



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA EDUARDA ROCHA DE FRANÇA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE-5 SOBRE
A NEURODEGENERAÇÃO EM MODELO DE ENCEFALOPATIA HEPÁTICA
INDUZIDO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 *WILD TYPE***

Recife

2019

MARIA EDUARDA ROCHA DE FRANÇA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE-5 SOBRE
A NEURODEGENERAÇÃO EM MODELO DE ENCEFALOPATIA HEPÁTICA
INDUZIDO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 *WILD TYPE***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientador: Dr^a Christina Alves Peixoto

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

França, Maria Eduarda Rocha de

Avaliação dos efeitos do inibidor de fosfodiesterase-5 sobre a neurodegeneração em modelo de encefalopatia hepática induzido em camundongos C57BL/6 *Wild Type* / Maria Eduarda Rocha de França. – 2019.

78 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Christina Alves Peixoto.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2019.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Sistema nervoso central - Doenças. 2. Neuroinflamação. I. Peixoto, Christina Alves (Orientadora) II. Título.

616.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020 - 010

MARIA EDUARDA ROCHA DE FRANÇA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE-5 SOBRE
A NEURODEGENERAÇÃO EM MODELO DE ENCEFALOPATIA HEPÁTICA
INDUZIDO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 *WILD TYPE***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dr^a Christina Alves Peixoto

Aprovada em: 01/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Belmira Andrade da Costa
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a Karla Patrícia de Sousa Barbosa
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a Christina Alves Peixoto (Orientadora)
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

***Dedico este trabalho a Deus, a minha mãe Angélica e ao
meu pai Eduardo, meu porto seguro.***

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu infinito amor, pelo dom da vida, por ser tão fiel, verdadeiro e por me permitir conhecê-lo a cada dia mais profundamente. Bom é confiar no Senhor e esperar Nele!

Aos meus pais Angélica e Eduardo pelo amor incondicional, meus incentivadores que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Palavras jamais serão suficientes para eu expressar a minha gratidão a vocês.

A minha irmã Gabrielle e ao meu cunhado-irmão Binho pelo carinho, ajuda, incentivo e pela alegria que sempre me contagia.

Ao meu noivo, melhor amigo e companheiro de todas as horas Leo, pelo amor, paciência, apoio e cuidado. Cada ano juntos é mais um passo para a realização do nosso sonho.

A minha família por todo carinho e apesar da distância torcem por mim desde sempre.

A minha orientadora Dr^a Christina Peixoto pela oportunidade de me receber no laboratório desde a iniciação científica, pela orientação, atenção, brilhantismo científico e por compartilhar tanto conhecimento ao longo desses anos.

A Renata, minha aluna de Iniciação Científica pela imensa ajuda para a realização desse trabalho. Foi através dessa co-orientação que iniciou o meu apreço pela docência.

As minhas amigas de infância Camila, Sâmila, Gabi, Bárbara e Marília, companheiras que compartilho memórias desde a época do colégio até os dias de hoje.

Aos amigos da época do colégio Brhenna, Priscila, Felipe e Marcelo pela torcida e apoio desde a época do vestibular.

Aos meus amigos da Igreja Batista Karine, Thiago, Janeide, Alexandre, Anatielle, Marquinhos, Pr. Milton, Ir. Iracema e todos que fazem parte da “Rede Jovem” pela amizade e orações.

Aos amigos da época saudosa da Umadal Hugo, Emerson, Bruno, Paulo, Marcela e Márcio pela amizade e descontração.

Aos meus amigos “Neurultras” Edu, Wil, Shy, Deni e Michel pela companhia diária, pelos momentos divertidos e por tornar essa jornada bem mais leve. As “Lablindas” Sura,

Karla, Laise, Karol e Gabi pela torcida desde sempre, vocês fizeram muita falta. A Clarissa, Milena, Amanda Karolina, Gabriel, Thiago, a nova geração do laboratório Crislayne, Débora, Igor, Ingrid, Rodrigo, Liliam e todos do Laboratório Ultraestrutura por todo apoio e experiência compartilhada.

Aos meus amigos biomédicos May, Shy, Rômulo, Jéssica, Grasi e Carol.

Aos funcionários do Biotério experimental da FIOCRUZ-PE, em especial Eduardo e Alessandra por toda ajuda e simpatia.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, em especial Adenilda pela atenção, carinho e ajuda.

Aos camundongos.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

A todos, meu muitíssimo obrigado!

“Palavra fiel é esta: que, se morrermos com Ele, também com Ele viveremos; Se sofrermos, também com ele reinaremos; se o negarmos, também Ele nos negará; Se formos infiéis, Ele permanece fiel; não pode negar-se a si mesmo.” II Timóteo 2:11-13.

RESUMO

A Encefalopatia Hepática (EH) é uma grave complicação neuropsiquiátrica associada à insuficiência hepática. Essa síndrome afeta severamente a qualidade de vida dos pacientes além de ser uma ameaça à vida. Os tratamentos usualmente utilizados para EH são insuficientes, sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento da EH. O tadalafil apresenta importantes efeitos neuroprotetores em modelos experimentais de neuroinflamação, no entanto os seus mecanismos de ação permanecem pouco compreendidos. O objetivo do presente estudo foi investigar a ação do Tadalafil na neuroinflamação, ativação de células gliais, neuroproteção, aprendizagem e memória no modelo experimental de EH induzida por tioacetamida (TAA) em camundongos. Para tanto, camundongos machos C57BL/6 com 10 semanas de idade e peso entre 25-30g, foram distribuídos em 3 grupos experimentais (n=15 por grupo): (1) Grupo controle, (2) Grupo TAA 600mg/kg, (3) Grupo TAA 600mg/kg + tadalafil (15mg/kg). O TAA foi administrado por via intraperitoneal em uma dose de 200mg/kg por 3 dias consecutivos, atingindo a dose final de 600 mg/kg. Após 48h de indução da EH, o tratamento com tadalafil 15mg/kg foi realizado por gavagem em um volume total de 100µL durante 15 dias. Os camundongos foram submetidos a um labirinto de Barnes para avaliação de aprendizagem e memória. Animais com EH apresentaram diminuição do aprendizado e memória espacial no Labirinto de Barnes, apresentaram ativação de astrócitos e microglia e aumento da expressão dos marcadores neuroinflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, p-p38, p-ERK e p-NFkB. Além disso, a via de sinalização PKA / PKG / CREB / BDNF e os níveis de NeuN, sinaptofisina e receptores do glutamato foram alterados pelo TAA. Por sua vez, o tratamento com tadalafil regulou as vias de sinalização da inflamação e cognição, restaurando o aprendizado e memória espacial. Portanto o tadalafil apresenta potencial terapêutico na EH, pois reduziu significativamente a neuroinflamação, promoveu a neuroproteção, além de regular a plasticidade sináptica através da modulação dos receptores do glutamato no hipocampo e, consequentemente restaurou a capacidade de aprendizado e memória.

Palavras-chave: Encefalopatia hepática. Tadalafil. Neuroinflamação. Plasticidade sináptica. Aprendizado e memória.

ABSTRACT

Hepatic Encephalopathy (HE) is a serious neuropsychiatric complication associated with liver failure. This syndrome severely affects the quality of life of the patients besides being a threat to life. The treatments usually used for HE are insufficients, thus, it is necessary to develop therapeutic strategies for the treatment of HE. Tadalafil has important neuroprotective effects in experimental neuroinflammatory models, however its mechanisms of action remain poorly understood. The aim of the present study was to investigate the action of Tadalafil on neuroinflammation, glial cell activation, neuroprotection and learning and memory in the experimental model of hepatic encephalopathy (HE) induced by thioacetamide (TAA) in mice. For this purpose, male C57BL/6 male mice weighing between 25 and 30g were distributed in 3 experimental groups (n = 15 per group): (1) Control group, (2) TAA group 600mg/kg, (3) TAA group 600mg/kg + tadalafil (15mg /g). TAA was administered intraperitoneally at a dose of 200 mg / kg for 3 consecutive days, reaching the final dose of 600 mg /kg. After 48h induction of HE, treatment with tadalafil 15mg / kg was performed by gavage in a total volume of 100 μ L for 15 days. The mice were submitted to a Barnes labyrinth for evaluation of learning and memory. Neuroinflammatory markers such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, p-p38, p-ERK, and p-NFkB were observed in the Barnes Labyrinth and showed increased activation of astrocytes and microglia. In addition, the signaling pathway PKA / PKG / CREB / BDNF and the levels of NeuN, synaptophysin and receptors glutamate were altered by TAA. However, treatment with tadalafil regulated the inflammation and cognition signaling pathways, restoring learning and spatial memory. Therefore, tadalafil presents therapeutic potential in HE because it significantly reduced neuroinflammation, promoted neuroprotection, besides regulated synaptic plasticity through the modulation of glutamate receptors in the hippocampus and consequently restored learning ability and memory.

