complexo (Amodio, 2018). Além disso, a EH e a consequente disfunção cognitiva relacionam-se à pior empregabilidade, pior renda e sobrecarga do cuidador, impactando o funcionamento familiar e a adesão médica (Bajaj *et al.*, 2011).

Os dados epidemiológicos precisos sobre prevalência e incidência da EH ainda são

restritos e pouco notificados, com uma atenção especial à EHM, por ser subdiagnosticada<sup>24</sup> e subnotificada (Poordad, 2007; Stewart; Smith, 2007). A maioria dos registros refere-se principalmente à EH tipo C, em pacientes cirróticos, dos quais 30-70% são afetados por EHM ou evidente (Neff; Zachry, 2018). A EH é um importante fator associado à taxa de mortalidade em pacientes cirróticos. Destes, os que desenvolvem EH severa, grau 3 e 4, possuem uma taxa de sobrevivência de 42% e 23% no período de um e três anos, respectivamente (Bustamante *et al.*, 1999). A presença de EH incorre em um risco de morte de 66% em pacientes submetidos ao transplante hepático (Wong; Gish; Ahmed, 2014).

A EH também tem grande impacto sobre os custos no sistema de saúde. Nos Estados Unidos da América, entre 2005 e 2009, os custos relacionados à internação por essa síndrome aumentaram de \$46,663 para \$63,108 por caso. Durante esse período, houve um aumento na proporção de pacientes com EH de maior gravidade (Stepanova *et al.*, 2012), cuja consequência recai diretamente em tempo das internações e custo com pacientes hepatopatas. Pacientes com pelo menos um episódio de EH têm maior chance de readmissão da internação hospitalar, onde 38% destes foram readmitidos em menos de 30 dias, e 13,6%, entre 31 e 90 dias (Tapper; Halbert; Mellinger, 2016).

No Brasil, entre 2001 e 2009, as doenças do trato digestório foram a sétima causa de morte mais prevalente, representando 4,9% do total; destes, 3,34% corresponderam às doenças do fígado. Nesse período, 0,72% das admissões hospitalares vincularam-se às doenças do fígado, sendo 67,16% pacientes homens e 32,83% mulheres. A principal causa dessas hospitalizações foi associada à cirrose hepática, representando mais de um terço dos casos (35%), seguida da FHA e FH subaguda, com 8,59% do total dos casos das hospitalizações por doenças do fígado. Além das hospitalizações, a cirrose também é a principal causa de morte de doenças hepáticas [(42%) (Nader; de Mattos; Bastos, 2014)]. Muitas internações por cirrose hepática são devidas à descompensação aguda somada a outras consequências, como a EH (Picon *et al.*, 2017). Nos últimos dez anos, o investimento aplicado para o custo com o transplante hepático superou 200 milhões de reais (Guimarães *et al.*, 2024).

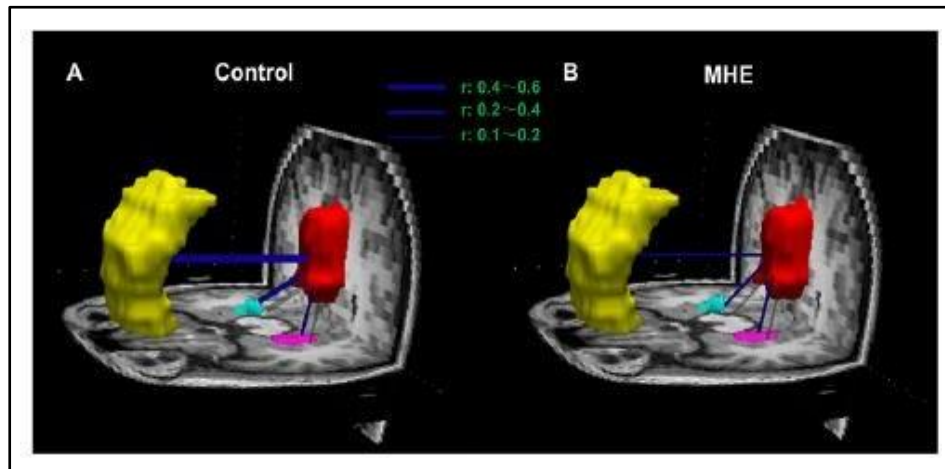
Os dados epidemiológicos mais atuais acerca da EH no Brasil ainda são escassos. Poucos estudos abordam ou citam a EH, sendo subjugada quanto a sua importância na saúde pública, na progressão e na mortalidade relacionada às doenças hepáticas. O Brasil é um país com grande extensão territorial e populacional, possuindo cinco regiões muito distintas nas características socioeconômicas, educacionais, ambientais, culturais, acesso à serviços básicos, incluindo a assistência à saúde. Outros fatores que favorecem a subnotificação de dados estão relacionados ao diagnóstico, hospitalizações, associação com outras doenças, procura à assistência à saúde

pelo paciente, notificação nos obituários, entre outros (Brasil, 2021; Brasil, 2022). Embora<sup>25</sup> restritos, estudos regionais independentes com pacientes hepatopatas internados em hospitais no Brasil revelam que a EH é umas das principais complicações em pacientes com hemorragia digestiva (Silva; Rocha, 2011) e com cirrose (Silveira; Iser; Bianchini, 2016). A EH foi uma das principais causas das hospitalizações dentre pacientes cirróticos com descompensação aguda sobre doença hepática crônica / *acute-on-chronic liver failure* (ACLF), admitidos no departamento de emergência do Hospital Nossa Senhora da Conceição em Porto Alegre, Brasil, em 2016. Nos pacientes com ACLF, 38,9% apresentaram EH graus I e II, e 22,2% graus III e IV, e a taxa de mortalidade foi de 83,3% em 90 dias (Picon *et al.*, 2017).

#### **2.4 Alterações no SNC de pacientes com EH**

Em muitas doenças e síndromes, regiões isoladas e/ou interconectadas do cérebro e cerebelo podem sofrer alterações morfológicas e/ou funcionais, que trazem como consequência sintomas, e também associações a um menor desempenho nos testes cognitivos. Por exemplo, a rede cerebral padrão / *Default Mode Network* (DMN) está envolvida em diversas funções, como atenção e memória; já a rede neural DMN compreende as regiões cerebrais do córtex cingulado posterior (CCP)/precuneus (PCUN), córtex pré-frontal medial (mCPF), lóbulo parietal inferior bilateral, córtex temporal inferior e giro para-hipocampal (Qi *et al.*, 2012). Pacientes cirróticos e pessoas saudáveis demonstraram o mesmo padrão espacial de conectividade da DMN. Entretanto, os pacientes com EHM exibiram diminuição da interação na conectividade no CCP/PCUN e no mCPF (Fig. 1), e isto foi relacionado com um pior desempenho cognitivo em testes neuropsicológicos. Além disso, foi observada redução na interação do globo pálido com o giro temporal inferior, e giro temporal superior esquerdo – regiões relacionadas à percepção visual e à linguagem, respectivamente. Portanto, os prejuízos visuais e de linguagem na EH são causados, muitas vezes, por alterações nessa rede neural (Qi *et al.*, 2012).

**Figura 1 - Conectividade funcional da DMN nos grupos controle (sadios) e dos pacientes<sup>26</sup> com EHM**



Comparado ao grupo controle (A), os pacientes com EHM (B) apresentam redução no coeficiente de correlação temporal, que reflete a interação da conectividade entre o CCP/PCUN e CPFm e entre CCP/PCUN e GPH esquerdo. Média do coeficiente de correlação temporal  $r$  (Azul). DMN: *Default Mode Network* – rede de padrão cerebral. CCP/PCUN: córtex cingulado posterior/precuneos (vermelho). mCPF: córtex pré-frontal medial (amarelo). GPH: giro para-hipocampal esquerdo (rosa) e direito (azul ciano). EHM/MHE: encefalopatia hepática mínima. Fonte: Qi *et al.* (2012).

Pacientes cirróticos com EHM mostraram conectividade funcional reduzida no córtex cingulado medial direito, giro temporal superior/giro temporal medial bilateral e putâmen direito. Adicionalmente, o aumento da gravidade da EH e a disfunção cognitiva estão associados ao prejuízo da conectividade funcional no córtex cingulado anterior (CCA). O CCA é uma região envolvida na atenção e no processamento cognitivo e emocional. Pacientes com EHM manifestaram perturbação na conectividade entre o globo pálido e CCA, diretamente relacionada à diminuição do desempenho nos testes neuropsicológicos (Zhang *et al.*, 2013).

Em pacientes com EH, verificou-se o aumento de glutamina (Gln) no cérebro, relacionada ao aumento dos níveis séricos da amônia e à gravidade da síndrome EH. No SNC, o aumento do fluxo de água através das membranas, constatado nos exames de imagem, reflete o edema cerebral. Pacientes com EHM apontaram aumento do fluxo de água na substância branca do cérebro, no lobo frontal bilateral, precuneus, corpo caloso (Chen *et al.*, 2015), trato corticoespinhal e substância branca parietal (Chavarria *et al.*, 2013). Em pacientes com EHM, após o transplante de fígado, houve reversão do edema cerebral no CCA esquerdo, cláustro, giro pós-central e corpo caloso direito. E essa reversão do edema cerebral foi diretamente relacionada com a melhora dos resultados nos testes cognitivos (Lin *et al.*, 2014). Além disso, o aumento do fluxo de água, no trato corticoespinhal e na substância branca parietal, e o aumento de Gln no cérebro foram correlacionados com a gravidade da EH. Nos pacientes que

se recuperaram da EH, houve redução de, aproximadamente, 36% dos níveis de Gln e do fluxo de água no trato corticoespinhal e da substância branca parietal (Chavarria *et al.*, 2013).

A integridade microestrutural do encéfalo em pacientes com EHM estava comprometida, mostrando-se reduzida na substância branca do cérebro, no lóbulo paracentral esquerdo, nos lobos bilaterais frontal, parietal, occipital e temporal, cápsula interna e corpo caloso. Os valores do aumento do fluxo de água e da integridade microestrutural foram relacionados com o pior prognóstico e redução da taxa de sobrevivência do paciente, independente da gravidade da doença hepática (Chen *et al.*, 2015). Em pacientes com EHM foi registrado prejuízo no desempenho cognitivo, como redução da velocidade psicomotora, atenção, memória visual e função motora visuoespacial. Este déficit foi associado à anormalidade na camada branca, como aumento da difusão de água e redução da integridade microestrutural da camada branca, especialmente no corpo caloso e nos lobos frontal e parietal (Chen *et al.*, 2015).

Observações histopatológicas em pacientes com esteatohepatite ou cirrose e EH apontaram neurodegeneração, pela redução do número de neurônios de Purkinje e da camada granular no cerebelo. Constatou-se aumento da ativação microglial na camada molecular e na substância branca do cerebelo em pacientes com diferentes graus de esteatohepatite crônica, cirrose e EH. A neurodegeneração e a ativação microglial aumentaram com a progressão da doença hepática. Em pacientes com esteatohepatite ou cirrose e EH, a glia de Bergmann, subtipo de astrócito cerebelar que reside na camada molecular próximo aos neurônios de Purkinje, apresentaram morfologia desorganizada e hipertrofiada. Foi possível detectar infiltrado inflamatório periférico de linfócitos T nas meninges cerebelares nesses pacientes (Balzano *et al.*, 2018).

Adicionalmente, Zemtsova *et al.* (2011) relataram aumento da ativação microglial no encéfalo de ratos com intoxicação aguda de amônia e em pacientes com cirrose e EH, mas não em pacientes cirróticos sem EH (Zemtsova *et al.*, 2011). Dennis *et al.* (2014) confirmaram aumento da intensidade do marcador da micróglia, molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1 / *Ionized calcium-binding adaptor molecule 1* (Iba-1), nas substâncias branca e cinzenta do cérebro e menor densidade neuronal no giro frontal superior dos pacientes com cirrose e EH (Dennis *et al.*, 2014). Além da micróglia, também foi observada alteração nos astrócitos. Estudos *post mortem* em pacientes cirróticos com EH mostraram anormalidades nucleares e aumento da senescência astrocitária, acompanhado do aumento da expressão de genes associados à senescência, no córtex pré-frontal dos pacientes com cirrose e EH, mas não em pacientes sem EH (Gorg *et al.*, 2015). No SNC de pacientes com falência hepática

fulminante (FHF) com EH graus 3 e 4, com idade entre 14-81 anos, foi observado cérebro edematoso e herniação das tonsilas cerebelares no lobo temporal; essas alterações no SNC foi acompanhada de lesões periféricas como redução do volume e do peso hepático, erosão no esôfago, hemorragia gastrointestinal, retroperitoneal, ocorrência de falência renal, e a presença de microtrombos no fígado, pulmão, rins e cérebro, em um quarto dos pacientes (Gazzard *et al.*, 1975). Nem sempre é possível correlacionar as lesões hepáticas com as alterações no SNC, no tópico a seguir serão descritas as lesões no fígado encontradas em pacientes hepatopatas que apresentaram EH.

## **2.5 Alterações macroscópicas e microscópicas do fígado de pacientes com FHF e EH**

No fígado, embora seja difícil avaliar completamente os danos histopatológicos sem levar em consideração as suas causas, algumas alterações e padrões comuns em pacientes com FHF podem ser encontradas. Entretanto, é importante ressaltar que a causa da FHF e o grau da doença influenciam a histopatologia.

Em um estudo envolvendo pacientes com FHF com EH graus 3 e 4, idade entre 14-81 anos, as causas mais comuns de morte foram por hepatite viral e overdose por paracetamol. A autópsia revelou que esses pacientes possuíam volume e peso hepático reduzidos (Gazzard *et al.*, 1975). Hanau e Rubin (1995) pesquisaram as alterações hepáticas de pacientes entre 15-64 anos de idade com FHF. De uma maneira geral, foram separadas em categorias: 1 – necrose hepática massiva, > 90% de necrose hepatocelular; 2 – necrose hepática submassiva; 3 – cirrose; e 4 – necrose mínima. A maioria dos pacientes manifestou necrose hepática confluyente, embora algumas biópsias hepáticas tivessem o parênquima parcialmente ou completamente preservado. Em poucos espécimes foi estabelecida a cirrose (Hanau; Rubin, 1995). A seguir serão descritos mais detalhes da análise anatomopatológica do fígado:

1) Em pacientes com EH avançada que morreram ou sofreram transplante: fígado com necrose hepática massiva, peso médio relativamente menor, enrugamento da cápsula e manchas no parênquima e perda completa ou quase total do parênquima hepático. A histologia revelou perda de hepatócitos por todo lobo, enquanto hepatócitos remanescentes revelaram degeneração hidrópica, proliferação ductular, sinusoides com células inflamatórias mononucleares dispersas, células de Kupffer dilatadas e macrófagos, comumente foi observada deposição de pigmento nessas células.

2) Em pacientes com necrose submassiva e EH de baixo grau e grau 4: necrose confluyente em 30-90% do parênquima, fígado com peso maior do que os de pacientes com

necrose massiva, devido a retenção do parênquima hepático. Foram verificadas lesões extensas<sup>29</sup> de edema, transformação pseudoacinar e colestase, células gigantes, proliferação ductular pequena, intensa inflamação por infiltração de neutrófilos próximo ao trato portal e inflamação difusa leve. Em quase a metade dos pacientes havia hipertensão intracraniana intensa.

3) Em pacientes com cirrose e EH moderada e intensa, graus 2 e 4, respectivamente: fígado com cirrose estabelecida e vários graus de inflamação. Um espécime mostrou necrose submassiva e dois pacientes desenvolveram hipertensão intracraniana.

4) Em 11% dos pacientes com FHF houve somente necrose mínima. Em todos os níveis de necrose dos pacientes com FHF, o grau da EH e a idade do paciente mostraram-se importantes preditores da evolução clínica (Hanau; Rubin, 1995).

Em outro estudo, na Índia, 224 pacientes com FHF foram autopsiados entre 1983 e 2002. Das, Jain e Das (2007) verificaram um rápido desenvolvimento da disfunção hepatocelular, acompanhado de icterícia, coagulopatia ou presença de EH sem história prévia de doença hepática. Nesse estudo, a classificação baseou-se no padrão da necrose, na extensão da destruição dos hepatócitos acinares, infiltrado inflamatório e presença de nódulos regenerativos. O padrão mais comum encontrado nos pacientes com FHF foi de necrose hepática confluyente multifocal sem regeneração (47,8%), seguido de necrose hepática confluyente multifocal com regeneração (26,9%), necrose hepática em ponte (5,5%) e patologias diferentes [(18,4%) (Das; Jain; Das, 2007)]. A seguir serão descritos mais detalhes da análise anatomopatológica do fígado:

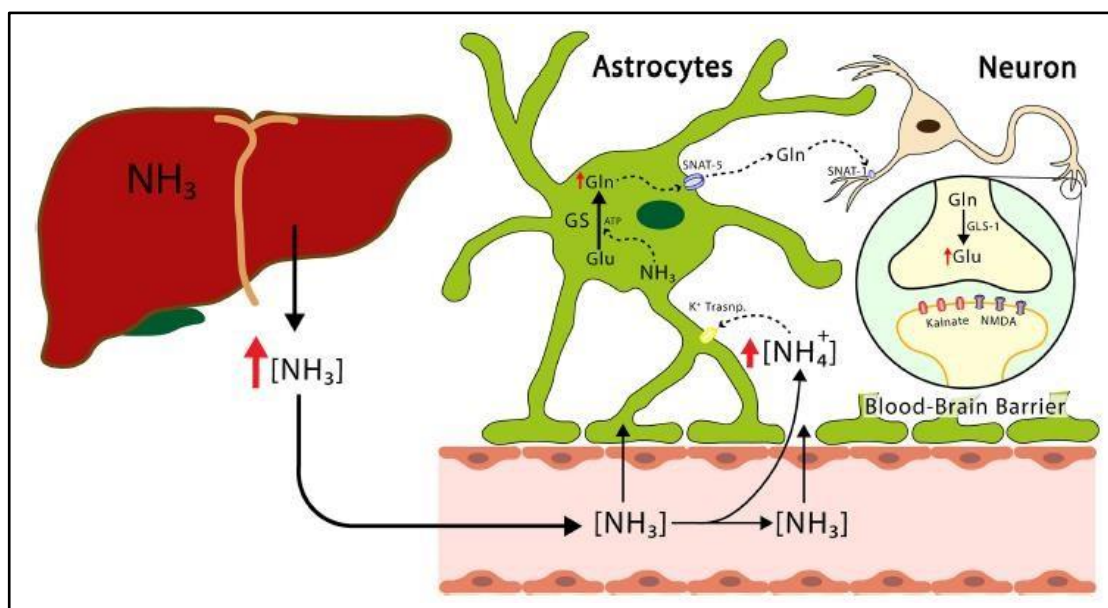
1) Na histopatologia, pacientes com necrose hepática confluyente multiacinar extensiva sem regeneração mostraram necrose extensa com a arquitetura hepática mantida e intenso infiltrado inflamatório agudo, com ocasional presença de macrófagos.