Keywords: Hepatic encephalopathy. Tadalafil. Neuroinflammation. Synaptic plasticity. Learning and memory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Via de metabolização da amônia.....	25
Figura 2 –	Mecanismo do tioacetamida em modelo experimental da EH.....	26
Figura 3 –	Ação da amônia no cérebro.....	29
Figura 4 –	Neurotoxicidade da amônia no astrócito.....	29
Figura 5 –	Representação da ativação microglial.....	31
Figura 6 –	Cascata de sinalização dos marcadores inflamatórios na EH.....	34
Figura 7 –	Via de sinalização GMPc-PKG-PDE.....	36
Figura 8 –	Via de sinalização glutamato-NO-GMPc-PKG dependente de receptor NMDA.....	38
Figura 9 –	Via de sinalização da CREB.....	39
Figura 10 –	Regulação da expressão do receptor AMPA.....	40
Figura 11 –	Mecanismo de regulação dos receptores AMPA dependente dos receptores NMDA.....	41
Figura 12 –	Reguladores da GSK3 no neurônio.....	42
Figura 13 –	Mecanismos modulados pela GSK3.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Critérios de West Haven para diagnóstico de Encefalopatia Hepática.....	21
Figura 2 –	Descrição clínica da EH.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenosina ciclase
AD	Doença de Alzheimer
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionico
AMPAR	Receptor AMPA
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Adenosina trifosfato
BDL	Ligadura do ducto biliar (do inglês bile duct ligation)
BDNF	Fator Neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira Hemato-encefálica
CaM	Calmodulina
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta AMPC
DPS	Desvio portossistêmico
EH	Encefalopatia Hepática
EHM	Encefalopatia hepática mínima
EEG	Eletroencefalograma
E-LTP	Potenciação de longo termo precoce (do inglês early-long term potentiation)
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular (do inglês extracellular signal-regulated kinase)
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial

GSK3 β	Glicogênio Sintase quinase beta
GMPC	Monofosfato cíclico de guanosina
GS	Glutamina sintase
GTP	Trifosfato de guanosina
iGluRs	Receptores de glutamato ionotrópico
IHA	Insuficiência hepática aguda
IHF	Insuficiência hepática fulminante
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico induzível
ISHEN	Sociedade Internacional para Encefalopatia Hepática e Nitrogênio Metabolismo
LPS	Lipopolissacarídeo
L-LTP	Potenciação de longo prazo tardia (do inglês late-long term potentiation)
LTD	Depressão de longo prazo (do inglês long term depression)
LTP	Potenciação de longo prazo (do inglês long term potentiation)
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
mTOR	Alvo de rapamicina em mamíferos
NF κ B	Fator nuclear κ B
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NMDAR	Receptores NMDA
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
p-CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta-AMPC fosforilada

PDE	Fosfodiesterases
p-GSK3 β	Glicogênio Sintase Cinase beta fosforilada
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PRKG1	Receptor de proteína quinase G1
Ser	Serina
SNC	Sistema Nervoso Central
STP	Potenciação de curto prazo (do inglês short term potentiation)
TAA	Tioacetamida
TAD	Tadalafil
TIPS	Desvio portossistêmico intra-hepático transjugular
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.2	OBJETIVOS.....	19
1.2.1	Objetivo Geral.....	19
1.2.2	Objetivos Específicos.....	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	ENCEFALOPATIA HEPÁTICA.....	20
2.2	CLASSIFICAÇÃO.....	21
2.3	EPIDEMIOLOGIA.....	23
2.4	MECANISMO DA AMÔNIA NA NEUROTOXICIDADE.....	24
2.4.1	Mecanismos da tiaoacetamida em modelo animal de EH.....	26
2.5	ASTRÓCITOS E O SEU PAPEL NA HOMEOSTASE CEREBRAL.....	27
2.5.1	Efeitos da hiperamonemia sobre os astrócitos.....	28
2.6	ATIVAÇÃO MICROGLIAL E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DA EH.....	30
2.7	NEUROINFLAMAÇÃO.....	32
2.7.1	Mediadores inflamatórios na modulação e manifestação da EH.....	33
2.8	MECANISMO DE SINALIZAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: O SISTEMA MENSAGEIRO.....	35
2.9	VIAS DE SINALIZAÇÃO NA MEMÓRIA E PLASTICIDADE SINÁPTICA.....	37
2.9.1	Modulação dos receptores do glutamato na plasticidade sináptica.....	38
2.9.2	Via de sinalização da GSK3β.....	41
2.10	ALTERAÇÕES COGNITIVAS NA EH.....	45
2.11	TRATAMENTOS.....	46

2.11.1	Inibidores de fosfodiesterase-5.....	46
3	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	APÊNDICE A – ARTIGO 1 -TADALAFIL RESTORES LONG-TERM MEMORY AND SYNAPTIC PLASTICITY IN MICE WITH HEPATIC ENCEPHALOPATHY.....	58
	APÊNDICE B – ARTIGO II - cGMP SIGNALING PATHWAY IN HEPATIC ENCEPHALOPATHY NEUROINFLAMMATION AND COGNITION.....	71
	APÊNDICE C – ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DE 2015-2019..	76
	ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA.....	78

1 INTRODUÇÃO

A encefalopatia hepática (EH) descreve o conjunto de alterações neurológicas que ocorrem durante insuficiência hepática aguda ou crônica (LIERE; SANDHU; DEMORROW, 2017). Esta patologia abrange uma ampla gama de distúrbios neuropsiquiátricos que vão desde mudanças mínimas na personalidade ou ritmos circadianos alterados (ciclo de vigília do sono) a alterações na função intelectual, personalidade, consciência e coordenação neuromuscular. Além disso, a EH nos casos mais graves pode levar ao coma e à morte (ERCEG et al., 2006).

A EH é uma complicação frequente na insuficiência hepática ocorrendo em 10-14% dos cirróticos em geral, 16-21% na cirrose descompensada e 10-50% em pacientes com desvio portossistêmico intra-hepático transjugular (TIPS). A EH não observável ocorre em 20-80% dos pacientes com cirrose. O risco de um 1º episódio de EH é de 5-25% nos primeiros 5 anos após o diagnóstico da cirrose, dependendo da presença de fatores de risco e, após o primeiro episódio o risco cumulativo é de 40% de recorrência em 1 ano. Após TIPS a incidência cumulativa em 1 ano é de 10-50% (VILSTRUP et al., 2014). A EH tem um impacto significativo na qualidade de vida do paciente, na habilidade de conduzir veículos, e, recentemente, tem sido associado com o aumento de internações e morte (PATIDAR; BAJAJ, 2015). O transplante hepático muitas vezes é uma das poucas alternativas para esses indivíduos, no entanto, a mortalidade desses pacientes em um ano é maior que 50% (DAMIANI et al., 2013).

A fisiopatologia de EH é multifatorial e envolve agentes como amônia e citocinas inflamatórias. Embora a patogênese da EH esteja relacionada com múltiplos componentes, estes não são bem compreendidos, no entanto a amônia é considerada como mecanismo fisiopatológico primário de EH (ELWIR; RAHIMI, 2017) e afeta principalmente o metabolismo e a função dos astrócitos, levando a perturbações das interações astrocíticas-neuronais e consequentemente ao desequilíbrio da transmissão neural (ALBRECHT; ZIELISKA; NORENBORG, 2010).

Há evidências crescentes de que a inflamação coopera com a hiperamonemia na indução dessas alterações neurológicas em pacientes com EH (DADSETAN et al., 2016). Esses relatos sugerem que a redução da inflamação melhoraria a função cognitiva e motora nestes pacientes.

A via do óxido nítrico - monofosfato cíclico de guanosina (NO-cGMP) desempenha um papel importante no Sistema Nervoso Central pois a acumulação intracelular de GMPc em diferentes modelos experimentais reduz a produção de citocinas pro-inflamatórias, tais como IFN- γ , TNF- α e interleucinas (ILs). Além disso, essa via participa de mecanismos de

aprendizado e memória, protege os oligodendrócitos e modula a ativação da micróglia. Os níveis de cGMP são regulados por fosfodiesterases (PDEs) específicas, enzimas que desagregam a ligação fosfodiéster de cGMP e cAMP. Sendo assim, os inibidores de PDE-5 representam potenciais alvos terapêuticos para doenças neurológicas (NUNES et al., 2012; PEIXOTO, et al., 2015).

Estudos mostraram que tratamento crônico com Tadalafil, um inibidor da PDE-5, melhora a memória espacial em um modelo de Doença de Alzheimer (AD) em ratos e fornece um maior efeito benéfico do que outros inibidores de PDE-5, em doses comparáveis (como por exemplo, o sildenafil). Administração de tadalafil produz uma concentração suficientemente elevada para inibir significativamente a PDE-5 no Sistema Nervoso Central. Análises multivariadas deste fármaco mostram que a utilização do tadalafil pode reverter rapidamente deficiências cognitivas (GARCIA-OSTA et al, 2012).

Portanto, sabendo-se que os inibidores da PDE-5 são potenciais fármacos para o tratamento de neuroinflamação e que dentre esses inibidores o Tadalafil apresenta característica benéficas e superiores aos demais inibidores de PDE-5, o presente estudo se propôs a avaliar os efeitos do Tadalafil nos processos neuroinflamatórios e neurodegenerativos, bem como sobre a capacidade de aprendizado e memória em modelo experimental de EH em camundongos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito e mecanismo da ação do Tadalafil na neuroinflamação e na função cognitiva em camundongos com Encefalopatia hepática induzida por Tioacetamida.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os efeitos do tratamento com Tadalafil sobre as células gliais através dos marcadores GFAP e Iba1;
- Analisar os efeitos do Tadalafil no estresse oxidativo através de dosagens de óxido nítrico e também na neuroinflamação, através dos mediadores inflamatórios NFkB, p38 e ERK e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6;
- Investigar os efeitos do Tadalafil sobre os neurônios e na sinapse através dos marcadores NeuN e sinaptofisina;
- Avaliar o papel do Tadalafil sobre a capacidade de aprendizado e memória através do labirinto de Barnes;
- Investigar o mecanismo de ação do Tadalafil sobre o processo de aprendizagem e memória através da via de sinalização PKA/PKG/CREB/BDNF, da proteína GSK3 β e dos receptores do glutamato (NMDA e AMPA).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENCEFALOPATIA HEPÁTICA

A encefalopatia hepática (EH) é um transtorno desenvolvido no Sistema Nervoso Central (SNC), causado por disfunção hepática. É caracterizada por um largo espectro de manifestações neuropsiquiátricas relacionadas à disfunção motora, cognição, perda de memória e perturbação do ciclo vigília-sono afetando gravemente a vida dos pacientes e seus cuidadores (BLEI AT, CORDOBA J 2001; BAJAJ et al. 2009), além de ser uma complicação potencialmente fatal observada em pacientes cirróticos. Esta síndrome apresenta-se desde sua forma mais branda, a encefalopatia hepática mínima (EHM) ou EH inobservável, sem quaisquer sintomas diagnosticados clinicamente, à forma persistente grave, caracterizada por vários problemas neuropsiquiátricos com o risco de edema cerebral e morte (BLEI AT, CORDOBA J 2001; POH e CHANG 2012).

As disfunções hepáticas do tipo crônico causadas pela hepatite viral, intoxicação por drogas e alcoolismo são prevalentes na população geral e são susceptíveis ao desenvolvimento de sintomas da EH, nas formas moderada e mínima nos pacientes. Adicionalmente, foi descrito que os sintomas evidentes de EH aparecem em 30-50% dos pacientes com cirrose hepática (AMODIO et al., 2001).

A EH produz um amplo espectro de manifestações neurológicas e psiquiátricas não específicas (FERENCI, 2017). Na sua expressão menos grave, a EH altera testes psicométricos orientados para a atenção, memória de trabalho, velocidade psicomotora, e capacidade visuoespacial, bem como medidas cerebrais funcionais e electrofisiológicos (AMODIO, 2004). A medida que a EH progride, mudanças na personalidade, como apatia, a irritabilidade e a desinibição são relatadas e ocorrem alterações na consciência e na função motora. Distúrbios no ciclo sono-vigília, excessiva sonolência diurna são frequentes e os pacientes podem desenvolver desorientação progressiva do tempo e do espaço, comportamento inadequado, estado confusional agudo com agitação ou sonolência, estupor e, finalmente, coma (BAJAJ et al., 2011).

Notavelmente, os sinais mentais (cognitivo ou comportamentais) e motores da EH podem não ser expressos ou não progridem em paralelo em cada indivíduo, produzindo, portanto, dificuldades no estadiamento da gravidade da EH (BACCARANI, 2010).

2.2 CLASSIFICAÇÃO

Inicialmente, a EH era classificada como EH aguda e EH crônica. A EH crônica abrange pacientes com insuficiência hepática crônica, encefalopatia portal sistêmica e/ou cirrose hepática alcoólica e caracteriza-se por comprometimento da função neurológica, incluindo mudanças na personalidade, humor alterado, capacidade intelectual diminuída e tônus e tremor muscular anormais. Enquanto que a EH aguda inclui pacientes com insuficiência hepática aguda (IHA), insuficiência hepática fulminante (IHF) e geralmente ocorre após necrose hepática maciça devido a hepatite viral (hepatite B e C), neoplasias hepáticas, causas vasculares ou exposição a acetaminofeno e outras hepatotoxinas. Além de também está associado a déficit cognitivo, convulsões e coma (JAYAKUMAR; RAMA RAO; NORENBURG, 2014).

Até 2014, os critérios de West Haven era a classificação mais utilizada para a avaliação da gravidade da EH em estudos clínicos e na prática clínica. Uma vez que a avaliação de pacientes com EH leve dependia fortemente da impressão subjetiva do médico para uma evolução da EH para forma mais grave com necessidade de hospitalização, a classificação de West Haven propunha: EH de baixo grau sem necessidade de internação (Grau 0-II West-Haven) e EH de alto grau com internação obrigatória (Grau III-IV West-Haven). Os critérios de West Haven distinguiram quatro graus de EH de acordo com o comprometimento do estado mental, tremores persistente começando com os menos expressos, conforma demonstrado na Tabela 1 (SAVLAN; LIAKINA; VALANTINAS, 2014).

Tabela 1 - Critérios de West Haven para diagnóstico de Encefalopatia Hepática

Estágio	Características
0	Nenhuma anormalidade detectada
I	Falta trivial de consciência Euforia ou ansiedade Falta de atenção Dificuldade em adição e subtração
II	Letargia ou apatia Desorientação pelo tempo Mudança de personalidade aparente Comportamento inadequado
III	Sonolência Responde a estímulos Confuso Desorientação severa Comportamento bizarro

IV	Coma, incapaz de testar o estado mental
-----------	---

Fonte: Munoz, 2008 (adaptada)

Uma classificação mais recente da EH foi proposta pelos membros da Sociedade Internacional para Encefalopatia Hepática e Metabolismo do Nitrogênio (ISHEN) em 2014 c Este grupo recomenda que a EH seja classificada principalmente de acordo com:

1. Doenças de base, sendo a EH é subdividida em:

- Tipo A: resultante do IHA (insuficiência hepática aguda)
- Tipo B: resultante predominantemente de derivação ou desvio portossistêmico (DPS)
- Tipo C: resultante de cirrose

As manifestações clínicas dos tipos B e C são semelhantes, embora apresentem características distintas e possam estar associadas ao aumento da pressão intracraniana e ao risco de hérnia cerebral.

2. Gravidade das manifestações:

- Sem comprometimento (sem qualquer sintoma clínico, neurofisiológico ou mudanças neuropsicométricas)
 - Inobservável (EH mínima e Grau I de acordo com West-Haven)
 - Observável (Grau II ao IV de acordo com West-Haven)

Para fins clínicos e de pesquisa, existe um esquema de tal subdivisão (Tabela 2).