2) Na necrose hepática confluyente multiacinar com regeneração, o padrão histopatológico foi de extensa área necrótica com formação de nódulos regenerativos. Na zona necrótica observou-se presença de aglomerados de macrófagos com uma população mista de células inflamatórias. Áreas de colapso da área necrótica formando “septos que se conservaram em coloração especial, mostrando que não eram formadas por fibras elásticas, diferenciando-se da cirrose (Das; Jain; Das, 2007).

## **2.6 Fisiopatologia da EH**

### **2.6.1 Hiperamonemia**

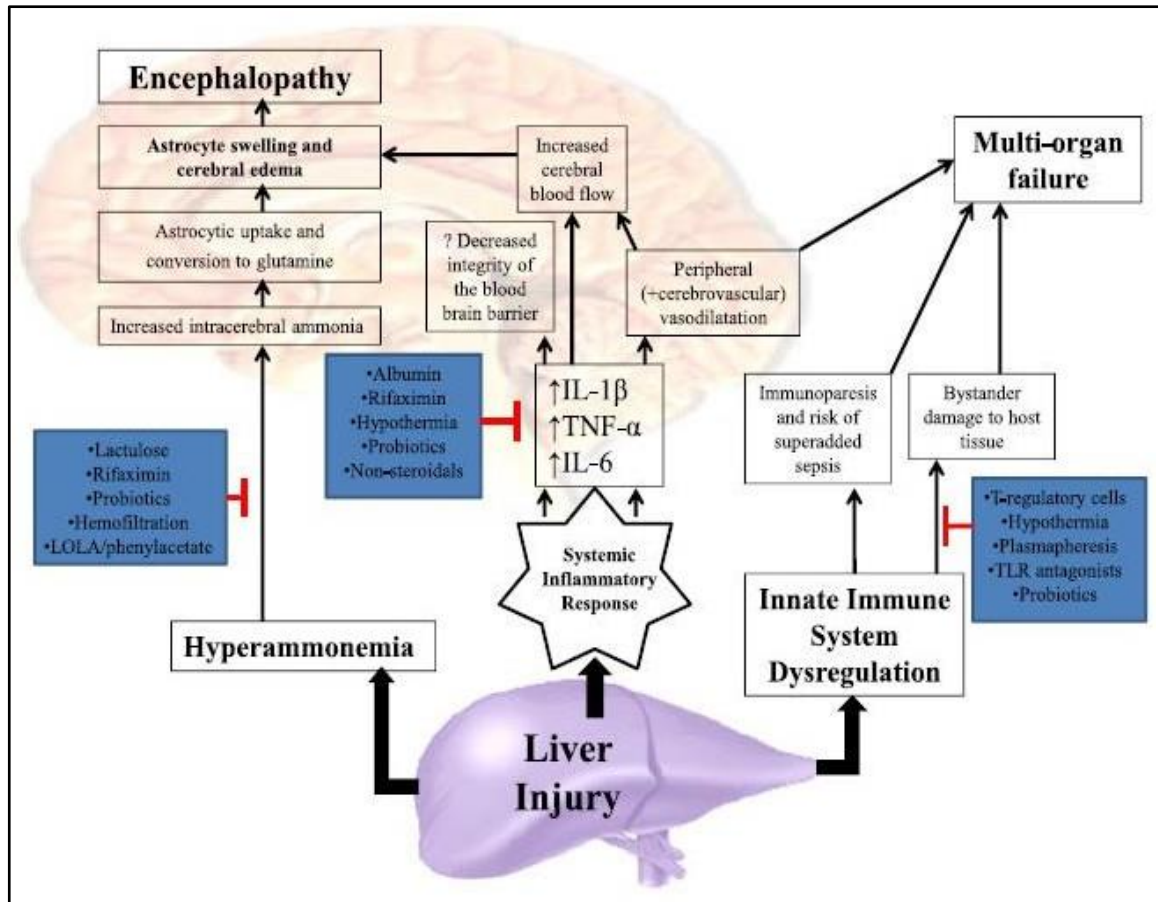
A patogênese da EH ainda não foi totalmente esclarecida, entretanto a inflamação e a hiperamonemia têm sido implicadas no desenvolvimento e na progressão dessa síndrome. Devido ao funcionamento inadequado do fígado e às lesões nos hepatócitos, durante a FH é observado aumento sérico das enzimas hepáticas, como ALT e AST, dos mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, e de substâncias tóxicas, como a amônia (Blank; Prinz, 2013; Ferenci, 2017; Jayakumar; Norenberg, 2018). A amônia é resultado do produto da degradação de proteínas e é convertida em ureia nos hepatócitos e, em menor grau, pelos rins. Após a conversão da amônia em ureia, esta é eliminada na urina (Walker, 2014). O comprometimento da função hepática pode prejudicar o metabolismo e a eliminação da amônia, levando ao aumento sérico da amônia, conhecido como hiperamonemia. A amônia circulante em excesso atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) e é neutralizada pelos astrócitos (Jaeger; DeMorrow; McMillin, 2019). No astrócito, a neutralização da amônia ocorre através da conjugação da amônia ao glutamato (Glu) pela enzima glutamina sintetase (GS), formando Gln. O excesso de Gln dentro do astrócito aumenta a pressão osmótica, provocando a entrada de água nessa célula, levando a um processo conhecido como edema astrocitário. Adicionalmente, o excesso de Gln, formada pelos astrócitos, pode ser transferido para os neurônios, favorecendo o aumento da liberação de Glu pelos mesmos, uma vez que a Gln é clivada pela enzima glutaminase, gerando Glu e amônia [(Limon *et al.*, 2021; Tranah *et al.*, 2013) (Fig. 2)]. O Glu é o principal neurotransmissor excitatório em mamíferos e tem sua ação mediada por receptores ionotrópicos N-metil D-aspartato (NMDA), receptor  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolpropionato (AMPA) e receptores metabotrópicos mGlu. Fisiologicamente, o Glu está envolvido em processos de memória e aprendizagem. Patologicamente, alterações nas vias glutamatérgicas (aumento e redução) são observadas em diversas neuropatologias, como nas doenças de Alzheimer e de Parkinson (Li; Yang; Lin, 2018). Em modelos experimentais de EH, houve aumento do Glu no cérebro dos animais 72h após a indução da EH (Faleiros *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2010). Vale ressaltar que a amônia *per se* é capaz de ativar o receptor NMDA, amplificando ainda mais a ativação dessa via durante a hiperamonemia [(Jaeger; DeMorrow; McMillin, 2019) (Fig. 2)]. A hiperamonemia associada ao acúmulo de água no interstício pode levar ao aumento da pressão intracraniana, edema cerebral, herniação cerebral e cerebelar (Jaeger; DeMorrow; McMillin, 2019; Jayakumar; Norenberg, 2018; Limon *et al.*, 2021; Parekh; Balart, 2015; Tranah *et al.*, 2013).



Durante a falência hepática o metabolismo da amônia fica comprometido, culminando em aumento sérico de amônia, que por sua vez atinge o SNC atravessando a barreira hematoencefálica. No SNC, a principal célula envolvida no seu metabolismo é o astrócito. Portanto, no astrócito, a amônia é associada ao glutamato, pela enzima glutamina sintetase, formando glutamina. O excesso de glutamina favorece a entrada de água levando ao edema astrocitário. Além disso, através do transportador SNAT-5, o astrócito libera glutamina no espaço extracelular. A glutamina liberada é captada pelos neurônios pelo transportador SNAT-1. No neurônio, a glutamina é clivada em glutamato, pela enzima glutaminase, levando ao aumento da concentração do glutamato e da sua liberação. O excesso da amônia e do glutamato levam à excitotoxicidade e ao dano neuronal. EH: encefalopatia hepática; GS: glutamina sintetase; GLS-1 glutaminase; Glu: glutamato; Gln: glutamina;  $\text{NH}_3$ : amônia;  $\text{NH}^+$ : íon amônio; NMDA: N-metil-D-aspartato; SNAT: transportador de glutamina astrocítico; SNC: sistema nervoso central. Fonte: Limon *et al.* (2021).

A hiperamonemia e a inflamação atuam, por vezes, sinergicamente no desenvolvimento e progressão da EH (Jayakumar; Norenberg, 2018; Shawcross; Jalan, 2005; Shawcross *et al.*, 2004; Tranah *et al.*, 2013). A amônia, em geral, estimula a ativação microglial diretamente, levando à liberação de mediadores inflamatórios [(Butterworth, 2016; Jayakumar; Norenberg, 2018) (Fig. 3)]. A hiperamonemia induz a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, senescência celular e a ativação dos astrócitos, fatores que incentivam e amplificam a neuroinflamação (Jayakumar; Norenberg, 2018). Embora a hiperamonemia tenha sido observada em alguns casos clínicos de pacientes com FH e em modelos experimentais da EH, a correlação entre os níveis séricos da amônia e a severidade da EH não é linear ou exponencial. A hiperamonemia nem sempre está correlacionada com a progressão da síndrome, sugerindo que há outros fatores importantes no desencadeamento e evolução da EH (Ong *et al.*, 2003).

Figura 3 - Hiperamonemia e inflamação contribuem para o desenvolvimento da EH <sup>32</sup>



Durante a falência hepática, há desregulação metabólica que leva à hiperamonemia e lesão e morte de hepatócitos, resultando na liberação de mediadores inflamatórios, recrutamento e hiperativação das células do sistema imune. Tanto a hiperamonemia quanto a inflamação contribuem para o desenvolvimento da EH e da falência em outros órgãos. A hiperamonemia contribui diretamente com o aumento do fluxo de água no encéfalo, edema cerebral e astrocitário. Os mediadores inflamatórios, como IL-1 $\beta$ , TNF e IL-6 provocam o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e do fluxo sanguíneo no SNC, o que pode acarretar em aumento da pressão intracraniana e edema, dentre outras alterações no SNC que levam ao desenvolvimento da EH. Estratégias terapêuticas com substâncias que diminuem a hiperamonemia e/ou a inflamação periférica são utilizadas para o tratamento da EH e reduzir os sintomas. EH: encefalopatia hepática; IL: interleucina; SNC: sistema nervoso central; TNF: fator de necrose tumoral. Fonte: Tranah *et al.* (2013).

## 2.6.2 Inflamação

Durante a FH, os danos hepáticos e a morte dos hepatócitos induzem respostas inflamatórias, com o recrutamento de células do sistema imune, liberação local e sistêmica de mediadores inflamatórios e maior chance de desenvolver síndrome da resposta inflamatória sistêmica / *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS). A SIRS está associada ao pior prognóstico do paciente, maior chance de infecções e desenvolvimento da EH (Azhari; Swain, 2018; Butterworth, 2016; European Association for the Study of the Liver, 2017). A SIRS é caracterizada pela liberação intensa de mediadores inflamatórios, conhecida como “tempestade

de citocinas”. Em pacientes com FHA, é comum a ocorrência da SIRS. Os principais mediadores<sup>33</sup> inflamatórios observados no soro dos pacientes com EH e nos modelos experimentais animais da FHA são TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 (Butterworth, 2016; Tranah *et al.*, 2013). Muitos pacientes cirróticos são imunossuprimidos, o que também favorece o desenvolvimento de infecções e sepse (Kerbert; Jalan, 2020). Em modelos experimentais da EH, estratégias terapêuticas com ação anti-inflamatória revelam melhora nas atividades cognitivas e motoras (Coltart; Tranah; Shawcross, 2013; Dadsetan *et al.*, 2016a; Dadsetan *et al.*, 2016b; Hernandez-Rabaza *et al.*, 2015; Luo; Guo; Cao, 2015; Luo *et al.*, 2015; Santos; Toscano; Rachid, 2023). Portanto, a inflamação apresenta um papel importante no desenvolvimento e progressão da EH (Azhari; Swain, 2018; Butterworth, 2016; Tranah *et al.*, 2013).

#### 2.6.2.1 Inflamação periférica e neuroinflamação

Há uma linha crescente de estudos que mostram a associação da inflamação sistêmica e da neuroinflamação, bem como a ativação glial, com as doenças neuropsiquiátricas, como depressão, ansiedade, doença de Alzheimer e de Parkinson (Blank; Prinz, 2013; Reus *et al.*, 2015). Vários trabalhos mostraram a correlação da inflamação periférica, por exemplo, obesidade, doenças autoimunes e infecções, atuando como indutores do prejuízo cognitivo, depressão e ansiedade (Blank; Prinz, 2013; Butterworth, 2016; Reus *et al.*, 2015).

Ao atingir o SNC, os mediadores inflamatórios periféricos interagem com as células endoteliais / *endothelial cells* (ECs), micróglia e astrócitos. Essas células ativadas contribuem para o aumento e a manutenção das respostas inflamatórias e do estresse oxidativo. Na EH, todas essas células desempenham funções essenciais, tanto na tentativa da redução de danos, controle dos níveis da amônia no SNC e restauração da homeostase, quanto na manutenção da neuroinflamação. Quando essas células assumem um papel não resolutivo na inflamação, podem contribuir para o desenvolvimento de doenças e síndromes neuropsiquiátricas (Jaeger; DeMarrow; McMillin, 2019; Takahashi *et al.*, 2021; Wahab *et al.*, 2019).

A progressão da EH tem sido correlacionada com o aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias e da ativação astrocitária e microglial em pacientes e em modelos experimentais. Nos subtópicos seguintes serão abordados os papéis das ECs, do astrócito e da micróglia na EH.

#### 2.6.2.2 Célula endotelial (EC)

As ECs compõem a BHE protegendo e dificultando a entrada de substâncias e

34  
microrganismos potencialmente prejudiciais ao SNC. Na EH, é observada diminuição dos níveis da ocludina e *zonula occludens-1*, no cerebelo (Balzano *et al.*, 2021), e de claudina 5, no cérebro (Baek *et al.*, 2020), mostrando que há aumento da permeabilidade da BHE, o que favorece a entrada de substâncias neurotóxicas, microrganismos e células inflamatórias periféricas. Em modelo experimental de FHC, a infiltração de células inflamatórias periféricas nas meninges cerebelares foi facilitada pelo aumento da permeabilidade da BHE (Balzano *et al.*, 2021). Além disso, as primeiras células com que os mediadores inflamatórios periféricos interagem, ao atingirem o SNC, são as ECs. Alguns mediadores inflamatórios periféricos, como o TNF, exibem ação vasodilatadora, bem como atuam sobre as ECs induzindo a produção de mediadores inflamatórios no SNC que, por sua vez, terão sua ação principalmente sobre as células da glia (Jayakumar; Rama Rao; Norenberg, 2015). O tratamento com amônia na cultura de ECs aumentou o estresse oxidativo, com a produção de radicais livres e óxido nítrico / *nitric oxide* [(NO) (Jayakumar *et al.*, 2012)], e a expressão do receptor do tipo toll 4 / *toll-like receptor 4* (TLR4), um receptor de membrana envolvido na cascata de sinalização inflamatória (Jayakumar *et al.*, 2014). E também em modelo experimental de rato com FHA induzido por tioacetamida (TAA), houve aumento da expressão de TLR4 nas ECs (Jayakumar *et al.*, 2014).

### 2.6.2.3 Micróglia

A micróglia é uma célula imune residente no SNC, cuja função é modular a inflamação e proteger contra patógenos. É amplamente conhecido que a micróglia desempenha importante papel na plasticidade sináptica, bem como no desenvolvimento e progressão das doenças neuropsiquiátricas (Perez-Rodriguez; Blanco-Luquin; Mendioroz, 2021).

Na neuroinflamação, a micróglia sai do estado quiescente e passa para o estado ativado, respondendo aos estímulos ambientais. O TNF pode levar à ativação microglial, que, por sua vez, promove a liberação de mediadores inflamatórios e oxidativos, amplificando a neuroinflamação. A estimulação com interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e TNF, em cultura celular de micróglia, promoveu a ativação microglial e aumentou a expressão de ciclooxigenase 2 (COX-2), TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$  (Siddiqui; Lively; Schlichter, 2016), acompanhado da elevação dos níveis do fator nuclear kB [(NF-kB) (Brás *et al.*, 2020)]. A micróglia tem importante papel sobre a modulação da plasticidade sináptica, sendo capaz de liberar, em homeostasia, fatores neurotróficos, como fator neurotrófico derivado do cérebro / *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), e citocinas neuromoduladoras. Em processos patológicos, a função fisiológica da micróglia está comprometida, e isso pode acarretar em desregulação na plasticidade sináptica e

em doenças neurodegenerativas, por exemplo, doença de Alzheimer e de Parkinson (Perez<sup>35</sup> Rodriguez; Blanco-Luquin; Mendiatoroz, 2021).