Tabela 2 - Descrição clínica da EH

MH incluindo EHM	ISHEN	Descrição	Crítérios operativos sugeridos	Comentário
Sem comprometimento		Sem qualquer encefalopatia, sem história de EH	Testado e provado como sendo normal	
Mínima	Inobservável	Alterações psicométricas ou neuropsicológicas de testes que exploram as funções de executivas psicomotoras ou alterações neurofisiológicas sem evidência clínica de alteração mental.	Resultados anormais de testes psicométricos ou neuropsicológicos estabelecidos sem manifestações clínicas	Não existem critérios universais para diagnóstico. Necessárias normas e conhecimentos locais
GRADE I		- Ocasional alteração da consciência - Euforia ou ansiedade - Tempo de atenção encurtado - Comprometimento da adição ou subtração - Ritmo de sono alterado	Embora orientado no tempo e no espaço (ver abaixo), o doente parece ter algum declínio cognitivo/comportamental relativamente ao seu habitual no exame clínico, ou para os cuidadores	Achados clínicos geralmente não reprodutíveis
GRADE II	Observável	- Letargia ou apatia - Desorientação temporal - Óbvia alteração da personalidade - Comportamento impróprio	Desorientado quanto ao tempo (pelo menos três dos seguintes itens estão errados: dia do mês, dia da semana, mês, estação ou ano) $\pm$ os outros sintomas mencionados	Achados clínicos variáveis, mas reprodutíveis até certo ponto
GRADE III		- Sonolência a semi-estupor - Reage a estímulos - Confusão - Desorientação profunda - Comportamento bizarro	Desorientado também quanto ao espaço (pelo menos três dos seguintes itens relatados erradamente: país, estado [ou região], cidade ou local) $\pm$ os outros sintomas mencionados	Achados clínicos reprodutíveis até certo ponto
GRADE IV		Coma	Não reage mesmo a estímulos dolorosos	Estado comatoso geralmente reprodutível

Fonte: ASSOCIAÇÃO AMERICANA PARA ESTUDO DE DOENÇAS DO FÍGADO et al., 2014.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A incidência e a prevalência de EH estão relacionadas com a gravidade da insuficiência hepática e do desvio portossistêmico (DPS) subjacentes (BAJAJ, 2010 ; RIGGIO, 2011).

Na EH Tipo A, há um rápido aumento dos níveis de amônia no sangue, sendo difícil manter o controle a doença por causa do difuso edema cerebral, além de estar associada a uma alta mortalidade. Para os pacientes que recebem um transplante, a mortalidade é substancialmente menor. A taxa de sobrevida é superior a 70% nos primeiros 5 anos após o transplante, embora apenas um dos cinco pacientes com insuficiência hepática fulminante receba um transplante (REUBEN, 2016).

Em pacientes com EH e cirrose a mortalidade é de mais de 50% apenas no primeiro ano (RAKOSKI, 2012). A elegibilidade desses pacientes para o transplante de fígado, não está estabelecida de forma decisiva, embora frequentemente os pacientes morram enquanto estão na fila de espera para um transplante. Em pacientes com cirrose, a EH observável é um evento que define a fase descompensada da doença. A EH observável é também relatada em indivíduos sem cirrose e com DPS. A manifestação da EH pode não ser clinicamente óbvia e existem várias ferramentas para a sua detecção, o que influencia a variação nas taxas de incidência e prevalência relatadas (CÓRDOBA, 2011).

Em 2013, a cirrose foi a sétima mais comum causa de morte nos Estados Unidos, com mais de 25 mil mortes por ano. Enquanto que o Brasil reportou mais de 29 mil mortes por ano devido à

cirrose, número duas vezes maior que o encontrado em 1990 e estimou-se que aproximadamente 3.500 novos casos sejam identificados anualmente (SILVEIRA; ISER; BIANCHINI, 2016; TORRES; ABRANTES; BRANDÃO-MELLO, 2013; LESSA, 1996). No entanto, existem poucos estudos nacionais no sentido de determinar a prevalência de EH. Um estudo realizado em um hospital em Santa Catarina, avaliou que 19,1% dos pacientes hospitalizados com cirrose apresentaram EH, identificando que complicações como choque séptico, peritonite bacteriana espontânea e ascite foram indicadores de pior prognóstico. Além disso, esse estudo também demonstrou que a presença de EH esteve altamente associada com maior mortalidade, apresentando uma prevalência 6,04 vezes maior de óbito em relação aos que não apresentaram essa complicação (SILVEIRA; ISER; BIANCHINI, 2016). Semelhantemente, uma pesquisa realizada no Ambulatório de Hepatologia no estado do Pará também relatou que 19% dos pacientes cirróticos apresentavam EH e alegou que esta síndrome era a terceira complicação mais observada nos pacientes com cirrose (KELLY; COSTA; BRILHANTE, 2016).

2.4 MECANISMO DA AMÔNIA NA NEUROTOXICIDADE

A amônia é produzida a partir do metabolismo das proteínas, aminoácidos, purinas e pirimidinas. Cerca de metade da amônia presente no intestino é sintetizada por bactérias, o restante é proveniente da dieta e da glutamina. A maior parte da amônia é absorvida pelo intestino, drenado para o fígado pela veia porta e desintoxicado para formar ureia (ATLURI; PRAKASH; MULLEN, 2011).

A disfunção hepática, derivação portossistêmica ou alterações no ciclo da ureia, aumentam os níveis de amoníaco no sangue e causam EH. A lesão hepática, de natureza aguda ou crônica, reduz sua capacidade de metabolizar a amônia e isso causa aumento do níveis de amônia nos tecidos extra-hepáticos, o que pode resultar em hiperamonemia até cinco vezes maior do que os níveis normais de amônia no sangue (ALDRIDGE; TRANAH; SHAWCROSS, 2015).

Os mecanismos de reserva de desintoxicação de amônia ocorrem nos músculos esqueléticos, rins e cérebro. Os músculos esqueléticos, contém a enzima glutamina sintetase sendo um local importante para o metabolismo da amônia na cirrose. No entanto, é comum que os músculos de pacientes com cirrose hepática progressiva se tornem atroficos e esse caminho de desintoxicação da amônia falhe com o tempo. Os rins também expressam glutamina sintetase e desempenham um papel fundamental no metabolismo e excreção de amônia. Em níveis elevados, a amônia atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) e o cérebro atua como uma via alternativa para desintoxicar a amônia através

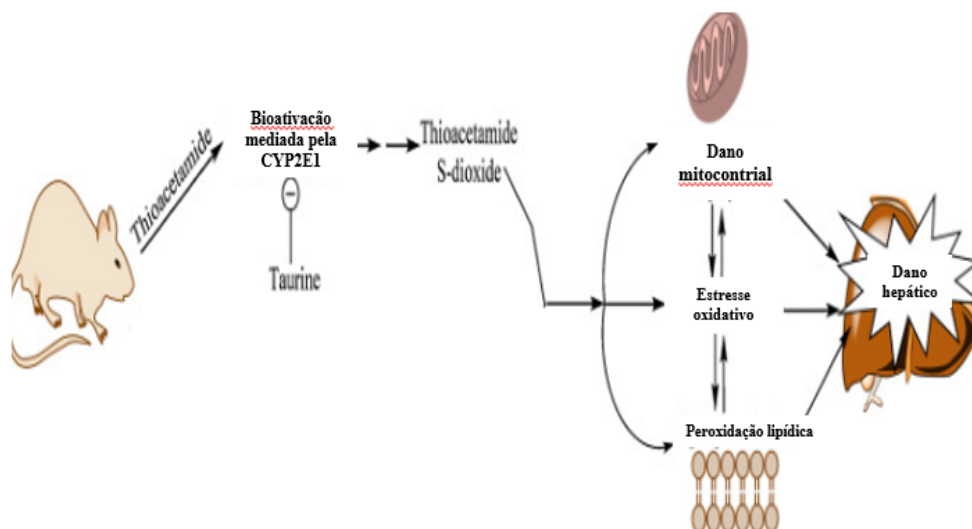
sinápticos excitatórios e inibitórios (WOLF, 2016). Sendo assim, a amônia desempenha um papel fundamental na patogênese da EH.

2.4.1 Mecanismo da tioacetamida em modelo animal de EH

A EH pode ser induzida em modelos animais através de hepatotoxinas e procedimentos cirúrgicos como o desvio portossistêmico (BUTTERWORTH et al., 2009). A administração da hepatotoxina tioacetamida (TAA) foi inicialmente validada como um modelo de insuficiência hepática aguda com EH que causa comprometimento da função hepática, declínio neurológico, aumento da amônia cerebral e edema cerebral, além de apresentar características histológicas e bioquímicas semelhantes à cirrose em humanos (GRANT et al., 2018).