Na fisiopatologia da EH é observado que a amônia pode ativar a resposta inflamatória e estresse oxidativo e nitrosativo na micróglia (Azhari; Swain, 2018; Butterworth, 2016). Além dos mediadores inflamatórios e da amônia, leucócitos periféricos adentram o SNC e provocam a ativação da glia (Kramer *et al.*, 2019). Diversos modelos experimentais da EH como, por exemplo, EH desencadeada por FHA, FHC e hiperamonemia, mostraram ativação microglial no hipocampo e no cerebelo e consequente elevação de citocinas inflamatórias no encéfalo (Golshani *et al.*, 2019; Hernandez-Rabaza *et al.*, 2015; 2016a; 2016b). Hernandez-Rabaza *et al.* (2016a;b) registraram aumento das citocinas IL-6 e IL-1 $\beta$  e ativação microglial no hipocampo e no cerebelo de ratos com hiperamonemia induzida por dieta. Houve redução da função microglial com perfil anti-inflamatório e resolutivo no hipocampo (Hernandez-Rabaza *et al.*, 2016a) e no cerebelo (Hernandez-Rabaza *et al.*, 2016b). Muitas substâncias e fármacos com efeito anti-inflamatório reduziram a neuroinflamação e a ativação microglial em modelos experimentais de EH, bem como melhoraram a atividade e coordenação motora, a memória espacial, a habilidade de aprendizagem e provocaram o aumento do tempo para atingir o coma, dentre outros parâmetros alterados nos modelos de EH (Santos; Toscano; Rachid, 2023).

#### 2.6.2.4 Astrócitos

Os astrócitos são células da glia, os quais apresentam papel fundamental na nutrição dos neurônios, recaptação dos neurotransmissores na fenda sináptica e controle da homeostase do SNC. Expressam uma série de receptores, como os de padrões moleculares associados a danos / *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) e a patógenos / *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), receptores para citocinas, quimiocinas e neurotransmissores; portanto, o astrócito possui também atuação ampla na neuroinflamação. A astrogliose é uma reação evolutivamente conservada com papel de: aumentar a neuroproteção, limitar lesões, auxiliar na proteção da BHE e facilitar a regeneração no SNC (Verkhatsky; Nedergaard, 2018). Hoje, é conhecido que o astrócito participa ativamente no desenvolvimento e na progressão das doenças neuropsiquiátricas, sendo ainda a principal célula responsável pela neutralização da amônia no SNC (Gorg; Karababa; Haussinger, 2018). Rama Rao *et al.* (2010) apontaram que as citocinas TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ , quando adicionadas à cultura de astrócitos, provocaram edema astrocitário. A sensibilização prévia com amônia potencializou o edema astrocitário na cultura, mostrando a relação de sinergismo e potenciação da

hiperamonemia e a inflamação sobre o astrócito (Rama Rao *et al.*, 2010). O edema astrocitário prejudica a atividade normal do astrócito como, por exemplo, a recaptação de Glu na fenda sináptica, o que leva à maior atividade das vias glutamatérgicas no SNC. Estudos *post mortem* em pacientes cirróticos com EH confirmaram aumento de biomarcadores para estresse oxidativo. Nessa linha, a hiperamonemia e a neuroinflamação são capazes de induzir a formação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio nos astrócitos (Gorg *et al.*, 2010). A proteína astrogliar, S100, que pode ser detectada no soro como um indicador da lesão glial e disfunção da BHE, a depender do nível, está associada com a severidade da EH, sendo cogitada como um potencial biomarcador diagnóstico da EH (Chavarria *et al.*, 2013).

Embora o astrócito esteja envolvido na progressão da EH, ele também possui papel neuroprotetor na tentativa da redução de danos. A presença dos astrócitos em cultura de neurônios tratada com amônia reduziu a quantidade das células apoptóticas e preveniu a produção de radicais livres (Rao *et al.*, 2005).

#### 2.6.2.5 TNF e EH

O TNF é uma citocina amplamente conhecida por estar envolvida na progressão de diversas doenças neurológicas, neurodegenerativas e psiquiátricas, como, por exemplo, epilepsia, doença de Alzheimer e de Parkinson, transtorno de estresse pós-traumático, depressão, ansiedade generalizada, entre muitas outras (Blank; Prinz, 2013; Reus *et al.*, 2015). Na EH, muitos estudos mostram que o TNF pode estar aumentado tanto na periferia, quanto no SNC (Butterworth, 2016; Odeh *et al.*, 2005). Modelos experimentais da EH desencadeada por FHA e FHC apresentaram aumento dos níveis do TNF no soro e no córtex (McMillin *et al.*, 2016; 2017). Estudos comprovam que a redução ou a inibição do TNF estão relacionadas com a melhora da inflamação periférica, da neuroinflamação e dos perfis cognitivos e motores em modelos experimentais da EH (Chastre *et al.*, 2012; Dadsetan *et al.*, 2016a; 2016b).

Diversos modelos experimentais da EH indicam níveis de marcadores inflamatórios elevados, déficit cognitivo no aprendizado e na memória e redução da atividade locomotora (Faleiros *et al.*, 2014; Hernandez-Rabaza *et al.*, 2016a; 2016b; Miranda *et al.*, 2010). Drogas com efeito anti-inflamatório, direcionadas ao tratamento de outras doenças, revelaram-se capazes de melhorar danos no SNC, recuperar a capacidade cognitiva e a atividade locomotora, além de reduzir os níveis das citocinas inflamatórias, em estudos pré-clínicos da EH (Luo *et al.*, 2015). Por exemplo, o etanercepte (ETA), fármaco inibidor de TNF utilizado para o tratamento de artrite reumatoide, foi empregado em modelo experimental de camundongo com EH

desencadeada por FHA. O ETA reduziu os níveis séricos das enzimas indicadoras de lesão nos hepatócitos, ALT e AST, bem como os níveis de amônia; além de atenuar a inflamação periférica e central, reduzindo TNF e IL-6, avaliados até aproximadamente 24h após indução da FHA. No SNC, o ETA reduziu a ativação microglial, aumentou a concentração da glutatona (importante antioxidante) e prorrogou o tempo para atingir o coma, no modelo experimental de EH tipo A (Chastre *et al.*, 2012). Em modelo da EH tipo C, em rato, o emprego do infliximabe, um inibidor de TNF para o tratamento de doenças autoimunes como a artrite reumatoide, conseguiu modular a inflamação periférica e melhorar o desempenho motor e cognitivo de aprendizagem e memória, na EH tipo C em ratos (Dadsetan, *et al.*, 2016a; 2016b). O efeito do infliximabe no comportamento foi associado à modulação das vias de glutamato e ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) no hipocampo (Dadsetan *et al.*, 2016b) e no cerebelo (Dadsetan *et al.*, 2016a), respectivamente.

Os estudos sugerem uma possível relação entre o TNF e o desenvolvimento/progressão da EH (Odeh *et al.*, 2005), e a sua inibição melhora os parâmetros inflamatórios periféricos (Chastre *et al.*, 2012; Dadsetan *et al.*, 2016a; 2016b) e no SNC (Chastre *et al.*, 2012), bem como o comportamento (Dadsetan *et al.*, 2016a; 2016b) e o tempo de evolução para o coma (Chastre *et al.*, 2012).

O TNF pode apresentar-se na forma transmembrana (tmTNF) e solúvel (sTNF). Essa citocina tem seu papel biológico mediado pelos receptores transmembranas 1 (TNFR1 ou p55) e 2 (TNFR2 ou p75). O sTNF tem alta afinidade pelo TNFR1, desencadeando respostas pró-inflamatórias e de morte celular. O tmTNF liga-se aos dois receptores, sendo que, ao ativar o TNFR2, induz respostas de sobrevivência celular e citoproteção (Medler; Wajant, 2019). Embora não sejam completamente esclarecidos, diferentes papéis do TNFR têm sido relatados em doenças no SNC, como, por exemplo, o TNFR1 promoveu inflamação microglial e neurotoxicidade na desmielinização, e o TNFR2 mediou neuroproteção quando houve excitotoxicidade no modelo experimental de desmielinização inflamatória (Lu *et al.*, 2008; Wheeler *et al.*, 2006). Foi demonstrado que o aumento da expressão do precursor do TNF no cérebro é acompanhado por uma tendência a maior expressão de TNFR1 e menor expressão de TNFR2, após infarto do miocárdio em camundongos (Gouweleeuw *et al.*, 2017). Entretanto, essa correlação nem sempre é linear. O pré-tratamento com anticorpos neutralizadores do TNF foram parcialmente efetivos ou inefetivos na prevenção da necrose hepática induzida por paracetamol em camundongo. Nesse contexto, o pré-tratamento com anti-TNF, uma hora antes da FHA, não foi capaz de impedir o aumento do TNF no soro e necrose hepática induzida por paracetamol em camundongo (Simpson *et al.*, 2000). Portanto, mais estudos são necessários

#### 2.6.2.6 Mediadores inflamatórios na EH

Mediadores inflamatórios pró- e anti-inflamatórios são constantemente liberados e regulados durante a homeostase. Em uma condição patológica é comum a desregulação na liberação desses mediadores, favorecendo ou suprimindo uma doença. Por exemplo, em pacientes com FHA (Xing *et al.*, 2007), cirróticos (Kaps *et al.*, 2023) e em modelos animais (Faleiros *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2022b), é observado aumento dos mediadores pró-inflamatórios TNF, IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-12p70, sendo também observada redução de mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10 (Lima, 2019a). É importante ressaltar que a IL-10 é uma citocina amplamente conhecida por seu papel neuroprotetor e regulador no SNC, capaz de regular a liberação de mediadores inflamatórios, modular a ação microglial e favorecer a sua ação anti-inflamatória (Porro; Cianciulli; Panaro, 2020; Saraiva; Vieira; O'Garra, 2020). Adicionalmente, os níveis cerebrais da IL-10 estão reduzidos em doenças neuropsiquiátricas, como a depressão. Na EH foi observada redução nos níveis plasmáticos da IL-10, em ratos com hiperamonemia induzida por dieta (Balzano *et al.*, 2020; Malaguarnera *et al.*, 2019), e no hipocampo, em ratos com FHC induzida por TAA (Hajipour *et al.*, 2023).

As IL-6, IL-12p70 e IFN- $\gamma$  são citocinas com papel majoritariamente pró-inflamatório. A IL-6 está relacionada às doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas como, por exemplo, depressão, doença de Alzheimer e de Parkinson. Estudos indicam que pacientes cirróticos com EH manifestam aumento sérico da IL-6, e os níveis de IL-6 foram diretamente correlacionados com a gravidade da EH (Luo *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2013; Rey; Effendi-Ys, 2021). Nesse contexto, a IL-6 sérica tem sido apontada como um potencial preditor da presença da EHM (Luo *et al.*, 2012) e da EH evidente (Luo *et al.*, 2013). Em concordância, estudos sugerem uma importante participação da IL-6 em modelos experimentais de FHA e FHC com ratos e camundongos, nos quais detectou-se o aumento da IL-6 no soro, no cérebro e cerebelo (Chastre *et al.*, 2012; França *et al.*, 2019; Gamal *et al.*, 2014; Jiang; Desjardins; Butterworth, 2009; McMillin *et al.*, 2016; Opoku *et al.*, 2020).

A IL-12p70 ativa células do sistema imune inato e adaptativo, promove sua sobrevivência e realça a função dessas células como, por exemplo, induzindo a liberação de IFN- $\gamma$  e TNF (Del Vecchio *et al.*, 2007). O IFN- $\gamma$  é uma citocina liberada após insulto inflamatório, possui atividade antiviral, imunomoduladora e estimula a síntese de TNF, além de recrutar leucócitos. Ambas as citocinas são observadas aumentadas em modelo de EH induzida

por TAA (Oliveira *et al.*, 2022b), em pacientes cirróticos (Kaps *et al.*, 2023; Tilg *et al.*, 1992) e com FHA (Xing *et al.*, 2007).

A CCL2 é uma quimiocina envolvida na quimiotaxia de monócitos e produção de espécies reativas de oxigênio / *reactive oxygen species* [(ROS) (Palomino; Marti, 2015)]. Na EH há aumento da ativação da via pró-inflamatória da CCL2 por indução do TNF; adicionalmente, essa via é capaz de modular/alterar a liberação do glutamato no hipocampo e do GABA no cerebelo, culminando em prejuízos cognitivos e motores, respectivamente (Mincheva *et al.*, 2022; Okkay *et al.*, 2022). Outro importante mediador inflamatório envolvido na EH é a fractalquina, ou CX3CL1, uma quimiocina cuja ação é mediada pela ligação ao receptor CX3CR1. A ativação microglial frequentemente é modulada pela via CX3CL1/CX3CR1 (Ahn *et al.*, 2019). Fisiológica e patologicamente, a interação CX3CL1-CX3CR1 exerce um papel dual, favorecendo o desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas e do fígado, mas também pode funcionar como protetor e regulador em doenças nesses órgãos (Lee *et al.*, 2018). Mangas-Losada *et al.* (2019) mostraram que pacientes cirróticos com EHM apresentaram aumento de CX3CL1 no soro, e os pacientes que respondem ao tratamento com rifaximina têm redução nos níveis séricos de CX3CL1 (Mangas-Losada *et al.*, 2019). Ratos com FHC possuem CX3CL1 aumentados no soro, duas e quatro semanas após a indução da FHC. Foi observado também aumento de CX3CL1 nas meninges e na camada branca do cerebelo, quatro semanas após a indução da FHC. Além disso, a infiltração de linfócitos CD4<sup>+</sup> e monócitos-macrófagos nas meninges cerebelares foi mediada por CX3CL1, CCL2 e CCL20, e pelo aumento da permeabilidade da BHE (Balzano *et al.*, 2021). Entretanto, McMillin *et al.* (2016) observaram redução da expressão do receptor CX3CR1 no córtex no modelo experimental de FHA em camundongos. Adicionalmente, comprovaram que a injeção cérebro-ventricular de CX3CL1 solúvel reduziu a quantidade de IL-6, TNF, CCL2 e ativação e proliferação microglial no córtex de animais com FHA. Os animais com FHA que receberam CX3CL1 solúvel tiveram declínio cognitivo mais lento e maior tempo para chegar ao coma (McMillin *et al.*, 2016). Portanto, mais estudos são necessários para melhor compreensão das ações protetora e pró-inflamatória da CX3CL1 na síndrome EH.

No desenvolvimento e progressão da EH, nos processos inflamatórios há uma relação sobre a liberação e inibição de citocinas e quimiocinas, e o desbalanço favorece a resposta pró-inflamatória, provoca a neuroinflamação e culmina nas alterações cognitivas e motoras.

#### 2.6.2.7 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

O fator neurotrófico derivado do cérebro / *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) desempenha um papel relevante na prevenção das doenças no SNC, fisiologicamente, é essencial na plasticidade sináptica e na neurogênese (Numakawa; Odaka; Adachi, 2018). Diversos modelos experimentais animais demonstraram que o BDNF tem papel fundamental na aprendizagem e memória, e a sua redução no cérebro pode prejudicar a cognição. Além disso, a diminuição dos níveis do BDNF está associada com a progressão das doenças neurológicas, neurodegenerativas e psiquiátricas (Numakawa; Odaka; Adachi, 2018).

Modelos experimentais da EH apresentaram redução do BDNF no córtex cerebral (Ding *et al.*, 2017b; França *et al.*, 2019) e no hipocampo (Magen *et al.*, 2009, 2010). Em modelo de EHM em rato, também foi observada redução do BDNF no córtex cerebral (Ding *et al.*, 2017). França *et al.* (2019) sugerem que o aumento do comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo, em modelo experimental da EH tipo A induzida por TAA em camundongos, está associado com a redução do BDNF no córtex cerebral e com modificações morfológicas dos astrócitos e da micróglia (França *et al.*, 2019). Ademais, houve redução do BDNF no hipocampo e diminuição da função cognitiva e motora em camundongo com EH tipo A e C, após FHA induzida por TAA e ligação de ducto biliar (LDB), respectivamente (Magen *et al.*, 2009, 2010). Intervenções farmacológicas mostraram aumentar o desempenho cognitivo e os níveis do BDNF no cérebro. Após a utilização do canabidiol (CBD), os animais com LDB obtiveram melhora na função cognitiva e motora. Os autores atribuíram a melhora do desempenho comportamental ao aumento do BDNF e à redução dos níveis do TNF, expressão do TNFR1 e ativação microglial no hipocampo, após o tratamento com CBD (Magen *et al.*, 2009). O tratamento com tadalafil, fármaco inibidor da enzima fosfodiesterase 5 utilizado na clínica terapêutica para disfunção erétil, mostrou melhorar o aprendizado, a memória e a neuroplasticidade em camundongos com FHA induzida por TAA. Esses efeitos positivos foram associados ao aumento dos níveis do BDNF no córtex cerebral, bem como à redução da neuroinflamação, com a diminuição dos níveis do TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, ativação microglial e astrocitária no córtex cerebral e hipocampo (França *et al.*, 2019).