A TAA causa necrose hepatocelular após biotransformação pelo citocromo CYP2E1, resultando na formação do metabólito ativo TAA-S-dióxido. A hepatotoxicidade da TAA ocorre devido à geração de radicais livres e estresse oxidativo (Figura 2) (ZIMMERMAN et al., 1989). A cirrose hepática prejudica a conversão de amônia em ureia e níveis altos de amônia são tóxicos para o sistema nervoso, além de afetar a disponibilidade de GABA (ácido gama-aminobutírico), principal neurotransmissor inibidor no cérebro; prejudica a neurotransmissão, e subsequentemente, a função neurológica (FITZ, 2002). A administração de TAA em camundongos é utilizado como modelo experimental estabelecido de EH (HONDA et al., 2002; FERNANDEZ-MARTINEZ et al., 2004; SCHNUR et al., 2004).

Figura 2 - Mecanismo do tioacetamida em modelo experimental da EH.



A TAA causa necrose hepatocelular após biotransformação pelo citocromo CYP2E1, resultando na formação do metabólito ativo TAA-S-dióxido. A hepatotoxicidade da TAA ocorre devido à geração de radicais livres e estresse oxidativo Fonte : HEIDATI, 2016

2.5 ASTRÓCITOS E O SEU PAPEL NA HOMEOSTASE CEREBRAL

Os astrócitos são as células mais abundantes do Sistema Nervoso Central e conceitualmente, são responsáveis por praticamente todas as tarefas homeostáticas concebíveis que ocorrem no desenvolvimento e funcionamento do SNC. Os astrócitos estão envolvidos em numerosas funções no cérebro, como a provisão de nutrientes e suporte mecânico para os neurônios circundantes; regulação do transporte de íons, captação e liberação de diversos neurotransmissores, tendo um papel crítico no metabolismo dos neurotransmissores como o glutamato (excitatório) e GABA (inibitório); são indispensáveis para o transporte de água e para a captura de espécies reativas de oxigênio (EROs); participação na formação da barreira hematoencefálica; secreção de fatores neurotróficos essenciais para a sobrevivência e diferenciação dos neurônios e oligodendrócitos (STIPURSKY, 2010; 2011; 2012; VOLTERRA; MELDOLESI, 2005; ULRICH, 2010); na sinaptogênese e na maturação sináptica, sendo as células astrogliais obrigatórias para a formação de pelo menos 50% das sinapses do SNC. Essas células também controlam as sinapses através da secreção de múltiplos fatores (como trombospondinas, colesterol ou neuregulinas). É importante ressaltar que os astrócitos parecem participar ativamente da plasticidade sináptica (ULLIAN, 2001) e da formação da memória (HAN, 2013)(ALDRIDGE; TRANAH; SHAWCROSS, 2015; ATLURI; PRAKASH; MULLEN, 2011).

As capacidades homeostáticas dos astrócitos são de suma importância para a função do SNC em condições fisiológicas e, naturalmente, são críticas para a resposta do cérebro a insultos patológicos de qualquer etiologia. Em condições patológicas, ocorre a astrogliose reativa, que promove o remodelamento da bioquímica celular, estrutura e função na tentativa de conter o desenvolvimento patológico. A reatividade astrogliar tem sido considerada como puramente patológica e é definida como hipertrofia e proliferação astrocítica que acompanha um aumento de componentes citoesqueléticos, como a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), vimentina e nestina (PEKNY ; NILSSON, 2005; SOFRONIEW, 2009; SOFRONIEW, 2010). O aumento da expressão de GFAP é considerado como um marcador específico para a resposta astrogliótica (VERKHRATSKY; PARPURA, 2016).

Astrócitos reativos têm uma redução na sua capacidade de sequestrar espécies reativas

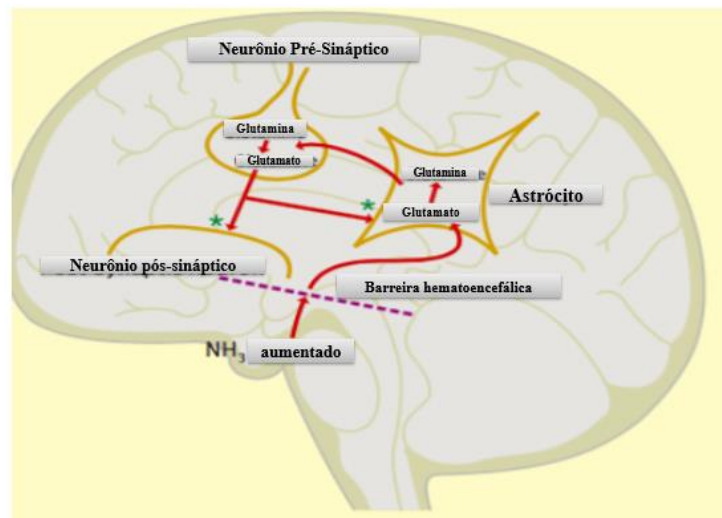
de oxigênio, devido à diminuição na liberação de enzimas antioxidantes. Como os astócitos são as principais células de defesa antioxidante no tecido nervoso, os níveis de radicais livres e outros tipos de espécies reativas de oxigênio aumentam significativamente em diversas patologias com reatividade astrocitária. Associado a isso, quando reativos, os próprios astrócitos são mais vulneráveis a desbalanços metabólicos e mitocondriais, o que os torna também produtores de estresse oxidativo. Além disso, a capacidade de regular os níveis de neurotransmissores como o glutamato na fenda sináptica pelos astrócitos, também é prejudicada. (RAO, 2003). A desregulação da resposta astrogliar às lesões cerebrais pode contribuir para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e para o desfecho de outras lesões, como acidente vascular cerebral (AVC) (BURDA, BERNSTEIN, & SOFRONIEW, 2016; CORREALE E FAREZ, 2015; HENEKA ET AL., 2015; LIU & CHOPP, 2016). Portanto, a gliose reativa é uma resposta complexa que afeta a sobrevivência e a regeneração neuronal. (ACAZ-FONSECA, 2016; ARBO, 2016);

Portanto, a sinalização entre neurônios e astrócitos desempenha um papel crucial tanto no processamento da informação que o cérebro realiza, além de ter um papel crucial na patogênese de doenças neuroinflamatórias e neurodegenerativas (GUNDERSEN; STORM-MATHISEN; BERGERSEN, 2015).

2.5.1 Efeito da hiperamonemia sobre os astrócitos

Hiperamonemia é o principal fator responsável pelas alterações neurológicas na EH (FELIPO, 2002). A amônia que se acumula no sangue é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, onde é metabolizada pelos astrócitos (PAREKH, 2015). Essas células possuem em seu interior a enzima glutamina sintase a qual converte amônia através da amidação do glutamato, em glutamina (Figura 3) (RACKAYOV, 2016; NORENBORG, 1979).

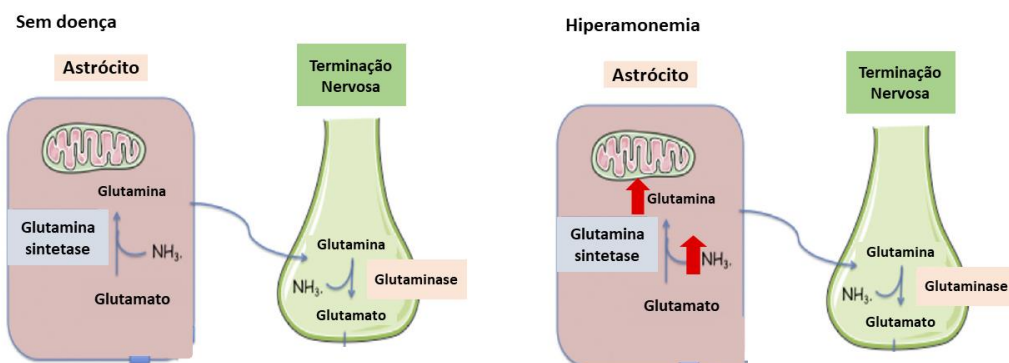
Figura 3: Ação da amônia no cérebro.



A barreira hematoencefálica é permeável a NH_3 (amônia) e os níveis aumentados desse metabólito causa o aumento do glutamato extracelular. O glutamato metabolizado nos astrócitos é convertido em glutamina e induz edema nessas células. Fonte: MCAVOY, 2006 (Adaptada).

Embora a glutamina seja geralmente considerada neuronalmente, as mudanças em sua concentração alteram a sinalização dos astrócitos e também influenciam a ação do glutamato (MCAVOY; HAYES, 2007). A hiperamonemia aumenta a produção e acumulação de glutamina nos astrócitos, induzindo ao aumento da pressão osmótica, edema de astrócitos e aumento da disfunção astrocítica por estresse oxidativo (Figura 4).

Figura 4: Neurotoxicidade da amônia no astrócito



Em um quadro de hiperamonemia os elevados níveis de amônia induz ao edema. Fonte: JACQUE, 2006 (Adaptada)

Este fenômeno de edema dos astrócitos foi demonstrado no contexto tanto de insuficiência hepática aguda (BLEI et al., 1994) quanto crônica (HÄUSSINGER et al., 2000). Astrócitos

edemaciados, promovem aumento da formação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, principalmente através da ativação da NADPH oxidase e da sintase do óxido nítrico (CARBONERO-AGUILAR et al., 2011; GÖRG; SCHLIESS; HÄUSSINGER, 2013; HÄUSSINGER; GÖRG, 2010). Isso pode resultar em edema cerebral e hipertensão intracraniana observado especialmente em pacientes com insuficiência hepática aguda (ATLURI; PRAKASH; MULLEN, 2011), além de reduzir os níveis cerebrais de glutamato, alterar seus mecanismos de reabsorção e regular para baixo os receptores do glutamato nos neurônios pós-sinápticos (MCAVOY; HAYES, 2007).

A sobrecarga da via de glutamina sintetase e o desequilíbrio do processamento normal de glutamato-glutamina foram considerados, durante muito tempo, o primário e o único mecanismo patológico de lesão cerebral induzida por hiperamonemia (BRUSILOWET AI, 2010 ;. BUTTERWORTH, 2011; RAO, 2014). No entanto, a patogênese molecular é muito mais complexa, pois a exacerbada exposição à amônia altera a expressão de canais de potássio (K^+) e dos canais de cálcio (Ca^{2+}) nos astrócitos, comprometendo a homeostase de K^+ e Ca^{2+} no SNC (OBARA-MICHLEWSKA, 2014; RANGROO THRANE, 2013; HAACK, 2014; LIANG, 2014); causa elevações patológicas de sódio (Na^+) no citosol astrogliar; danifica o transporte de H^+ nos astrócitos, afetando a homeostase do pH (KELLY, 2009 ; KELLY E ROSE, 2010) e desencadeia a liberação patológica de glutamato pelos astrócitos (MONTANA et al., 2014). Além disso, hiperamonemia prejudica a secreção astrogliar da trombospondina-1, o que pode afeta negativamente sinaptogênese (JAYAKUMAR, 2014). Ao todo, a hiperamonemia provoca uma rápida perda da capacidade homeostática astrogliar, que resulta em sintomas neurológicos graves, rápida deterioração do SNC e morte.

2.6 ATIVAÇÃO MICROGLIAL E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DA EH

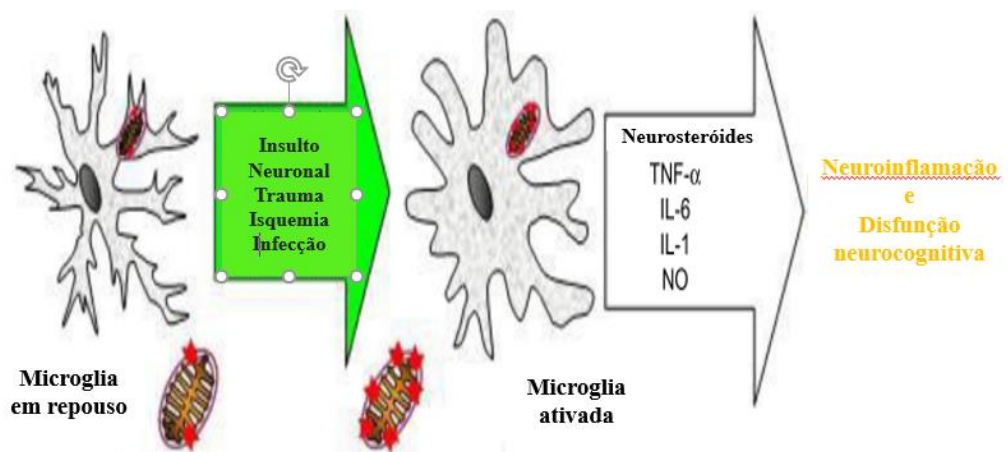
As micróglia representam as células imunes residentes do cérebro e desempenham um importante papel na vigilância imunológica do SNC (GUNDERSEN; STORM-MATHISEN; BERGERSEN, 2015).

Além dos mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo desenvolvimento de edema de astrócitos / edema cerebral, estudos têm demonstrado que a ativação microglial e a subsequente síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias estejam envolvidos no desenvolvimento da EH (RODRIGO, 2010; JIANG, 2009). A micróglia pode ser ativada devido

a um dano cerebral e também por um grande número de fatores, incluindo glutamato, citocinas pró-inflamatórias, lipopolissacarídeo (LPS), amônia, bem como por potássio extracelular (GARDEN, 2006), e quando é ativada pode produzir uma grande variedade de citocinas. A ativação microglial também foi identificada em modelos experimentais de hiperamonemia (GORG, 2013), bem como em tecido cerebral obtido na autópsia de pacientes com insuficiência hepática aguda (IHA) (BUTTERWORTH, 2011). A exacerbada liberação de citocinas pela micróglia após exposição a amônia, também pode induzir a ativação astrogliar na EH (ROMERO-GÓMEZ; MONTAGNESE; JALAN, 2015).

A micróglia ativada, por sua vez, pode liberar as citocinas pró-inflamatórias interleucina 1 alfa ($IL-1\alpha$), interleucina 1 beta ($IL-1\beta$) e fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$), todas as quais desempenham um papel crucial na neuroinflamação e demonstraram estar envolvidas nos mecanismos moleculares subjacentes à cognição (Figura 5) (MCAFOOSE; BAUNE, 2009). Estudos demonstraram que a ativação microglial foi observada em cérebros de ratos com IHA no momento do coma. Além disso, observaram aumento dos níveis de $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$ e $IL-6$ no cérebro desses animais. As citocinas pró-inflamatórias correlacionaram-se bem com a progressão da encefalopatia e o início do edema cerebral (JIANG, 2009). Também foi demonstrado ativação microglial em modelos de ratos com EH, induzido por desvio portacaval, ligadura do ducto biliar (BDL) ou através de dieta com amônia (AGUSTI et al., 2011; CHEN RJ et al., 2014; HERNANDEZ-RABAZA et al., 2016).

Figura 5: Representação da ativação microglial.



Trauma, isquemia, infecções e outros podem induzir a ativação da micróglia. A micróglia ativada, por sua vez, libera citocinas pró-inflamatórias $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$ e fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$), todas as quais desempenham um papel crucial na neuroinflamação. Fonte: VIJAY, 2015 (adaptada).

2.7 NEUROINFLAMAÇÃO

A inflamação do sistema nervoso central possui grande importância para a maioria das doenças neurológicas. Além da hiperamonemia, a inflamação e as citocinas são considerados os principais componentes no desenvolvimento de EH. A neuroinflamação é uma característica comum a todos os tipos de EH e é modulada pelos astrócitos e principalmente pela micróglia (LIERE; SANDHU; DEMORROW, 2017; MANI; NATESAN; ARUMUGAM, 2017; RODRIGO et al., 2010).

Estudos mostram que em paciente em estágio avançado de EH na IHA, os astrócitos produzem uma série de citocinas pró-inflamatórias tais como Fator de necrose tumoral α (TNF- α), Interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) (JIANG W, et al., 2009; WRIGHT et al., 2014). Semelhantemente, em modelos animais com IHA, ocorre ativação da micróglia e produção local de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) (ARULKUMARAN et al., 2011), cuja liberação de citocinas e quimiocinas eventualmente causam danos e morte neuronal (SCHWAB; MCGEER, 2008). Bemeur e colaboradores relataram que camundongos com EH e deficientes dos receptores de TNF- α , IL-1 β e IL-6, apresentaram edema cerebral em menor grau quando comparados com camundongos selvagens (BEMEUR et al., 2010), e que o etanercept, uma molécula neutralizadora de TNF- α , inibiu os estágios iniciais da EH e o coma (CHASTRE et al., 2012).