## **2.7 Modelo experimental da EH com tioacetamida (TAA)**

Modelos experimentais são capazes de mimetizar as características pertinentes a doenças e síndromes como, por exemplo, as alterações cognitivas e motoras detectadas em pacientes com EH (Lima *et al.*, 2019). Os modelos experimentais da EH utilizam principalmente ratos e camundongos machos e fêmeas induzidos(as) com FH. Em modelo de

EH tipo A, a FHA geralmente é induzida por drogas como, por exemplo, o acetaminofeno (paracetamol), azoximetano (AOM) ou TAA. O modelo de EH tipo C geralmente é desencadeado pela LDB e pelo modelo de cirrose hepática induzida por drogas, como a TAA (Lima *et al.*, 2019). Durante a FH, seja aguda ou crônica, há um comprometimento massivo do funcionamento do fígado, levando, por vezes, à morte de hepatócitos. Na FH, grande parte do parênquima hepático pode estar comprometido, reduzindo a atividade normal do fígado; isso inclui alterações no metabolismo de proteínas, carboidratos e gordura, redução da detoxificação de substâncias, hiperbilirrubinemia/icterícia, coagulopatia e inflamação. A lesão e a morte dos hepatócitos resultam no prejuízo da função hepática, levando ao excesso de substâncias tóxicas, como a amônia. Além disso, induzem o estresse oxidativo e a liberação de mediadores inflamatórios. A lesão aguda e massiva do fígado ou a descompensação da doença hepática crônica acarretam em consequências em outros órgãos como rim, coração e encéfalo [(Sepehrinezhad *et al.*, 2021) (Fig. 4)].

A TAA ( $\text{CH}_3\text{CSNH}_2$ ) é uma substância originalmente usada como fungicida em lavouras de laranja. A exposição crônica à TAA incentiva o desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular. A TAA depende da metabolização hepática, pela ação catalítica do complexo microsomal citocromo P-450, em S-dióxido de TAA, para que seu efeito seja tóxico. Esse metabólito reduz a atividade antioxidante no fígado, acentuando a peroxidação lipídica e estabelecendo uma condição de estresse oxidativo que leva à necrose celular [(Tunez *et al.*, 2005) (Fig. 4)].

A TAA induz FH e tem sido amplamente utilizada como substância indutora de FHA e FHC em modelos experimentais de EH. Ratos e camundongos com cirrose hepática e FHA induzidas por TAA mostraram aumento de ALT, AST, fosfatase alcalina, bilirrubina direta, bilirrubina total, creatinina e amônia no soro (Mendez *et al.*, 2008; Sepehrinezhad *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2013). A avaliação histopatológica do fígado em animais com cirrose induzida por TAA mostrou numerosos nódulos de diversos tamanhos, hepatite crônica em 70% dos animais, e alto grau de apoptose (Mendez *et al.*, 2008). Em modelo de FHA em ratos, a TAA induziu lesão hepática progressiva, sendo observado, 12 horas após a indução da lesão, dano hepático leve com degeneração hidrópica e presença de infiltrado de monócitos, especialmente próximo à veia central. Ao longo do tempo o dano hepático tornou-se mais evidente. Vinte e quatro horas após a indução da FHA, detectaram-se necrose focal intensa, inflamação e presença de degeneração nos hepatócitos mais intensa e difusa. Trinta e seis horas após a indução com TAA, a arquitetura inicial do fígado, próximo à veia central, é completamente perdida, com infiltrado inflamatório no tecido lesionado e degeneração intensa e pronunciada (El Khiat *et al.*, 2019).

Em modelo experimental de EHM, desencadeada por FHA induzida por TAA em ratos, 21 dias após a indução (d.p.i.), a histopatologia mostrou alteração hepatotóxica moderada, com numerosos hepatócitos com núcleo dilatado, sendo que poucos sofreram degeneração vacuolar. Na microscopia eletrônica foi possível constatar acumulação de gotas de lipídeo nos hepatócitos (Hilgier *et al.*, 1999). Em suma, a TAA é capaz de induzir FH em diversos modelos experimentais, causando dano hepático considerável.

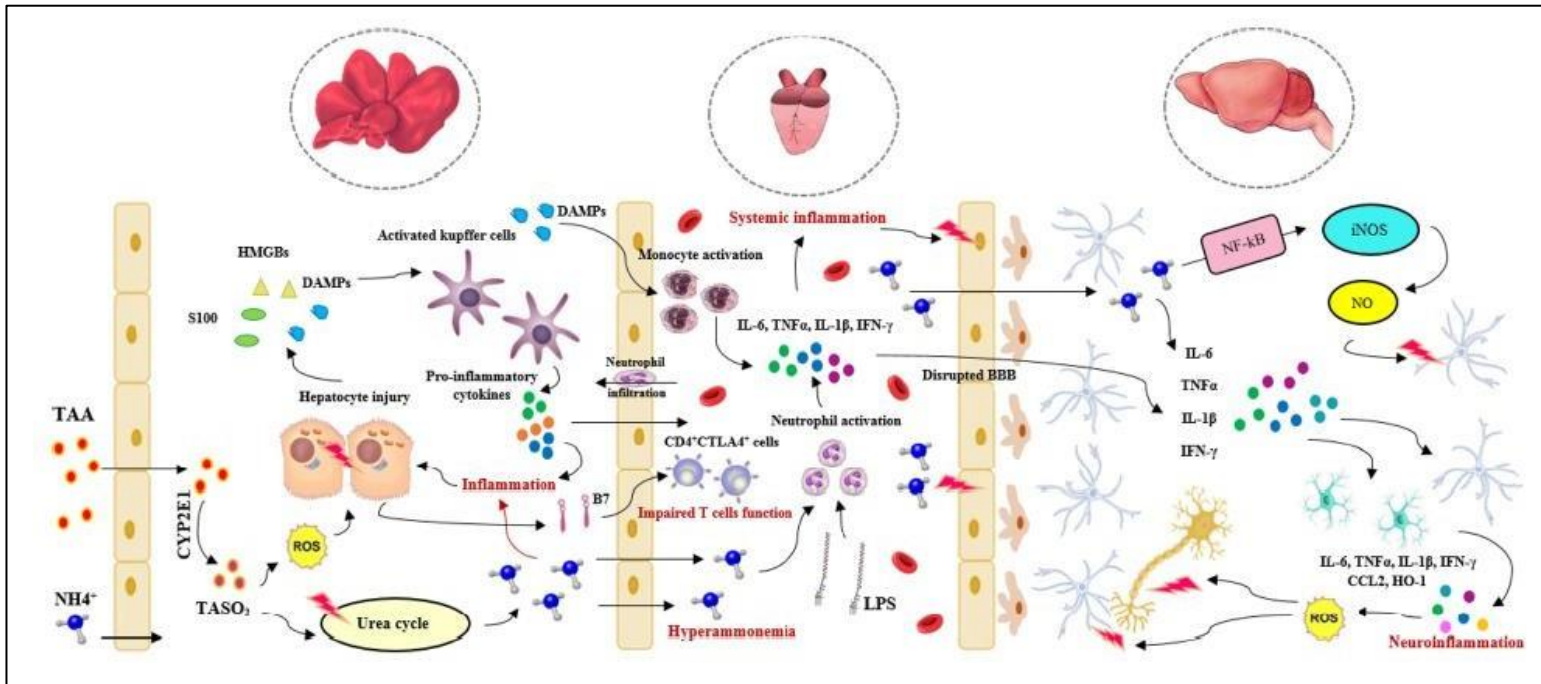
As avaliações cognitivas e comportamentais em ratos e camundongos com cirrose ou FHA induzidas por TAA mostraram redução da atividade locomotora e déficit no aprendizado e memória espacial, bem como aumento do comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo (El Khiat *et al.*, 2019; França *et al.*, 2019; Jiao *et al.*, 2021; Lima, 2019; Mendez *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2010). Além das alterações comportamentais, esses modelos levaram a alterações no SNC. Os animais com cirrose induzida pelo consumo crônico de TAA, diluída na água durante 12 semanas, acusaram presença de astrócitos Alzheimer do tipo II no hipocampo e nos corpos mamilares, os quais se localizam na parte posterior do hipotálamo e estão envolvidos com aprendizado e memória (Mendez *et al.*, 2008).

Camundongos com FHC desenvolveram aumento da ativação astrocitária e microglial, elevação dos níveis do TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, degeneração sináptica e redução de neurônios e BDNF no córtex e no hipocampo, 19 d.p.i. da FH com TAA (França *et al.*, 2019). Também foi observada necrose neuronal e ativação astrocitária no estriado de ratos com EHM, 21 d.p.i. da FH por TAA (Hilgier *et al.*, 1999).

Nosso grupo de pesquisa (Neuropatologia Translacional) vem estudando os aspectos clínicos, patológicos e inflamatórios da EH tipo A induzida por TAA em camundongos (Faleiros *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2010). O modelo da EH utilizado no presente trabalho foi por FHA, induzida por TAA em dose única de 600 mg/kg, injetada por via intraperitoneal (i.p.), em camundongo. Nesse modelo de EH do tipo A houve aumento das enzimas hepáticas ALT e AST (Miranda *et al.*, 2010), hiperamonemia, inflamação e lesão hepática (Faleiros *et al.*, 2014), 24 horas após a indução da EH. No SNC, animais administrados com TAA mostraram edema, alterações morfológicas nos astrócitos e nas células endoteliais cerebrais (Faleiros *et al.*, 2014), aumento de Glu e déficit cognitivo (Miranda *et al.*, 2010). Recentemente, constatou-se que os animais com EH induzida por TAA exibiram comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo semelhante em humanos, somado às alterações morfológicas dos astrócitos e da micróglia e à redução da expressão do BDNF no córtex cerebral (Lima, 2019). Nesse modelo, as alterações comportamentais e cognitivas, principalmente quanto à memória, ainda não foram completamente caracterizadas. Portanto, este presente estudo teve por um dos objetivos

contribuir com a compreensão das alterações comportamentais cognitivas da memória e da atividade locomotora na EH tipo A, associadas às lesões histopatológicas, bem como ao perfil inflamatório da EH nesse modelo.

**Figura 4 - Encefalopatia hepática induzida por tioacetamida**



A injeção intraperitoneal de tioacetamida leva à lesão hepática pelo aumento da produção do estresse oxidativo e inflamação. Com a disfunção hepática, o fígado não consegue eliminar as toxinas da circulação, como a amônia. Esses agentes produzem inflamação sistêmica através da ativação de células do sistema imune periférico, como monócitos e neutrófilos circulantes. A amônia e outros agentes tóxicos atingem o SNC e causam alterações patológicas como a neuroinflamação, gliopatia, neuropatia, edema cerebral, hipertensão intracraniana e herniação cerebral. BBB: barreira hematoencefálica; B7: moléculas B7; CCL2: quimiocina ligante 2; CTLA4: proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico; CYP2E1: citocromo P450 família 2 subfamília E membro 1; DAMPs: danos associados a padrões moleculares; HMGBs: proteínas de caixa de grupo de alta mobilidade; HO-1: heme oxigenase 1; IFN- $\gamma$ : interferon  $\gamma$ ; IL: interleucina; iNOS: óxido nítrico sintetase induzível; LPS: lipopolissacarídeos; NH $_4^+$ : amônio; NF- $\kappa$ B: fator nuclear  $\kappa$ B; NO: óxido nítrico; ROS: espécie reativa de oxigênio; S100: proteína S100; TAA: tioacetamida; TASO $_2$ : sulfóxido de tioacetamida; TNF: fator de necrose tumoral. Fonte: Sepehrinezhad *et al.* (2021).

### 3 JUSTIFICATIVA

A EH é uma síndrome debilitante que reduz a qualidade de vida e aumenta a necessidade de hospitalizações para o paciente com doença hepática. O tratamento é escasso, de baixa eficácia e pouca adesão. Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento e progressão da EH ainda não foram totalmente esclarecidos. Em especial, evidências sobre a participação do TNF e seus receptores na neuroinflamação ou neuroproteção durante a EH por TAA são igualmente escassos. Nesse cenário, estudos abordando aspectos da EH, como

alterações cognitivas e motoras e a neuroinflamação, tornam-se essenciais. Considerando que<sup>44</sup> o TNF é uma citocina central na fisiopatologia da EH, o entendimento da relação desta citocina com os seus receptores fornece dados úteis ao desenvolvimento de novos e mais eficientes alvos terapêuticos para o tratamento desta síndrome neurológica.

O objetivo do presente estudo é investigar a EH experimental induzida por tioacetamida sobre a avaliação dos parâmetros comportamentais, patológicos e neuroinflamatórios em camundongos C57BL/6 selvagens / *wild type* (WT) e deficientes para o receptor 1 do TNF (TNFR1<sup>-/-</sup>).

Para melhor compreensão, o trabalho desenvolvido será apresentado em dois capítulos. No Capítulo 1, serão abordados os testes comportamentais e a histopatologia na EH ao longo do tempo, utilizando camundongos C57BL/6 WT. No Capítulo 2, será abordada a avaliação da atividade locomotora e a neuroinflamação na EH em camundongos WT e TNFR1<sup>-/-</sup>.

Este capítulo discorrerá sobre os experimentos realizados com camundongos fêmeas submetidos à EH da linhagem C57BL/6 WT, onde o principal objetivo foi avaliar a atividade locomotora, a memória e as alterações histopatológicas no encéfalo e no fígado.

## **5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Em camundongos C57BL/6 WT dos grupos controle e submetidos à EH induzida por TAA:

- a) Avaliar as alterações comportamentais da atividade locomotora no teste de campo aberto ao longo do tempo;
- b) Avaliar os parâmetros associados à memória no teste de reconhecimento de novo objeto, teste do labirinto em Y e teste de Barnes;
- c) Descrever as alterações histopatológicas no encéfalo e no fígado.

### 6.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas entre 8-12 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos com ração e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro-escuro de 12h, no Laboratório Conceição Machado do Departamento de Morfologia, do ICB da UFMG. Todos os procedimentos deste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob o protocolo 393/2017.

### 6.2 Indução da lesão hepática aguda

Todo o procedimento da indução da lesão hepática aguda (LHA) foi realizado segundo o protocolo em Miranda *et al.* (2010) e Faleiros *et al.* (2014), descrito a seguir. A LHA foi induzida a partir de uma injeção única de TAA (*Sigma-Aldrich*®, St. Louis, EUA) por via i.p. na dose de 600 mg/kg no volume de 200 µl. O cálculo foi feito com base no peso médio dos animais. A TAA foi pesada e diluída em salina estéril. Devido à toxicidade da droga, esse processo foi realizado em capela de exaustão de gases. Após a diluição a droga foi brevemente homogeneizada e administrada nos animais. Imediatamente após a injeção de TAA por via i.p., os animais receberam 500 µl de solução de glicose 5% (*Ecoflac plus*®) por via subcutânea, para evitar hipoglicemia e desidratação. Para evitar hipotermia, os animais foram mantidos em uma caixa aquecida por uma manta térmica durante duas horas e, subsequentemente, colocados na caixa de origem e levados à raque de armazenamento. Os animais foram frequentemente monitorados durante aproximadamente seis horas após a injeção com a TAA. Os animais controles foram expostos aos mesmos procedimentos, exceto a injeção de TAA. Nesse caso, receberam injeção i.p. de salina estéril no mesmo volume, 200 µl (Faleiros *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2010).

**Quadro 2 - Grupo experimental 1**

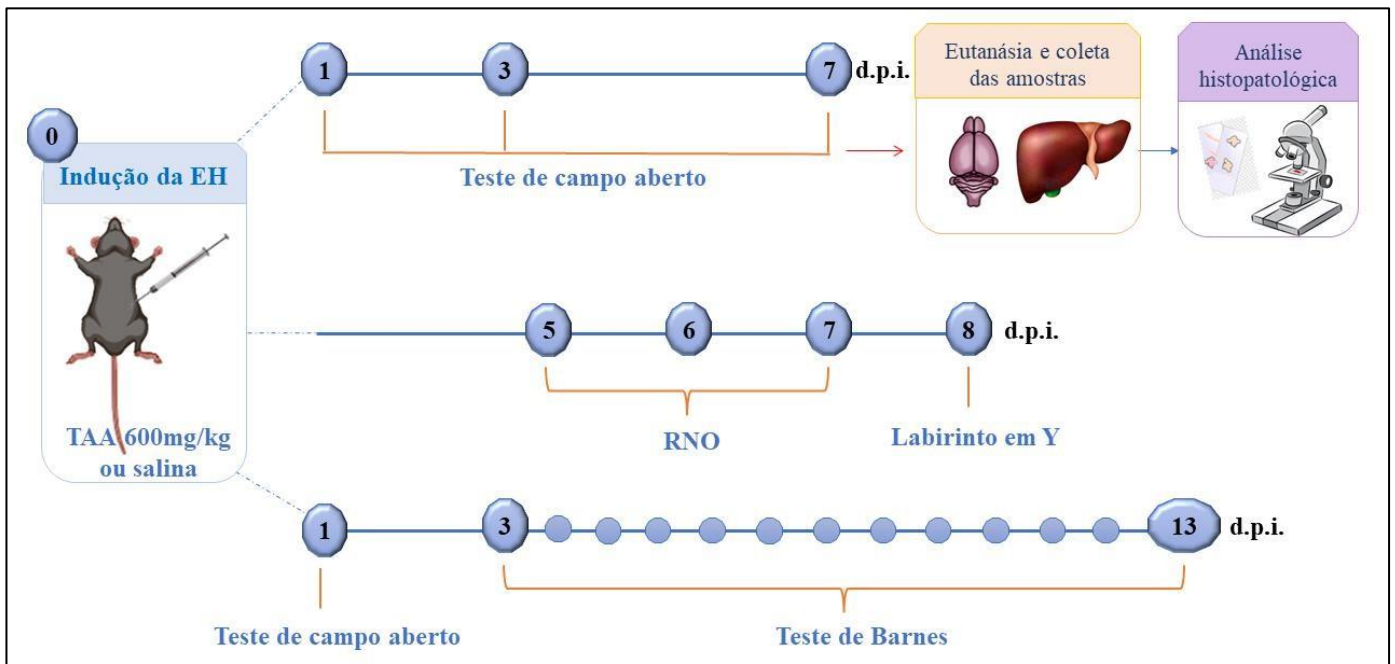
Nome	Grupo
Controle	Animal selvagem que recebeu salina
EH	Animal selvagem submetido à LHA por TAA

Nome dos grupos experimentais e seus correspondentes. EH: encefalopatia hepática; LHA: lesão hepática aguda; TAA: tioacetamida. Fonte: elaborado pela autora.

### 6.3 Delineamento experimental

Os períodos avaliados foram selecionados baseados em estudos prévios que mostraram alterações neurológicas e neuroinflamatórias 24, 36 e 48 horas após a exposição à TAA (Faleiros *et al.*, 2014) e déficits cognitivos 8 d.p.i. da lesão hepática (Avraham *et al.*, 2011). A indução da LHA foi realizada no dia zero (Dia 0). No 1º experimento o teste de campo aberto foi praticado no 1º, 3º e 7º d.p.i. No 7º d.p.i. os animais foram eutanasiados e coletadas as amostras do fígado e do encéfalo para análise histopatológica. No 2º experimento, após a indução da EH foram realizados os testes de RNO, do 5º ao 7º d.p.i., e o labirinto em Y no 8º d.p.i. No 3º experimento, foi realizado o teste de campo aberto no 1º d.p.i. e o teste de Barnes, do 3º ao 13º d.p.i. (Fig. 5).

**Figura 5 - Delineamento experimental 1**



Dia 0 – Indução da LHA. 1º experimento: 1, 3 e 7 d.p.i. foi realizado o teste de campo aberto, em seguida foram coletadas amostras do encéfalo e fígado para análise histopatológica. 2º experimento: foram aplicados os testes de RNO nos 5, 6 e 7 d.p.i. e o labirinto em Y no dia 8. 3º experimento: foi realizado o teste de campo aberto no 1º d.p.i. e o teste de Barnes, do 3º ao 13º d.p.i. d.p.i.: dia pós indução; LHA: lesão hepática aguda; RNO: teste de reconhecimento de novo objeto. Fonte: elaborado pela autora com imagens liberadas e autorizadas para uso pelo Google e/ou feitas pelo artista Sketch Lanza.

### 6.4 Testes comportamentais

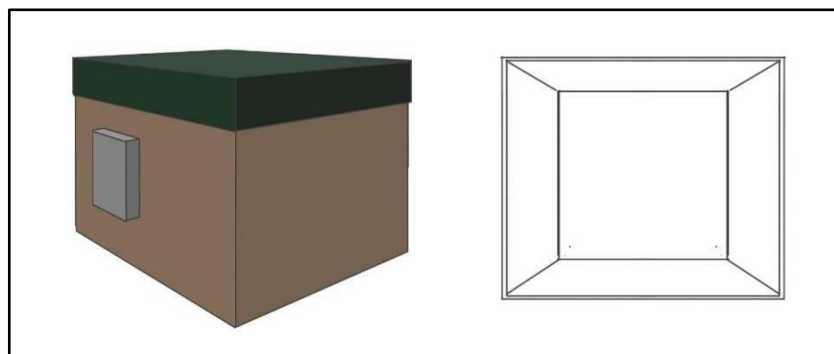
Todos os animais foram conduzidos ao local do experimento para ambientação uma hora antes dos testes a fim de minimizar os efeitos da transferência de ambiente sobre o resultado no

teste comportamental. Após a avaliação de cada animal os aparatos foram devidamente higienizados com álcool 70% para evitar a influência de odores durante o teste (Takahashi *et al.*, 2006). O protocolo de cada teste comportamental será detalhado a seguir.

#### 6.4.1 Teste de campo aberto

O teste de campo aberto foi realizado no 1º, 3º e 7º d.p.i., e no 5º d.p.i. para a habituação ao aparato durante o teste de reconhecimento do novo objeto, (n=7-8 animais/grupo). O aparato do teste de campo aberto (*Insight*®, SP, Brasil) consiste em uma caixa quadrada com dimensões 30x30x30cm, com as paredes opacas e uma abertura manual na parte frontal do aparato. O teto é completamente fechado com a câmera acoplada ligada diretamente ao *software Phenotype*®, que permite a filmagem e a geração dos dados do teste, neste caso, a distância total percorrida pelo animal na caixa (cm) durante 30 minutos (Fig. 6). Para iniciar o experimento, cada camundongo foi colocado no aparato pela abertura manual na porção dianteira do aparato. O animal pôde mover-se livremente durante 30 minutos (Miranda *et al.*, 2010; Faleiros *et al.*, 2014). Em seguida, o animal foi retirado do aparato de experimentação e colocado em sua caixa de armazenamento. O aparato foi limpo com álcool 70% e seco antes da entrada e após a retirada de cada animal.

**Figura 6 – Desenho representativo do aparato do teste de campo**



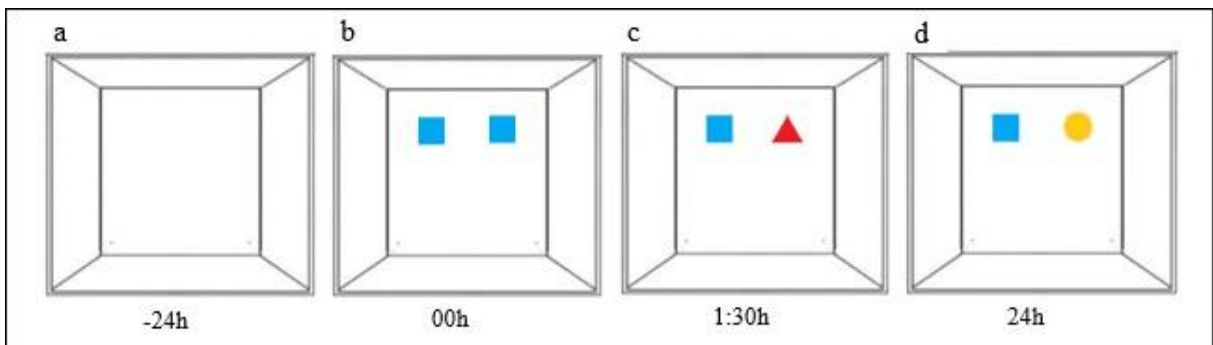
Visão frontal (esquerda) e visão superior do interior da caixa (direita). Fonte: ilustrado pelo artista Sketch Lanza.

#### 6.4.2 Teste de Reconhecimento de Novo Objeto

O teste de reconhecimento de novo objeto (RNO) foi executado seguindo o protocolo descrito em Miranda *et al.* (2017) (n=7-8 animais/grupo). O teste RNO foi desempenhado no mesmo aparato do teste de campo aberto e iniciou-se no 5º d.p.i., onde foi realizada a habituação, aplicando o mesmo protocolo do teste de campo aberto, o qual o animal pôde mover-se livremente na caixa durante 30 minutos (Fig. 7a). No 6º d.p.i. o animal foi colocado

no mesmo aparato, nesta fase, contendo dois objetos – cubos azuis – iguais em forma, tamanho e cor (objeto A': □ e A'': □), e pôde explorar o ambiente e os objetos por 5 minutos (Fig. 7b). No mesmo dia, 1 hora e 30 minutos depois do primeiro teste, foi avaliada a memória de curta duração, onde o animal explorou novamente o ambiente na presença do objeto familiar (A': □) – cubo azul – e substituindo o objeto A'' foi colocado um novo objeto (B: ▲) diferente em forma e cor – pirâmide vermelha (Fig. 7c). No dia seguinte (7º d.p.i.), foi avaliada a memória de longa duração, para isto o mesmo procedimento foi realizado, sendo que o objeto B foi substituído pelo objeto C (●) – cilindro amarelo – com forma e cor diferentes dos objetos A'' e B (Fig. 7d). O tempo de exploração de cada objeto foi registrado em todas as etapas pelo *software Phenotype®*. A contabilização do tempo em cada objeto foi realizada manualmente de forma cega para a avaliadora. O tempo de exploração foi considerado a soma do tempo explorando cada objeto (novo + familiar). O índice de reconhecimento foi calculado a partir do: [tempo gasto para explorar o novo objeto dividido pelo tempo gasto na exploração total dos objetos (novo e familiar) multiplicado por 100 [novo / (novo + familiar) x 100]. Foi considerada a exploração do objeto pelo animal qualquer contato físico (tocar o objeto com o nariz ou patas) ou orientação óbvia para o objeto a uma distância de 3 cm (Desruisseaux *et al.*, 2008).

**Figura 7 - Desenho representativo do aparato do teste de reconhecimento de novo objeto**



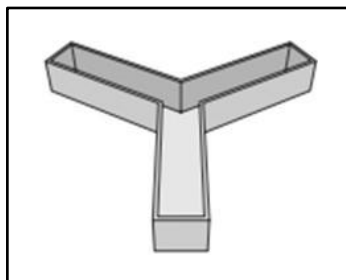
O teste foi realizado no aparato do teste de campo aberto representado com a caixa vazia (a). Apresentação aos objetos A' e A'': dois cubos azuis (b). Organização do aparato para avaliação da memória de curta duração: objeto familiar A' – cubo azul, e novo objeto B – pirâmide vermelha (c). Organização do aparato para avaliação da memória de longa duração: objeto familiar A' – cubo azul, e novo objeto C – cilindro amarelo (d). Fonte: elaborado pela autora com ilustração doada pelo artista Sketch Lanza.

#### 6.4.3 Teste do labirinto em Y

No 8º d.p.i., o teste de labirinto em Y foi realizado em um aparato de acrílico opaco em forma de Y, no qual as plataformas (braços) são fechadas lateralmente formando um labirinto [(Fig. 8) (n=7-8 animais/grupo)]. Iniciado o teste, o animal foi colocado em um dos braços onde pôde mover-se livremente durante 5 minutos. Ao final do teste, o animal foi removido do

aparato e colocado em sua caixa de armazenamento. O experimento foi filmado por uma *webcam*, e foi avaliada, manualmente e de forma cega para a avaliadora, a entrada completa nos braços. Essa entrada foi considerada quando o animal avançou com as quatro patas para o interior do braço. Em seguida, foi avaliada a alternância de entrada nos braços, a qual foi definida pelas entradas consecutivas nos três braços (ex.: ABC, BCA, CBA, etc). A porcentagem de alternância foi calculada pela fórmula  $[(n^\circ \text{ total de alternância} / n^\circ \text{ total de entradas} - 2) \times 100]$  (Salari *et al.*, 2018).

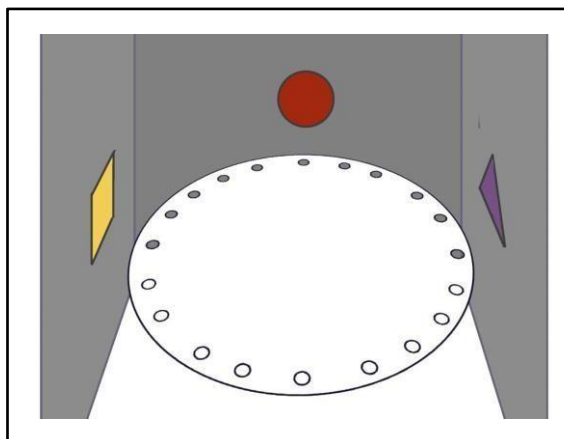
**Figura 8 - Desenho representativo do aparato do teste do labirinto em Y**



Plataforma em forma de Y com as laterais fechadas. Fonte: Wijnen, Genzel e Meij (2024).

#### 6.4.4 Teste de Barnes

O teste de Barnes foi iniciado no 3º d.p.i. da LHA, tendo duração de 11 dias consecutivos [(n=15 animais/grupo) (Pitts, 2018)]. O aparato consiste em uma plataforma redonda de acrílico branco fosco, com 122 cm de diâmetro. Na porção periférica da plataforma, circundando o aparato, estão contidos 20 círculos vazados de 5 cm de diâmetro cada um. Em um dos círculos pequenos, é acoplada uma caixa de escape preta. A plataforma fica apoiada a 40 cm de altura do chão. A sala de experimentação foi sistematicamente organizada com um pano de fundo preto em forma de “U” em torno do aparato, com três pistas ambientais fixadas, a saber: um quadrado amarelo, um círculo vermelho e um triângulo roxo (Fig. 9).



Sala organizada com fundo preto e com as pistas ambientais sistematicamente fixadas: quadrado (esquerda), círculo vermelho (a frente) e triângulo roxo (direita). Aparato do teste de Barnes ao centro: plataforma redonda com círculos vazados circundando a periferia. Fonte: ilustração do artista Sketch Lanza.

#### 6.4.4.1 Teste de Barnes: habituação e treino

No 3º d.p.i., foi feita uma habituação e um treino. Para habituação do animal no aparato, o mesmo foi colocado em um cilindro completamente escuro e posicionado na plataforma no quadrante inferior esquerdo do aparato, durante 15 segundos. Em seguida, o cilindro foi retirado e o animal foi guiado a um círculo específico da periferia (o único que apresentava a caixa preta acoplada). Então, o animal foi guiado pela cauda a entrar na caixa de escape, onde permaneceu durante um minuto. O animal foi retirado e colocado novamente no cilindro posicionado no centro do aparato por 15 segundos. Foi retirado o cilindro e o animal explorou o aparato durante cinco minutos. Em seguida, foi colocado em sua caixa de armazenamento e mantido na sala de teste até o final do experimento.

Após a habituação de todos os animais, os mesmos foram submetidos ao treino, ainda no 3º d.p.i. A caixa de escape foi disposta em outra posição do aparato, em frente à pista 'triângulo roxo'. Para realizar o treino, o animal foi colocado na posição inicial, no quadrante inferior esquerdo, dentro do cilindro preto por 15 segundos e em seguida foi retirado o cilindro. Então, o animal pôde explorar o aparato durante três minutos. Ao final desse tempo, se o animal não entrou na caixa de escape, a experimentadora o guiou a entrar na caixa, onde o animal permaneceu por 15 segundos. Caso o animal tenha entrado na caixa de escape ao final do treino, a experimentadora apenas o voltava para a caixa de armazenamento. A experimentadora permaneceu na sala de teste apenas durante a limpeza, manipulação direta do animal e nos 15 segundos que o animal ficou no cilindro preto. Do 4º ao 12º d.p.i., os animais foram expostos a dois treinos diários de três minutos cada.

No 13º d.p.i., foi realizado o teste, a caixa de escape acoplada ao aparato durante o treino foi removida. Os animais foram colocados no centro da plataforma dentro do cilindro preto por 15 segundos. Imediatamente, o cilindro foi retirado e o animal pôde explorar a plataforma durante um minuto. Foi contabilizada a latência, ou seja, o tempo que o animal demorou para chegar ao círculo correto, que continha a caixa de escape durante os treinos (Tachiki *et al.*, 2023). Para obtenção dos dados, foi acoplada uma *webcam* acima do aparato, que filmou toda movimentação do animal na plataforma. A *webcam* foi ligada ao *software Phenotype®*, pelo qual foi gravado e obtidos os dados do experimento.

## 6.5 Eutanásia e armazenamento das amostras

No 7º d.p.i. os animais foram eutanasiados com uma sobredose de xilazina (10mg/kg) e cetamina (80 mg/kg) via i.p. Após completa ausência de estímulos dolorosos, foram coletadas as amostras de sangue, fígado e encéfalo. As amostras de sangue foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 min e em seguida o soro foi armazenado a -70°C para futuras análises bioquímicas. Fragmentos do fígado foram dissecados para as análises histopatológicas. Além disso, as amostras do encéfalo foram dissecadas em hemisfério esquerdo, direcionado para análise histopatológica, e em hemisfério direito, para futuras análises bioquímicas. Todas as amostras encaminhadas a histopatologia foram fixadas em formol 10% tamponado, enquanto as amostras para as análises bioquímicas foram armazenadas em *freezer* -70°C.

## 6.6 Análise histopatológica do encéfalo e do fígado

Amostras do fígado e do encéfalo foram coletas no 7º d.p.i. Para análise histopatológica, o hemisfério esquerdo do encéfalo foi inteiramente imerso em formol 10% tamponado para fixação durante sete dias. Após esse período, o mesmo foi seccionado utilizando-se uma matriz de 2 mm de espessura manufaturada pela Dra. Edna Constanza Gómez Victoria. Em seguida, as amostras do encéfalo foram novamente imersas em formol 10% tamponado. Além do encéfalo, fragmentos dos lobos hepáticos foram fixados em formol 10% tamponado. Para a obtenção das lâminas histológicas, as amostras fixadas do encéfalo e do fígado foram desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. As amostras incluídas em parafina foram cortadas em micrótomo com secções de 4 µm de espessura e em seguida foram confeccionadas as lâminas histológicas.

As lâminas do encéfalo e do fígado foram coradas por hematoxilina e eosina (H&E).<sup>54</sup> A visualização dos cortes foi realizada no microscópio óptico BX41 *Olympus*® e as imagens foram obtidas utilizando a câmera *Moticam 2500*® e o *software Motic Image Plus 2.0ML*®.

## **6.7 Análises estatísticas**

Todos os dados quantitativos foram analisados utilizando o *software Prism Graph* versão 8.0.1®. O teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov* foi aplicado para avaliar a normalidade dos dados. Para análise de comparação entre dois grupos com distribuição normal, utilizou-se teste t de *Student*. Para dois grupos com dados de distribuição não paramétrica, utilizou-se o teste *Mann-Whitney U*. Para análise de mais de dois grupos foi utilizado teste ANOVA de uma via, seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey*, e no teste de campo aberto para a comparação entre os grupos em cada dia foi utilizado o pós teste de *Bonferroni*. A diferença entre os grupos foi considerada estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$  em análises bicaudais. Os dados foram expressos como média  $\pm$  o erro padrão da média.

Neste capítulo serão abordados os experimentos realizados com os camundongos machos submetidos à EH da linhagem C57BL/6 WT e TNFR1<sup>-/-</sup>, onde o principal objetivo foi avaliar a atividade locomotora, o perfil neuroinflamatório na EH e o efeito da ausência do TNFR1 sobre esses parâmetros.