As evidências sugerem que as toxinas geradas devido à insuficiência hepática (além de citocinas) também podem desempenhar um papel na patogênese da neuroinflamação na EH. Uma ampla gama de moléculas com potencial para ameaçar a integridade funcional do cérebro têm capacidade para provocar a transformação da micróglia no estado de repouso ao estado ativado. Tais moléculas incluem amônia, lactato, glutamato, manganês e neuroesteróides (ROGER, 2011), cujas concentrações encontram-se aumentadas no cérebro durante a insuficiência hepática.

Estudos fornecem evidências de sinergismo entre amônia e citocinas no nível celular / molecular no cérebro (CHASTRE et al., 2010). A exposição de culturas primárias de astrócitos corticais de rato à IL-1 β e à amônia resultou em aumentos significativos na expressão de genes que codificam o óxido nítrico induzível (iNOS). Os efeitos da amônia e da citocina foram sugestivos de sinergismo e levou ao aumento do estresse oxidativo / nitrosativo no cérebro dos animais com IHA (BUTTERWORTH, 2011).

Além das citocinas pró-inflamatórias serem destrutivas para os neurônios, também provocam alteração de proteínas sinápticas como a sinaptofisina. Portanto, a resposta neuroinflamatória pode induzir a perda de proteínas sinápticas e assim contribuir para o comprometimento cognitivo em doenças neurodegenerativas (LIU et al., 2018; RAO et al., 2012). Segundo Odeh e colaboradores

(2004), a inflamação coopera com hiperamonemia na indução de alterações neurológicas em pacientes com EH (ODEH et al, 2004). Esse relato sugere que a redução da inflamação melhoraria a função cognitiva e motora nestes pacientes (RODRIGO et al, 2010). Portanto, um procedimento para interferir na ativação da micróglia e reduzir a neuroinflamação seria útil para melhorar a função cognitiva e motora na EH.

2.7.1 Mediadores inflamatórios na modulação e manifestação da EH

O Fator nuclear- κ B (NF κ B) apresenta um papel essencial e benéfico em condições fisiológicas, no entanto o aumento desse fator de transcrição implica na patogênese de várias doenças, incluindo as inflamatórias (HEYNINCK, 2003). Vários estudos têm demonstrado que o NF κ B desempenha um papel importante na regulação dos genes responsáveis pela geração de mediadores da resposta inflamatória, tais como TNF- α e IL-1 β , desempenhando um papel regulatório no crescimento, diferenciação e ativação de células imunes (SCHINS et al., 2000).

O NF κ B pode ser ativado por uma variedade de estímulos, tais como infecção, citocinas, estresse genotóxico (OECKINGHAUS et al., 2009) e pela toxicidade da amônia (SINKE et al., 2008). Estudos mostraram que a hiperamonemia aumenta significativamente a expressão da subunidade p65 nuclear do NF κ B no hipocampo (LIU et al., 2018; ZHANG et al., 2015).

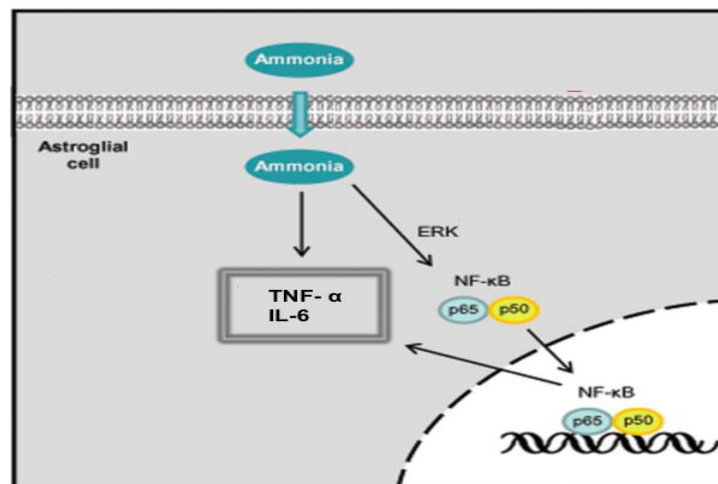
O NF κ B reside no citosol sob a forma inativa, como um dímero das subunidades RelA e p50. Devido à sua ligação com a proteína inibitória I κ B α (ou I κ B), o NF κ B é incapaz de se translocar para o núcleo. Na sua via clássica de ativação, o I κ B α é fosforilado e subsequentemente degradado no proteossomo. Desta forma, o NF κ B é translocado para o núcleo, onde ativará a transcrição de vários genes pró-inflamatórios como o TNF- α , IL-1 β e IL-6 (VAN BERLO, 2010).

Estudos relatam que além do NF κ B, outros fatores inflamatórios como óxido nítrico (NO), NADPH oxidase e a consequente geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) são ativados pela amônia em cultura de astrócitos e em modelo animal de EH. Além disso, a inibição desses fatores mostrou reduzir o edema dos astrócitos induzido pela amônia (JAYAKUMAR et al., 2011, 2009; SINKE et al., 2008).

Jayakumar e colaboradores relatam que a inibição farmacológica do NF κ B reduz a produção de citocinas, o edema dos astrócitos após a exposição à amônia e destaca o envolvimento crítico desse fator de transcrição no mecanismo de edema cerebral (JAYAKUMAR et al., 2011).

As MAPKs como ERK e p38 também participam da modulação da EH. A amônia também pode induzir à ativação de NFκB através da estimulação das MAPKs como a ERK e p38, conforme demonstra a Figura 6 (BUBICI et al., 2006; KYRIAKIS; AVRUCH, 2001; SINKE et al., 2008). Segundo Bobermin, sob exposição da amônia, um inibidor da ERK reduziu o aumento de citocinas inflamatórias, como TNF-α, IL-1β e IL-6 (BOBERMIN, 2012). Da mesma forma, a ativação do NFκB é diminuída por antioxidantes e por inibidores de MAPKs, indicando um papel da MAPK na ativação de NFκB induzida por amônia. A ativação da via p38 como resultado do estresse oxidativo também parece mediar o edema astrocítico induzido por amônia (JAYAKUMAR, 2006). Por outro lado, inibidores da p38 reduzem a ativação microglial em ratos com EH, inibem o NFκB (GOEBELER et al., 2001) e diminuem a produção de marcadores inflamatórios no cérebro (atividade da ciclooxigenase, PGE2, iNOS, TNF-α e IL-1β) o que contribui para a eliminação da neuroinflamação (WILMS et al., 2003). Interessantemente, a redução da neuroinflamação nestes ratos tratados com inibidor de p38, foi associada com a restauração da capacidade de aprendizagem e atividade motora (AGUSTI et al., 2011). Estes dados sugerem que a inibição de ERK e p38 pode ser útil para reduzir a neuroinflamação e melhorar a função cognitiva e motora em pacientes com EH.

Figura 6 - Cascata de sinalização dos marcadores inflamatórios na EH.



Fonte: BOBERMIN, 2012 (Adaptada)

Em conjunto, esses achados sugerem fortemente que a amônia é capaz de induzir uma resposta inflamatória no cérebro através de vários mediadores inflamatórios e que tais efeitos podem contribuir para o edema cerebral na IHA.

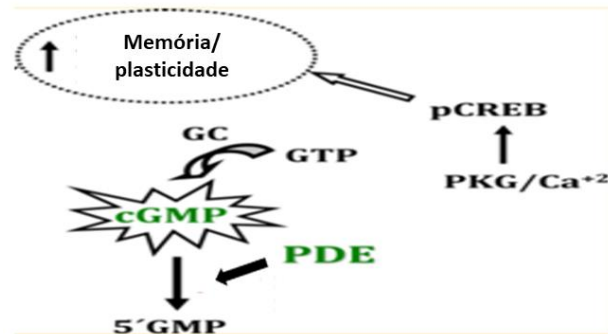
2.8 MECANISMO DE SINALIZAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: O SISTEMA MENSAGEIRO

Os nucleotídeos cíclicos monofosfatados, AMP e GMP, são importantes mediadores intracelulares de várias moléculas de sinalização e regulam inúmeros processos intracelulares, tais como motilidade do músculo liso, homeostase de eletrólitos, sinais neuroendócrinos e respostas inflamatórias (REDER et al., 1995; TANAKA et al., 1997; BALTRONS et al., 2003; UCKERT et al., 2006; CHUNG, 2006). Tanto o AMPc quanto GMPc, são expressos em regiões do prosencéfalo no cérebro, incluindo o córtex cerebral e o hipocampo, regiões conhecidas por estarem envolvidas na aprendizagem e memória, bem como nos órgãos periféricos (Stephenson et al. 2009; Van Staveren et al. 2003). Em síntese, além as vias de sinalização do GMPc e AMPc inibirem a inflamação prevenindo os tecidos contra danos causados por esse processo (ZHU et al., 2001; KHOSHAKHLAQH et al., 2007), essas vias também desempenham um papel importante no processo de aprendizado e memória.