## **7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Após 24h da indução da LHA induzida por TAA, em camundongos C57BL/6 WT e TNFR1<sup>-/-</sup> dos grupos controle e submetidos à EH:

- a) Avaliar a atividade locomotora pelo teste de campo aberto;
- b) Quantificar os níveis das citocinas TNF, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 e IL-12p70 no córtex pré-frontal e no hipocampo;
- c) Avaliar a concentração das quimiocinas CCL2 e CX3CL1 no córtex pré-frontal e no hipocampo;
- d) Investigar os níveis do BDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo.

### 8.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, entre 8-12 semanas de idade, provenientes do CEBIO do ICB da UFMG. E camundongos C57BL/6 machos deficientes para o receptor 1 do TNF (TNFR1<sup>-/-</sup>) obtidos do Laboratório de Gnotobiologia do ICB da UFMG. Os animais foram mantidos com ração e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro-escuro de 12h, no Laboratório Conceição Machado do Departamento de Morfologia, do ICB da UFMG. Todos os procedimentos deste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob o protocolo 341/2018.

### 8.2 Indução da lesão hepática aguda

Todo o procedimento da indução da LHA foi realizado segundo o protocolo de Miranda *et al.* (2010) e Faleiros *et al.* (2014), como descrito no capítulo 1 no tópico “6.2 Indução da lesão hepática aguda”.

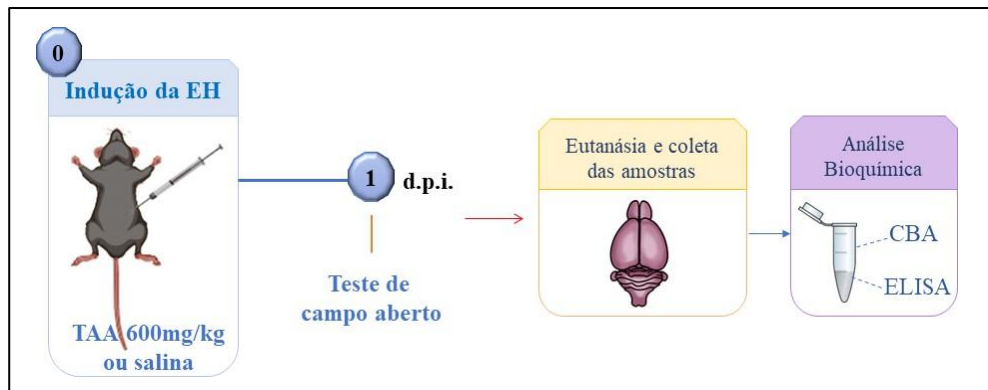
**Quadro 3 - Grupo experimental 2**

Sigla	Grupo
Controle	Animal selvagem que recebeu salina
EH-WT	Animal selvagem submetido à LHA por TAA
EH-TNFR1 <sup>-/-</sup>	Animal deficiente para o TNFR1 submetido à LHA por TAA

Nome dos grupos experimentais e seus correspondentes: Controle; EH: encefalopatia hepática; LHA: lesão hepática aguda; TAA: tioacetamida; TNFR1<sup>-/-</sup>: camundongo deficiente para o receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNF); WT: *wild-type* – camundongo selvagem.

### 8.3 Delineamento experimental

No dia zero a indução da EH por LHA foi realizada por uma injeção única de TAA a 600 mg/kg por via i.p., o grupo controle recebeu salina i.p. No dia seguinte, 1º d.p.i., foi realizado o teste de campo aberto e em seguida os animais foram eutanasiados, imediatamente foram coletadas amostras do córtex pré-frontal e do hipocampo para análises bioquímicas dos mediadores inflamatórios e do BDNF, pelas técnicas de *Cytometric Bead Array* (CBA) ou *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* [(ELISA) (Fig. 18)].



Dia 0: indução da EH por LHA. 1 d.p.i.: foi realizado o teste de campo aberto e em seguida os animais foram eutanasiados e coletadas amostras dos cérebros para análises bioquímicas pelas técnicas de CBA e ELISA. CBA: *Cytometric Bead Array*; d.p.i.: dia após indução; ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; EH: encefalopatia hepática; LHA: lesão hepática aguda; TAA: tioacetamida. Fonte: elaborado pela autora com imagens liberadas e autorizadas para uso pelo Google e/ou feitas pelo artista Sketch Lanza.

#### 8.4 Teste de campo aberto

O teste de campo aberto foi realizado no 1º d.p.i. O protocolo foi realizado como descrito no capítulo 1, no tópico “6.4.1 Teste de campo aberto”. A atividade locomotora foi avaliada pela distância total percorrida durante 30 minutos [(Miranda *et al.*, 2010; Faleiros *et al.*, 2014) (Fig. 6)].

#### 8.5 Eutanásia e armazenamento das amostras

No 1º d.p.i. os animais foram eutanasiados com uma sobredose i.p. de cetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg). Após completa ausência de estímulos dolorosos, foram coletadas as amostras de córtex pré-frontal e hipocampo, armazenadas em *freezer* -70°C para as análises bioquímicas.

#### 8.6 Análise das citocinas por CBA no córtex pré-frontal e no hipocampo

Para realização da técnica de *Cytometric Bread Assay* (CBA), as amostras foram homogeneizadas em uma solução de extração tampão fosfato-salino / *phosphate buffered saline* (PBS) contendo um coquetel inibidor de protease. Subsequentemente, os lisados foram centrifugados a 13000 rpm por 10 min a 4°C, e o sobrenadante foi estocado a -70°C. Os níveis do TNF, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12p70 e CCL2 foram quantificados utilizando o kit de *BD™ CBA Mouse Inflammation®* (*BD Biosciences*, San Diego, CA) de acordo com as instruções do fabricante, e analisados por citometria de fluxo pelo aparelho *FACSCalibur®* [(*Becton*

### **8.7 Avaliação dos níveis da CX3CL1 e do BDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo por ELISA**

As amostras do córtex pré-frontal e hipocampo de cada animal foram pesadas e maceradas individualmente usando um tampão de lise com o auxílio de um sonificador. As amostras foram homogeneizadas em uma solução de extração (100 mg de tecido por milímetro) contendo 0,4M NaCl, 0,05% *Tween* 20, 0,5% BSA, 0,1mM fluoreto de fenil-metilsulfonil, 0,1mM cloreto de benzetionio, 10mM EDTA e 20 KIU de aprotinina usando *Ultra-Turrax*®. Os lisados foram centrifugados a 14000 rpm por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e estocado a -70°C. As concentrações da CX3CL1 e do BDNF foram determinadas por imunoabsorção enzimática [ELISA (*R&D Systems*, Minneapolis, MN)], de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram expressos em picogramas por 100 mg de tecido (Oliveira *et al.*, 2022b).

### **8.8 Análises estatísticas**

Todos os dados foram analisados pelo *software Prism Graph* versão 8.0.1®. A análise estatística foi realizada utilizando teste ANOVA de uma via, seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey*. Os dados foram expressos como média  $\pm$  o erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi considerada estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$  em análises bicaudais.

## **9 CONCLUSÃO**

A tioacetamida na dose única de 600 mg/kg foi capaz de induzir déficits locomotores em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas. Sugere-se a participação parcial do TNFR1 no controle da neuroinflamação e conseqüentemente na atividade locomotora nos estágios iniciais da encefalopatia hepática induzida por tioacetamida em camundongos.

- AFIFI, N. A. *et al.* Synergistic effect of aminoguanidine and L-carnosine against thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in rats: behavioral, biochemical and ultrastructural evidences. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 99, n. 3, p. 332-347, mar., 2021. doi:10.1139/cjpp-2020-0212
- AHN, J. H. *et al.* Expression changes of CX3CL1 and CX3CR1 proteins in the hippocampal CA1 field of the gerbil following transient global cerebral ischemia. **Int. J. Mol. Med.**, v. 44, n. 3, p. 939-948, 2019. doi:10.3892/ijmm.2019.4273
- AMODIO, P. Hepatic encephalopathy: diagnosis and management. **Liver Int.**, v. 38, n. 6, p. 966-975, 2018. doi:10.1111/liv.13752
- APELQVIST, G. *et al.* Altered adaptive behaviour expressed in an open-field paradigm in experimental hepatic encephalopathy. **Behavioural Brain Research.**, v. 106, p. 165-173, 1999. doi:10.1016/s0166-4328(99)00104-7
- ATTAR, A. *et al.* G. A shortened Barnes maze protocol reveals memory deficits at 4-months of age in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **PLoS One.**, Nov 13; 8(11):e80355, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0080355. PMID: 24236177
- AVRAHAM, Y. *et al.* Cannabinoids and capsaicin improve liver function following thioacetamide-Induced acute injury in mice. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 103, n. 12, p. 3047-56, 2008. doi:10.1111/j.1572-0241.2008.02155.x.
- AZHARI, H.; SWAIN, M. G. Role of peripheral inflammation in hepatic encephalopathy. **J. Clin. Exp. Hepatol.**, v. 8, n. 3, p. 281-285, 2018. doi:10.1016/j.jceh.2018.06.008
- BAEK, S. Y. *et al.* Network pharmacology-based approaches of *Rheum undulatum* Linne and *Glycyrriza uralensis* Fischer imply their regulation of liver failure with hepatic encephalopathy in mice. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, 2020. doi:10.3390/biom10030437
- BAJAJ, J. S. Hepatic encephalopathy: classification and treatment. **J. Hepatol.**, v. 68, n. 4, p. 838-839, 2018. doi:10.1016/j.jhep.2017.11.005
- BAJAJ, J. S. *et al.* The multi-dimensional burden of cirrhosis and hepatic encephalopathy on patients and caregivers. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 106, n. 9, p. 1646-1653, 2011. doi:10.1038/ajg.2011.157
- BALZANO, T. *et al.* The cerebellum of patients with steatohepatitis shows lymphocyte infiltration, microglial activation and loss of purkinje and granular neurons. **Sci. Rep.**, v. 8, n. 1, p. 3004, 2018. doi:10.1038/s41598-018-21399-6
- BALZANO, T. *et al.* Chronic hyperammonemia induces peripheral inflammation that leads to cognitive impairment in rats: reversed by anti-TNF-alpha treatment. **J. Hepatol.**, v. 73, n. 3, p. 582-592, 2020. doi:10.1016/j.jhep.2019.01.008
- BALZANO, T. *et al.* Rifaximin prevents T-lymphocytes and macrophages infiltration in cerebellum and restores motor incoordination in rats with mild liver damage. **Biomedicines**, v. 9, n. 8, 2021. doi:10.3390/biomedicines9081002

BEMEUR, C. *et al.* IL-1 or TNF receptor gene deletion delays onset of encephalopathy and attenuates brain edema in experimental acute liver failure. **Neurochem. Int.**, v. 56, n. 2, p. 213-215, 2010. doi:10.1016/j.neuint.2009.11.010

BESSONE, F. *et al.* Drug-induced liver injury: a management position paper from the Latin American Association for Study of the liver. **Ann. Hepatol.**, v. 24, n. 100321, 2021. doi:10.1016/j.aohep.2021.100321

BJORNSSON, E.; KALAITZAKIS; E.; OLSSON, R. The impact of eosinophilia and hepatic necrosis on prognosis in patients with drug-induced liver injury. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 25, n. 12, p. 1411-1421, 2007. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03330.x

BLANK, T.; PRINZ, M. Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. **Glia**, v. 61, n. 1, p. 62-70, 2013. doi:10.1002/glia.22372

BRÁS, J.P. *et al.* TNF-alpha-induced microglia activation requires miR-342: impact on NF- $\kappa$ B signaling and neurotoxicity. **Cell Death Dis.**, v. 11, n. 415, 2020. doi.org/10.1038/s41419-020-2626-6

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Hepatites virais. 2021, número especial, jul., 2021. [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/boletim\\_epidemiologico/hepatites\\_virais\\_2021.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/boletim_epidemiologico/hepatites_virais_2021.pdf)

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Luta contra hepatites virais: Ministério da Saúde lança campanha de conscientização e novo boletim epidemiológico. 2022. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/julho/luta-contra-hepatites-virais-ministerio-da-saude-lanca-campanha-de-conscientizacao-e-novo-boletim-epidemiologico>

BUSTAMANTE, J. *et al.* Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. **J. Hepatol.**, v. 30, n. 5, p. 890-895, 1999. doi:10.1016/s0168-8278(99)80144-5

BUTTERWORTH, R. F. Inflammatory cascades driven by tumor necrosis factor-alpha play a major role in the progression of acute liver failure and its neurological complications. **PLoS One.**, v. 7, n. 11, e49670, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0049670

BUTTERWORTH, R. F. The concept of "the inflamed brain" in acute liver failure: mechanisms and new therapeutic opportunities. **Metab. Brain Dis.**, v. 31, n. 6, p. 1283-1287, 2016. doi:10.1007/s11011-015-9747-0

CALDITO, N.G. Role of tumor necrosis factor-alpha in the central nervous system: a focus on autoimmune disorders. **Front. Immunol.** v. 14, n.1213448, 2023. doi:10.3389/fimmu.2023.1213448

CASTRO, L. G. G. de. **Efeito do Telmisartan na encefalopatia hepática experimental.** 2024. Dissertação (Mestrado em Patologia Investigativa) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2024.

CHANG, C. C. *et al.* Selective cyclooxygenase inhibition improves hepatic encephalopathy in fulminant hepatic failure of rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 666, n. 1-3; p. 226-232, 2011. doi:10.1016/j.ejphar.2011.04.060

CHASTRE, A. *et al.* 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**, v. 7, n. 11, p. e49670, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0049670

CHAVARRIA, L. *et al.* Brain magnetic resonance spectroscopy in episodic hepatic encephalopathy. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 33, n. 2, p. 272-277, 2013. doi:10.1038/jcbfm.2012.173

CHEN, H. J. *et al.* Identification of minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis based on white matter imaging and Bayesian data mining. **Am. J. Neuroradiol.**, v. 36, n. 3, p. 481-487, 2015. doi:10.3174/ajnr.A4146

CHEN, M. *et al.* Enriched environment ameliorates learning and memory deficits in hepatic encephalopathy mice by restoration of the structure of dendrites and dendritic spines. **Brain Res.**, v. 1, n. 1804, p. 148264, 2023. doi:10.1016/j.brainres.2023.148264.

CHIRAPONGSATHORN, S. *et al.* Incidence and cost analysis of hospital admission and 30-day readmission among patients with cirrhosis. **Hepatol. Commun.**, v. 2 n. 2, p. 188-198, 2018. doi:10.1002/hep4.1137

COLTART, I.; TRANAH, T. H.; SHAWCROSS, D. L. Inflammation and hepatic encephalopathy. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 536, n. 2, p. 189-196, 2013. doi:10.1016/j.abb.2013.03.016

COREY, D. T. The determinants of exploration and neophobia. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 2, n. 4, p. 235-253, 1978. doi:10.1016/0149-7634(78)90033-7

DADSETAN, S. *et al.* Infliximab reduces peripheral inflammation, neuroinflammation, and extracellular GABA in the cerebellum and improves learning and motor coordination in rats with hepatic encephalopathy. **J. Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 245, 2016a. doi:10.1186/s12974-016-0710-8

DADSETAN, S. *et al.* Reducing peripheral inflammation with infliximab reduces neuroinflammation and improves cognition in rats with Hepatic encephalopathy. **Front. Mol. Neurosci.**, v. 9, n. 106, 2016b. doi:10.3389/fnmol.2016.00106

DAS, P.; JAIN, D.; DAS, A. A retrospective autopsy study of histopathologic spectrum and etiologic trend of fulminant hepatic failure from north India. **Diagn. Pathol.**, v. 2, n. 27, 2007. doi:10.1186/1746-1596-2-27

DEL VECCHIO, M. *et al.* Interleukin-12: biological properties and clinical application. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 16, p. 4677-4685, 2007. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0776

DENNIS, C. V. *et al.* Microglial proliferation in the brain of chronic alcoholics with hepatic encephalopathy. **Metab. Brain Dis.**, v. 29, n. 4, p. 1027-1039, 2014. doi:10.1007/s11011-013-9469-0

DESRUISSEAUX, M. S. *et al.* Cognitive dysfunction in mice infected with *Plasmodium berghei* strain ANKA. **J Infect Dis.**, v. 197, n. 11, p. 1621-1627, 2008. doi:10.1086/587908

DING, S. *et al.* DA negatively regulates IGF-I actions implicated in cognitive function via interaction of PSD95 and nNOS in minimal hepatic encephalopathy. **Front Cell. Neurosci.**, v. 6, n. 11, p. 258, 2017a. doi: 10.3389/fncel.2017.00258

DING, S. *et al.* Dopamine burden induced the inactivation of sonic hedgehog signaling to cognitive decline in minimal hepatic encephalopathy. **Aging Dis.**, v. 8, n. 4, p. 442-457, 2017b. doi:10.14336/AD.2016.1123

EL KHIAT, A. *et al.* Kinetic deterioration of short memory in rat with acute hepatic encephalopathy: Involvement of astroglial and neuronal dysfunctions. **Behav. Brain Res.**, n. 367, p. 201-209, 2019. doi:10.1016/j.bbr.2019.03.046

EL-MANSOURY, B. *et al.* Short working memory impairment associated with hippocampal microglia activation in chronic hepatic encephalopathy. **Metabolites**, v. 14, n. 193, 2024. doi:10.3390/metabo14040193

ELSHARBINI, D. M. A. *et al.* Astrocytes profiling in acute hepatic encephalopathy: possible enrolling of glial fibrillary acidic protein, tumor necrosis factor-alpha, inwardly rectifying potassium channel (Kir 4.1) and aquaporin-4 in rat cerebral cortex. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 16, n. 896172, 2022. doi:10.3389/fncel.2022.896172

European Association for the Study of the Liver (EASL). Clinical practical guidelines on the management of acute (fulminant) liver failure. **Journal of Hepatology**, v. 66, n. 5, may, 2017, p. 1047-1081.

FALEIROS, B. E. *et al.* Up-regulation of brain cytokines and chemokines mediates neurotoxicity in early acute liver failure by a mechanism independent of microglial activation. **Brain Res.**, n. 1578, p. 49-59, 2014. doi:10.1016/j.brainres.2014.07.001

FERENCI, P. Hepatic encephalopathy. **Gastroenterol. Rep.**, v. 5, n. 2, p. 138-147, 2017. doi:10.1093/gastro/gox013

FERENCI, P. *et al.* Hepatic encephalopathy - definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. **Hepatology**, v. 35, n. 3, p. 716-721, 2002. doi:10.1053/jhep.2002.31250

FRANÇA, M. E. R. *et al.* Tadalafil restores long-term memory and synaptic plasticity in mice with hepatic encephalopathy. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, n. 379, v. 114673, 2019. doi:10.1016/j.taap.2019.114673

FYFE, B.; ZALDANA, F.; LIU, C. The pathology of acute liver failure. **Clin. Liver Dis.**, v. 22, n. 2, p. 257-268, 2018. doi:10.1016/j.cld.2018.01.003

GAMAL, M. *et al.* Comparative neuroprotective effects of dexamethasone and minocycline during hepatic encephalopathy. **Neurol. Res. Int.**, n. 254683, 2014. doi:10.1155/2014/254683

GARCIA-LEZANA, T. *et al.* Cerebellar neurodegeneration in a new rat model of episodic hepatic encephalopathy. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 37, n. 3, p. 927-937, 2017. doi:10.1177/0271678X16649196

GAZZARD B.G. *et al.* Causes of death in fulminant hepatic failure and relationship to quantitative histological assessment of parenchymal damage. **Quarterly Journal of Medicine**, New Series, XLIV, 176, p. 615-626, 1975.

GEE, C.C., STEFFEN, R. KIEVIT, F.M. An updated Barnes maze protocol for assessing the

outcome of controlled cortical impact mouse models of traumatic brain injury. **J Neurosci Methods**, May 15;392:109866, 2023. doi: 10.1016/j.jneumeth.2023.109866.

GOLSHANI, M. *et al.* Effects of erythropoietin on bile duct ligation-induced neuroinflammation in male rats. **AIMS Neurosci.**, v. 6, n. 2, p. 43-53, 2019. doi:10.3934/Neuroscience.2019.2.43

GORG, B. *et al.* Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. **Hepatology**, v. 52, n. 1, p. 256-265, 2010. doi:10.1002/hep.23656

GORG, B. *et al.* Ammonia-induced senescence in cultured rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. **Glia**, v. 63, n. 1, p. 37-50, 2015. doi:10.1002/glia.22731

GORG, B.; KARABABA, A.; HAUSSINGER, D. (2018). Hepatic encephalopathy and astrocyte senescence. **J. Clin. Exp. Hepatol.**, v. 8, n. 3, p. 294-300, 2018. doi:10.1016/j.jceh.2018.05.003

GOUGH, P., MYLES, I.A. Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects. **Front Immunol.**, v. 25, n. 11, p. 585880, 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.585880.

GOUWEELEEUW, L. *et al.* Evidence for neuroinflammation after myocardial infarction in a mouse model. **Heart and Mind**, v. 1, n. 4, 2017. doi:10.4103/hm.hm\_3\_18

GUIMARÃES, J. S. F. *et al.* Burden of liver disease in Brazil, 1996-2022: a retrospective descriptive study of the epidemiology and impact on public healthcare. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 33, n. 100731, 2024. doi:10. 1016/j.lana.2024. 100731

HAJIPOUR, S. *et al.* Thymoquinone improves cognitive and hippocampal long-term potentiation deficits due to hepatic encephalopathy in rats. **Iran J Basic Med Sci.**, n. 24, p. 881-891, 2021. doi:10.22038/ijbms.2021.52824.11913

HAJIPOUR, S. *et al.* Effect of berberine against cognitive deficits in rat model of thioacetamide-induced liver cirrhosis and hepatic encephalopathy (behavioral, biochemical, molecular and histological evaluations). **Brain Sci.**, v. 13, n. 6, 2023. doi:10.3390/brainsci13060944

HANAU, C. M. S. J.; RUBIN, R. Histopathological heterogeneity in fulminant hepatic failure. **Hepatology**, v. 21, p. 345-351, 1995. doi:0270-9139/95/2102-0012\$3.00/0

HARRISON, F. E.; HOSSEINI, A. H.; McDONALD, M. P. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. **Behav. Brain Res.**, v. 198, n. 1, p. 247-251, 2009. doi:10.1016/j.bbr.2008.10.015

HERNANDEZ-RABAZA, V. *et al.* Sildenafil reduces neuroinflammation and restores spatial learning in rats with hepatic encephalopathy: underlying mechanisms. **J. Neuroinflammation**, v. 12, p. 195, 2015. doi:10.1186/s12974-015-0420-7

HERNANDEZ-RABAZA, V. *et al.* Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by suFHOraphane. **J. Neuroinflammation**, v. 13, n. 41, 2016a. doi:10.1186/s12974-016-0505-y

HERNANDEZ-RABAZA, V. *et al.* Neuroinflammation increases GABAergic tone and impacts cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by suFHorphane by promoting M2 polarization of microglia. **J. Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 83, 2016b. doi:10.1186/s12974-016-0549-z

HILGIER, W. Z. S. *et al.* Changes in the extracellular profiles of neuroactive amino acids in the rat striatum at the asymptomatic stage of hepatic failure. **Journal of Neuroscience Research**, v. 56, p. 76-84, 1999.

HOSSEINI, S. *et al.* Effect of Resveratrol on thioacetamide-induced liver damage in rat models. **Hepat. Mon.**, v. 20, n. 7, jul., e103902, 2020. doi:10.5812/hepatmon.103902

HUANG, J. *et al.* Electroacupuncture synergistically inhibits proinflammatory cytokine production and improves cognitive function in rats with cognitive impairment due to hepatic encephalopathy through p38MAPK/STAT3 and TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathways. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, special number. doi:10.1155/2021/7992688

JAEGER, V.; DEMORROW, S.; MCMILLIN, M. The direct contribution of astrocytes and microglia to the pathogenesis of hepatic encephalopathy. **J. Clin. Transl. Hepatol.**, v. 7, n. 4, p. 352-361, 2019. doi:10.14218/JCTH.2019.00025

JAFARIPOUR, L. *et al.* The effect of gallic acid on memory and anxiety-like behaviors in rats with bile duct ligation-induced hepatic encephalopathy: role of AMPK pathway. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 12, n. 4, p. 425-438, 2022. doi:10.22038/AJP.2022.19720

JAYAKUMAR, A. R. *et al.* Role of cerebral endothelial cells in the astrocyte swelling and brain edema associated with acute hepatic encephalopathy. **Neuroscience**, v. 218, p. 305-316, 2012. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.05.006

JAYAKUMAR, A. R. *et al.* Increased toll-like receptor 4 in cerebral endothelial cells contributes to the astrocyte swelling and brain edema in acute hepatic encephalopathy. **J. Neurochem.**, v. 128, n. 6, p. 890-903, 2014. doi:10.1111/jnc.12516

JAYAKUMAR, A. R.; RAMA RAO, K. V.; NORENBURG, M. D. Neuroinflammation in hepatic encephalopathy: mechanistic aspects. **J. Clin. Exp. Hepatol.**, v. 5 (Suppl 1), S21-28, 2015. doi:10.1016/j.jceh.2014.07.006

JAYAKUMAR, A. R.; NORENBURG, M. D. Hyperammonemia in hepatic encephalopathy. **J. Clin. Exp. Hepatol.**, v. 8, n. 3, p. 272-280, 2018. doi:10.1016/j.jceh.2018.06.007

JIANG, W.; DESJARDINS, P.; BUTTERWORTH, R. F. Cerebral inflammation contributes to encephalopathy and brain edema in acute liver failure: protective effect of minocycline. **J. Neurochem.**, v. 109, n. 2, p. 485-493, 2009. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05981.x

JIAO, F. *et al.* Role of SIRT1 in hepatic encephalopathy: in vivo and In vitro studies focusing on the NLRP3 inflammasome. **Oxid Med. Cell Longev.**, n. 5522708, 2021. doi:10.1155/2021/5522708

KAPS, L. *et al.* Comparison of inflammatory cytokine levels in hepatic and jugular veins of patients with cirrhosis. **Mediators Inflamm.**, n. 9930902, 2023. doi:10.1155/2023/9930902

KERBERT, A. J. C.; JALAN, R. Recent advances in understanding and managing hepatic encephalopathy in chronic liver disease. **F1000Res**, v. 29, n.9, 2020. doi:10.12688/f1000research.22183.1

KHALIL, H. M. A. *et al.* Ashwagandha-loaded nanocapsules improved the behavioral alterations, and blocked MAPK and induced Nrf2 signaling pathways in a hepatic encephalopathy rat model. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 13, p. 252–274, 2023. doi:10.1007/s13346-022-01181-y

KLEINER, D. E. *et al.* Drug-Induced liver Injury, N. hepatic histological findings in suspected drug-induced liver injury: systematic evaluation and clinical associations. **Hepatology**, v. 59, n. 2, p. 661-670, 2014.

KOBLIHOVÁ, E. *et al.* Sex-linked differences in the course of thioacetamide-induced acute liver failure in Lewis rats. **Physiol Res.**, Nov 16; v. 69 n. 5, p. 835-845, 2020. doi: 10.33549/physiolres.934499.

KRAMER, T. J. *et al.* Depletion of regulatory T cells increases T cell brain infiltration, reactive astrogliosis, and interferon-gamma gene expression in acute experimental traumatic brain injury. **J. Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 163, 2019. doi:10.1186/s12974-019-1550-0

LEE, M. *et al.* Tissue-specific Role of CX(3)CR1 expressing immune cells and their relationships with human disease. **Immune Netw.**, v. 18, n. 1, e5, 2018. doi:10.4110/in.2018.18.e5

LEFKOWITCH, J. H. The pathology of acute liver failure. **Adv. Anat. Patho.**, v. 23, n. 3, 2016.

LEIRAS R., CREGG, J.M., KIEHN, O. Brainstem Circuits for Locomotion. **Annu Rev Neurosci.**, v. Jul 8, n. 45, p. 63-85, 2022. doi: 10.1146/annurev-neuro-082321-025137.

LEKE, R. *et al.* Impairment of the organization of locomotor and exploratory behaviors in bile duct-ligated rats. **PLoS One**, v. 7, n. 5, e36322, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0036322.t001

LI, C. T.; YANG, K. C.; LIN, W. C. Glutamatergic dysfunction and glutamatergic compounds for major psychiatric disorders: evidence from clinical neuroimaging studies. **Front Psychiatry**, v. 9, n. 767, 2018. doi:10.3389/fpsy.2018.00767

LIMA, L. C. D. **Aspectos comportamentais associados às alterações patológicas, inflamatórias e neuroquímicas na encefalopatia hepática experimental.** 2019. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

LIMA, L. C. D. *et al.* Hepatic encephalopathy: lessons from preclinical studies. **World J. Hepatol.**, v. 11, n. 2, p. 173-185, 2019. doi:10.4254/wjh.v11.i2.173

LIMON, I. D. *et al.* Disturbance of the glutamate-glutamine cycle, secondary to hepatic damage, compromises memory function. **Front. Neurosci.**, v.15, n. 578922, 2021. doi:10.3389/fnins.2021.578922

LIN, W. C. *et al.* Longitudinal brain white matter alterations in minimal hepatic encephalopathy before and after liver transplantation. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105887, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0105887

LU, M. O. *et al.* TNF-alpha receptor 1 deficiency enhances kainic acid-induced hippocampal injury in mice. **J. Neurosci. Res.**, v. 86, n. 7, p. 1608-1614, 2008. doi:10.1002/jnr.21600

LUO, M. *et al.* Relationship between interleukin-6 and ammonia in patients with minimal hepatic encephalopathy due to liver cirrhosis. **Hepatol. Res.**, v. 42, n. 12, p. 1202-1210, 2012. doi:10.1111/j.1872-034X.2012.01047.x

LUO, M. *et al.* Correlation between interleukin-6 and ammonia in patients with overt hepatic encephalopathy due to cirrhosis. **Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.**, v. 37, n. 4, p. 384-390, 2013. doi:10.1016/j.clinre.2012.08.007

LUO, M. *et al.* Potential targeted therapies for the inflammatory pathogenesis of hepatic encephalopathy. **Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.**, v. 39, n. 6, p. 665-673, 2015. doi:10.1016/j.clinre.2015.06.020

LUO, M.; GUO, J. Y.; CAO, W. K. Inflammation: a novel target of current therapies for hepatic encephalopathy in liver cirrhosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 41, p. 11815-11824, 2015. doi:10.3748/wjg.v21.i41.11815

MAGEN, I. *et al.* Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in mice with bile duct ligation. **J. Hepatol.**, v. 51, n. 3, p. 528-534, 2009. doi:10.1016/j.jhep.2009.04.021

MAGEN, I. *et al.* Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in bile-duct ligated mice via 5-HT1A receptor activation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 159, n. 4, p. 950-957, 2010. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00589.x

MALAGUARNERA, M. *et al.* Bicuculline reduces neuroinflammation in hippocampus and improves spatial learning and anxiety in hyperammonemic rats. role of glutamate receptors. **Front Pharmacol.**, v. 10, n. 132, 2019. doi:10.3389/fphar.2019.00132

MANGAS-LOSADA, A. *et al.* Selective improvement by rifaximin of changes in the immunophenotype in patients who improve minimal hepatic encephalopathy. **J. Transl. Med.**, v. 17, n. 1, p. 293, 2019. doi:10.1186/s12967-019-2046-5

MASUBUCHI, Y., ILHARA, A. Protection of mice against carbon tetrachloride-induced acute liver injury by endogenous and exogenous estrogens. **Drug Metab Pharmacokinet.**, Oct;46:100460, 2022. doi: 10.1016/j.dmpk.2022.100460.

MCMILLIN, M. *et al.* Fractalkine suppression during hepatic encephalopathy promotes neuroinflammation in mice. **J. Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 198, 2016. doi:10.1186/s12974-016-0674-8

MCMILLIN, M., *et al.* Bile acid-mediated sphingosine-1-phosphate receptor 2 signaling promotes neuroinflammation during hepatic encephalopathy in mice. **Front Cell Neurosci.**, v. 11, n. 191, 2017. doi:10.3389/fncel.2017.00191

MEDLER, J.; WAJANT, H. Tumor necrosis factor receptor-2 (TNFR2): an overview of an emerging drug target. **Expert Opin Ther Targets**, v. 23, n. 4, p. 295-307, 2019. doi:10.1080/14728222.2019.1586886

MENDEZ, M. *et al.* Mammillary body alterations and spatial memory impairment in Wistar rats with thioacetamide-induced cirrhosis. **Brain Res.**, n. 1233, p. 185-195, 2008.

MENNECOZZI, M. *et al.* Sex differences in liver toxicity-do female and male human primary hepatocytes react differently to toxicants in vitro? **PLoS One.**, Apr 7;10(4):e0122786, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0122786.

MINCHEVA, G. *et al.* Golexanolone, a GABA(A) receptor modulating steroid antagonist, restores motor coordination and cognitive function in hyperammonemic rats by dual effects on peripheral inflammation and neuroinflammation. **CNS Neurosci. Ther.**, v. 28, n. 11, p. 1861-1874, 2022. doi:10.1111/cns.13926

MIRANDA, A. S. *et al.* A thioacetamide-induced hepatic encephalopathy model in C57BL/6 mice. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 68, n. 4, p. 597-602, 2010. doi:10.1590/S0004-282X2010000400022

MIRANDA, A.S. *et al.* A neuroprotective effect of the glutamate receptor antagonist MK801 on long-term cognitive and behavioral outcomes secondary to experimental cerebral malaria. **Mol. Neurobiol.**, v. 54, n. 9, p.7063–7082, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0226-3>.

MURAD, H. A. *et al.* Candesartan, rather than losartan, improves motor dysfunction in thioacetamide-induced chronic liver failure in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 50, n. 11, p. e6665, 2017. doi:10.1590/1414-431X20176665

NADER, L. A.; DE MATTOS, A. A.; BASTOS, G. A. Burden of liver disease in Brazil. **Liver Int.**, v. 34, n. 6, p. 844-849, 2014. doi:10.1111/liv.12470

NEFF, G.; ZACHRY, W., III. Systematic review of the economic burden of overt hepatic encephalopathy and pharmacoeconomic impact of rifaximin. **Pharmacoeconomics**, v. 36, n. 7, p. 809-822, 2018. doi:10.1007/s40273-018-0641-6

NUMAKAWA, T.; ODAKA, H.; ADACHI, N. Actions of brain-derived neurotrophin factor in the neurogenesis and neuronal function, and its involvement in the pathophysiology of brain diseases. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, n. 11, 2018. doi:10.3390/ijms19113650

ODEH, M. *et al.* Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. **Liver Int.**, v. 24, n. 2, p. 110-116, 2004. doi:10.1111/j.1478-3231.2004.0894.x

ODEH, M. *et al.* Relationship between tumor necrosis factor-alpha and ammonia in patients with hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. **Ann. Med.**, v. 37, n. 8, p. 603-612, 2005. doi:10.1080/07853890500317414

ODEH, M. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: the tumour necrosis factor-alpha theory. **Eur J Clin Invest.**, v. 37, n. 4, p. 291-304, 2007. doi:10.1111/j.1365-2362.2007.01778.x

OKKAY, U. *et al.* Hepatoprotective and neuroprotective effect of taxifolin on hepatic encephalopathy in rats. **Metab. Brain. Dis.**, v. 37, n. 5, p. 1541-1556, 2022. doi:10.1007/s11011-022-00952-3

OLIVEIRA, M.M. *et al.* Sex is associated with differences in oxidative stress and susceptibility to severe hepatic encephalopathy in bile-duct ligated rats. **J Neurochem.**, v. 162, n. 4, p. 337-351, 2022a. <https://doi.org/10.1111/jnc.15661>

OLIVEIRA, N. K. *et al.* Modified levels of renin angiotensin related components in the frontal cortex and hippocampus were associated with neuroinflammation and lower neuroprotective effects of NGF during acute hepatic encephalopathy in mice. **Protein Pept. Lett.**, v. 29, n. 12, p. 1042-1050, 2022b. doi:10.2174/0929866529666220825150025

ONG, J. P. *et al.* Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. **The American Journal of Medicine**, v. 114, n. 3, p. 188-193, 2003. doi:10.1016/s0002-9343(02)01477-8

OPOKU, Y. K. *et al.* Fibroblast growth factor-21 ameliorates hepatic encephalopathy by activating the STAT3-SOCS3 pathway to inhibit activated hepatic stellate cells. **EXCLI J**, v. 19, p. 567-581, 2020. doi:10.17179/excli2020-1287

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Quimiocinas e imunidade chemokines and immunity. **Einstein**, v. 13, n. 3, p. 469-73, 2015. doi:10.1590/S1679-45082015RB3438

PAREKH, P. J.; BALART, L. A. Ammonia and its role in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. **Clin. Liver Dis.**, v. 19, n. 3, p. 529-537, 2015. doi:10.1016/j.cld.2015.05.002

PATIDAR, K. R.; BAJAJ, J. S. Covert and overt hepatic encephalopathy: diagnosis and management. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 13, n. 12, p. 2048-2061, 2015. doi:10.1016/j.cgh.2015.06.039

PATIDAR, K. R. *et al.* Symptom domain groups of the patient-reported outcomes measurement information system tools independently predict hospitalizations and re- hospitalizations in cirrhosis. **Dig. Dis. Sci.**, v. 62, n. 5, p. 1173-1179, 2017. doi:10.1007/s10620-017-4509-y

PEREZ-RODRIGUEZ, D. R.; BLANCO-LUQUIN, I.; MENDIOROZ, M. The participation of microglia in neurogenesis: a review. **Brain Sci.**, v. 11, n. 5, 2021. doi:10.3390/brainsci11050658

PICON, R. V. *et al.* A. Z. Chronic liver failure-consortium acute-on-chronic liver failure and acute decompensation scores predict mortality in brazilian cirrhotic patients. **World J. Gastroenterol.**, v. 23, n. 28, p. 5237-5245, 2017. doi:10.3748/wjg.v23.i28.5237

PITTS, M. W. Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice. **Bio Protoc.**, v. 8, n. 5, 2018. doi:10.21769/bioprotoc.2744

POORDAD, F. F. Review article: the burden of hepatic encephalopathy. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 25 Suppl 1, p. 3-9, 2007. doi:10.1111/j.1746-6342.2006.03215.x

PORRO, C.; CIANCIULLI, A.; PANARO, M. A. The regulatory role of IL-10 in neurodegenerative diseases. **Biomolecules**, v. 10, n. 7, 2020. doi:10.3390/biom10071017

QI, R. *et al.* Structural and functional abnormalities of default mode network in minimal hepatic encephalopathy: a study combining DTI and fMRI. **PLoS One**, v. 7, n. 7, e41376, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0041376

RAMA RAO, K. V. *et al.* Marked potentiation of cell swelling by cytokines in ammonia-sensitized cultured astrocytes. **J. Neuroinflammation**, v. 7, n. 66, 2010. doi:10.1186/1742-2094-7-66

RAO, K. V. *et al.* Astrocytes protect neurons from ammonia toxicity. **Neurochem. Res.**, v. 30,

REUS, G. Z. *et al.* The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. **Neuroscience**, n. 300, p. 141-154, 2015. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.05.018

REY, I.; EFFENDI-YS, R. Association between serum IL-6, IL-10, IL-12, and IL-23 levels and severity of liver cirrhosis. **Med. Arch.**, v. 75, n. 3, p. 199-203, 2021. doi:10.5455/medarh.2021.75.199-203

SALARI, A.A. *et al.* Small litter size impairs spatial memory and increases anxiety-like behavior in a strain-dependent manner in male mice. **Sci. Rep.**, v. 8, n. 1, p. 11281, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29595-0>.

SALEH, D. O.; MANSOUR, D. F.; FAYEZ, A. M. Thioacetamide-induced acute hepatic encephalopathy: central vs peripheral effect of Allicin. **Metab. Brain. Dis.**, v. 36, n. 6, p. 1331-1340, 2021. doi:10.1007/s11011-021-00695-7

SANTOS, R. P. C.; TOSCANO, E. C. B.; RACHID, M. A. Anti-inflammatory strategies for hepatic encephalopathy: preclinical studies. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 81, n. 7, p. 656-669, 2023. doi:10.1055/s-0043-1767819

SARAIVA, M.; VIEIRA, P.; O'GARRA, A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **J. Exp. Med.**, v. 217, n. 1, 2020. doi:10.1084/jem.20190418

SEDIK, A. A.; HASSAN, A.; SALEH, D. O. Neuromodulatory role of L-arginine: nitric oxide precursor against thioacetamide-induced-hepatic encephalopathy in rats via downregulation of NF- $\kappa$ B-mediated apoptosis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, p. 84791–84804, 2023. doi.org/10.1007/s11356-023-28184-7

SEPEHRINEZHAD, A. *et al.* Drug-induced-acute liver failure: a critical appraisal of the thioacetamide model for the study of hepatic encephalopathy. **Toxicol. Rep.**, n. 8, p. 962-970, 2021. doi:10.1016/j.toxrep.2021.04.011

SHAWCROSS, D. L. *et al.* Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. **J. Hepatol.**, v. 40, n. 2, p. 247-254, 2004. doi:10.1016/j.jhep.2003.10.016

SHAWCROSS, D.; JALAN, R. The pathophysiologic basis of hepatic encephalopathy: central role for ammonia and inflammation. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 62, n. 19-20, p. 2295-2304, 2005. doi:10.1007/s00018-005-5089-0

SIDDIQUI, T.A.; LIVELY, S.; SCHLICHTER, L.C. Complex molecular and functional outcomes of single versus sequential cytokine stimulation of rat microglia. **J Neuroinflammation**, v. 24. n. 13(1), p. 66, 2016. doi: 10.1186/s12974-016-0531-9

SILVA, A. F. C.; ROCHA, D. dos S. **Estudo clínico e epidemiológico dos pacientes internados com hemorragia digestiva alta no Hospital Universitário João de Barros Barreto**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

SILVA, D. G. *et al.* Innate and adaptive immune gene expression in the brain is associated with

neuropathological changes after infection with bovine alpha-herpesvirus-5 in mice. **Vet. Microbiol.**, v. 285, p. 109845, 2023. doi:10.1016/j.vetmic.2023.109845

SILVEIRA, L. R.; ISER, B. P. M.; BIANCHINI, F. Fatores prognósticos de pacientes internados por cirrose hepática no Sul do Brasil. **GED Gastroenterol. Endosc. Dig.**, v. 35, n. 2, p. 41-51, abr.-jun., 2016.

SIMPSON, K. J. *et al.* Inhibition of tumour necrosis factor alpha does not prevent experimental paracetamol-induced hepatic necrosis. **J. Pathol.**, v. 190, p. 489-494, 2000.

STAZIAKI, P. V. *et al.* Fish oil has beneficial effects on behavior impairment and oxidative stress in rats subjected to a hepatic encephalopathy model. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 12, p. 84-93, 2013.

STEPANOVA, M. *et al.* In-hospital mortality and economic burden associated with hepatic encephalopathy in the United States from 2005 to 2009. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 10, n. 9, p. 1034-1041 e1031, 2012. doi:10.1016/j.cgh.2012.05.016

STEWART, C. A.; SMITH, G. E. Minimal hepatic encephalopathy. **Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 4, n. 12, p. 677-685, 2007. doi:10.1038/ncpgasthep0999

TACHIKI, Y. *et al.* Scale space calibrates present and subsequent spatial learning in Barnes maze in mice. **eNeuro.**, v. 10, n. 6, 2023. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0505-22.2023>.

TAKAHASHI, A. *et al.* Multivariate analysis of temporal descriptions of open-field behavior in wild-derived mouse strains. **Behav. Genet.**, v. 36, n. 5, p. 763-774, 2006. doi:10.1007/s10519-005-9038-3

TAKAHASHI, S. *et al.* Tumor necrosis factor alpha negatively regulates the retrieval and reconsolidation of hippocampus-dependent memory. **Brain Behav. Immun.**, 94, p. 79-88, 2021. doi:10.1016/j.bbi.2021.02.033

TAPPER, E. B.; HALBERT, B.; MELLINGER, J. Rates of and reasons for hospital readmissions in patients with cirrhosis: a multistate population-based cohort study. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 14, n. 8, p. 1181-1188, e1182, 2016. doi:10.1016/j.cgh.2016.04.009

TILG, H. *et al.* Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. **Gastroenterology**, v. 103, n. 1, p. 264-74, jul., 1992. doi:10.1016/0016-5085(92)91122-k

TRANAH, T. H. *et al.* Systemic inflammation and ammonia in hepatic encephalopathy. **Metab. Brain Dis.**, v. 28, n. 1, p. 1-5, 2013. doi:10.1007/s11011-012-9370-2

TUNEZ, I. *et a.* Hepato- and neurotoxicity induced by thioacetamide: protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide. **Pharmacol. Res.**, v. 52, n. 3, p. 223-228, 2005. doi:10.1016/j.phrs.2005.03.007

VERKHRATSKY, A.; NEDERGAARD, M. Physiology of astroglia. **Physiol. Ver.**, v. 98, n. 1, p. 239-389, 2018. doi:10.1152/physrev.00042.2016

VILSTRUP, H. *et al.* Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. **Hepatology**, v. 60, n. 2, p. 715-735, 2014. doi:10.1002/hep.27210

WAHAB, D. Y. A. A. *et al.* Review on cross talk between neurotransmitters and neuroinflammation in striatum and cerebellum in the mediation of motor behaviour. **Biomed. Res. Int.**, n. 1767203, 2019. doi:10.1155/2019/1767203

WALKER, V. Ammonia metabolism and hyperammonemic disorders. **Adv. Clin. Chem.**, v. 67, p. 73-150, 2014. doi:10.1016/bs.acc.2014.09.002

WANG Y., *et al.* Protective role of tumor necrosis factor (TNF) receptors in chronic intestinal inflammation: TNFR1 ablation boosts systemic inflammatory response. **Lab Invest.**, v. 93, n. 9, p. 1024-35, 2013. doi: 10.1038/labinvest.2013.89

WEISSENBORN, K. PHEs: one label, different goods?! **J. Hepatol.**, v. 49, n. 3, p. 308-312, 2008. doi:10.1016/j.jhep.2008.06.023

WEISSENBORN, K. Hepatic encephalopathy: definition, clinical grading and diagnostic principles. **Drugs**, v. 79(Suppl 1), p. 5-9, 2019. doi:10.1007/s40265-018-1018-z

WEN, F. *et al.* Oridonin prevents insulin resistance-mediated cognitive disorder through PTEN/Akt pathway and autophagy in minimal hepatic encephalopathy. **J. Cell Mol. Med.**, v. 24, p. 61-78, 2020. doi:10.1111/jcmm.14546

WHEELER, R. D. *et al.* Elevated interferon gamma expression in the central nervous system of tumour necrosis factor receptor 1-deficient mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. **Immunology**, v. 118, n. 4, p. 527-538, 2006. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02395.x

WIJDICKS, E. F. Hepatic encephalopathy. **N. Engl. J. Med.**, v. 375, n. 17, p. 1660-1670, 2016. doi:10.1056/NEJMra1600561

WIJNEN, K.; GENZEL, L.; MEIJ, J. V. D. Rodent maze studies: from following simple rules to complex map learning. **Brain Structure and Function**, v. 229, p. 823-841, 2024. doi:10.1007/s00429-024-02771-x

WONG, R. J.; GISH, R. G.; AHMED, A. Hepatic encephalopathy is associated with significantly increased mortality among patients awaiting liver transplantation. **Liver Transpl.**, v. 20, n. 12, p. 1454-1461, 2014. doi:10.1002/lt.23981

XING, T. *et al.* Altered immune function of monocytes in different stages of patients with acute on chronic liver failure. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 147, n. 1, 184-188, 2007. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03259.x

XU, L. *et al.* The hepatoprotective and hepatotoxic roles of sex and sex-related hormones. **Front Immunol.**, v. 13, n. 939631, 2022. doi:10.3389/fimmu.2022.939631

YANG, Y. L. *et al.* Abnormal chloride homeostasis in the substantia nigra pars reticulata contributes to locomotor deficiency in a model of acute liver injury. **PLoS One**, v. 8, n. 5, e65194, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0065194

YANNY, B. *et al.* Hepatic encephalopathy challenges, burden, and diagnostic and therapeutic approach. **Clin. Liver Dis.**, v. 23, n. 4, p. 607-623, 2019. doi:10.1016/j.cld.2019.07.001

YUAN, D. S. *et al.* Hydrogen sulfide alleviates cognitive deficiency and hepatic dysfunction

in a mouse model of acute liver failure. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 2074, p. 671-677, 2020. doi:10.3892/etm.2020.8680

ZEMTSOVA, I. *et al.* Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. **Hepatology**, v. 54, n. 1, p. 204-215, 2011. doi:10.1002/hep.24326

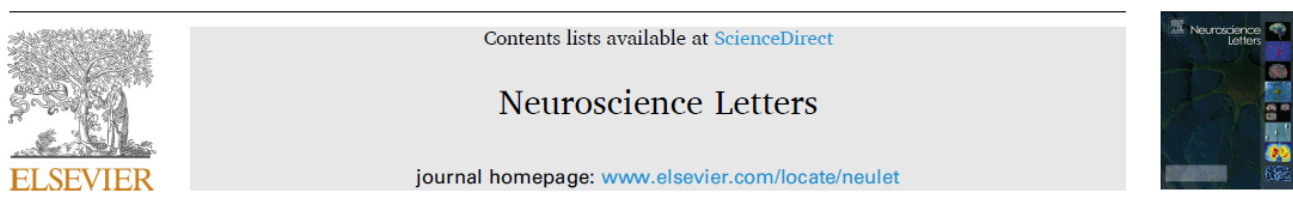
ZHANG, H. *et al.* Comprehensive analysis of lncRNAs, miRNAs and mRNAs in mouse hippocampus with hepatic encephalopathy. **Frontiers in Genetics**, v. 13, may, 2022. doi:10.3389/fgene.2022.868716

ZHANG, L. J. *et al.* Disrupted functional connectivity of the anterior cingulate cortex in cirrhotic patients without overt hepatic encephalopathy: a resting state fMRI study. **PLoS One**, v. 8, n. 1, e53206, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0053206

Artigo original publicado pela revista *Neuroscience Letters*, em novembro de 2024, volume 842, número 137987, doi: [10.1016/j.neulet.2024.137987](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2024.137987), [clique aqui](#) para acessar o artigo.

### Figura 11 - Artigo original

Neuroscience Letters 842 (2024) 137987



## Absence of TNFR1 promotes a protective response in the early phase of hepatic encephalopathy induced by thioacetamide in mice

Rafaela Pinto Coelho Santos<sup>a,1</sup>, Bruna da Silva Oliveira<sup>b,1</sup>, Natália Katley Oliveira<sup>a</sup>, Eliana Cristina de Brito Toscano<sup>f</sup>, Érica Leandro Marciano Vieira<sup>d</sup>, Lucíola da Silva Barcelos<sup>c</sup>, Ana Cristina Simões e Silva<sup>d</sup>, Antônio Lúcio Teixeira<sup>e</sup>, Aline Silva de Miranda<sup>b,\*</sup>, Milene Alvarenga Rachid<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica (LIIM), Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>e</sup> The Glenn Biggs Institute for Alzheimer's & Neurodegenerative Diseases, Lozano Long School of Medicine, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX, USA

<sup>f</sup> Laboratory of Research in Pathology, Department of Pathology, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

Capa do artigo original publicado na revista *Neuroscience Letters*. Fonte: ScienceDirect® (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394024003653?dgcid=author>).

## APÊNDICE B – Artigo de revisão

Artigo de revisão publicado pela revista Arquivos de Neuropsiquiatria 2023, volume 81, número 7, página 656–669, doi: [10.1055/s-0043-1767819](https://doi.org/10.1055/s-0043-1767819), [clique aqui](#) para acessar o artigo completo.

### Figura 12 - Artigo de revisão



► Arq Neuropsiquiatr. 2023 Jul 24;81(7):656–669. doi: [10.1055/s-0043-1767819](https://doi.org/10.1055/s-0043-1767819)

Show available content in: [English](#) | [Portuguese](#)

## Anti-inflammatory strategies for hepatic encephalopathy: preclinical studies

[Rafaela Pinto Coelho Santos](#)<sup>1</sup>, [Eliana Cristina de Brito Toscano](#)<sup>2,3,✉</sup>, [Milene Alvarenga Rachid](#)<sup>1</sup>

► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#)

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Geral, Laboratório de Patologia Celular e Molecular, Belo Horizonte MG, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia, Laboratório Integrado de Pesquisa em Patologia, Juiz de Fora MG, Brazil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Juiz e Fora, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde, Juiz de Fora MG, Brazil.

✉ **Address for correspondence** [Eliana Cristina de Brito Toscano elianacbtoscano@gmail.com](mailto:elianacbtoscano@gmail.com)

PMCID: [PMC10371400](#) PMID: [37487550](#)

Capa do artigo de revisão publicado na revista Arquivos de Neuropsiquiatria. Fonte: PubMed Central® (<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10371400/>).