O AMPc é sintetizado a partir da adenosina trifosfato (ATP) por uma proteína transmembrana chamada adenilato ciclase (AC). A ativação da AC aumenta a produção de AMPc, esse aumento desencadeia a ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e subsequente fosforilação e ativação do fator de transcrição da proteína de ligação ao elemento de resposta AMPc (CREB), que por sua vez inicia a produção de outros fatores de crescimento e proteínas citoesqueléticas necessárias para a estabilização da memória, sendo um indicador de plasticidade sináptica (TULLY, 1997; YIN et al 1996). Similarmente, a ativação da óxido nítrico sintase (NOS) aumenta a produção de NO, que, por sua vez, ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) e aumenta a produção de cGMP. Isso leva à ativação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG), que também é capaz de fosforilar e ativar o CREB (Figura 7) (LUEPTOW; ZHAN; O'DONNELL, 2016). O GMPc também pode ativar a via do AMPc ativando os receptores intracelulares do AMPc, como a PKA (CORBIN; FRANCIS, 1999).

O GMPc produzido pela enzima GC é degradado por uma ou mais fosfodiesterases (PDEs). Os efeitos fisiológicos deste nucleotídeo cíclico são determinados pelas atividades de três tipos de receptores intracelulares: proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG), canais iônicos regulados por GMPc e PDEs reguladas por GMPc (LINCOLN e CORNWELL, 1993; CORBIN e FRANCIS, 1999). A PDE5 é encontrada em algumas regiões do cérebro e cerebelo e sua inibição resulta em um acúmulo de GMPc.

Figura 7 - Via de sinalização GMPc-PKG-PDE.



Fonte: GARCIA, 2012 (Adaptada)

O GMPc exerce um importante papel como mediador das ações do NO que é um radical livre gasoso produzido por diferentes tecidos com ação em diversos processos fisiológicos, inclusive na inflamação (TOUSOULIS et al., 2012). NO é produzido por diferentes isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), expressas constitutivamente em neurônios e células do endotélio (nNOS e eNOS, respectivamente) ou produzida pela iNOS quando ativada por agentes danosos (FORSTERMANN; SESSA, 2011; LINEHAN et al., 2004). Condições que levam ao aumento excessivo de EROs ou a maior produção do NO, no entanto, rompem essa homeostase. Pois EROs quando em níveis elevados, interagem com o óxido nítrico e reduzem a sua biodisponibilidade. Esta interação vai resultar na produção de espécies reativas de nitrogênio implicadas nos danos oxidativos e nitrosativos (HSIEH, 2014).

O estresse oxidativo também tem sido implicado na neurotoxicidade da amônia (Jayakumar, 2006). Um dos efeitos metabólicos da neurotoxicidade da amônia incluem alterações nos níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (NORENBERG; JAYAKUMAR; RAMA RAO, 2004). Além da amônia, foi demonstrado que em astrócitos cultivados e em cérebro de ratos, citocinas inflamatórias, benzodiazepinas e hiponatremia induzem a rápida formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (GÖRG et al., 2006; MURTHY et al., 2001). Assim, como exemplo, a citocina pró-inflamatória TNF- α , desempenha um papel importante na produção de EROs e potencializa a produção de NO em astrócitos (SHEN, 2006). Em resumo, o estresse oxidativo representa um componente fundamental na patogênese da EH.

Por outro lado, o NO também desempenha um importante papel no aprendizado através da sua mediação pela GCs e aumento de GMPc. Sendo assim, o comprometimento da via glutamato/NO/GMPc no cérebro de indivíduos com hiperamonemia e insuficiência hepática podem contribuir para a comprometimento cognitivo na EH (ERCEG et al., 2006).

2.9 VIAS DE SINALIZAÇÃO NA MEMÓRIA E PLASTICIDADE SINÁPTICA

Nas últimas décadas a pesquisa avançou de forma significativa na análise e compreensão do aprendizado e memória. A memória pode ser dividida em processos separados como: codificação, armazenamento, consolidação e evocação (KANDEL, 2014). Neste trabalho demos ênfase no armazenamento e consolidação da memória.

A consolidação da memória é o processo pelo qual a informação recém-adquirida é estabilizada e armazenada (KANDEL, 2001). A consolidação é uma função cerebral muito complexa que requer mecanismos moleculares específicos e evolui em dois estágios ao longo do tempo: uma fase de curto prazo e uma fase de longo prazo, que diferem entre si (SQUIRE; BARONDES, 1973).

As formas mais bem estudadas de plasticidade sináptica no SNC são a Potenciação a longo prazo (LTP) e Depressão de longo prazo (LTD) da transmissão sináptica excitatória. Os mecanismos moleculares da LTP e LTD foram extensivamente caracterizados e têm sido propostos como modelos celulares de aprendizado e memória (SONG; HUGANIR, 2002).

A Potenciação de Longo Prazo (LTP), é um componente da plasticidade sináptica relacionado com o fortalecimento das conectividades sinápticas e contribui no aprendizado e consolidação da memória (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; CABRERA-PASTOR et al., 2016; KANDEL, 2001). A LTP é dividida em 2 estágios: LTP de fase precoce (E-LTP) e LTP de fase tardia (L-LTP). Um único estímulo de alta frequência, induz um aumento transitório da eficácia sináptica, na chamada E-LTP e promove a modificação das sinapses preexistentes na fase de curto prazo. Por outro lado, repetidas estimulações de alta frequência induz a L-LTP, que promove a síntese de novas proteínas responsáveis por mudanças estruturais necessárias para a estabilização da memória (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; BUTTERWORTH, 1997). A LTP precoce e tardia também envolvem diferentes vias de sinalização. A via NO-GMPc-PKG e a AMPc/PKA contribuem para a L-LTP e ambas estão envolvidas diferencialmente nas fases distintas do processo de consolidação da memória. Por exemplo, na região CA1 do hipocampo, a L-LTP é induzida pela PKA, enquanto a E-LTP não é dependente de PKA (KANDEL, 2001). Ao GMPc foi atribuído um papel na consolidação inicial da memória, enquanto o AMPc está implicado nos processos de consolidação tardia (Izquierdo et al, 2006; Rutten et al, 2007b). No entanto, ainda não está claro como esses processos de memória mediada por nucleotídeos cíclicos estão ligados uns aos outros.

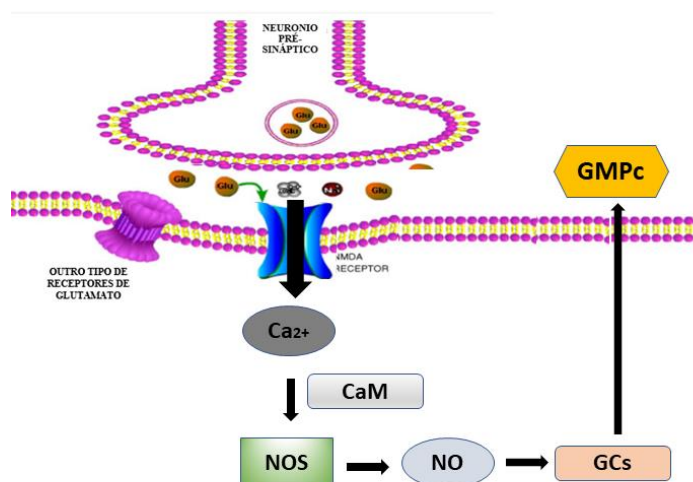
2.9.1 Modulação dos receptores do glutamato na plasticidade sináptica

Existem vários mecanismos subjacentes que cooperam para alcançar a plasticidade sináptica, incluindo mudanças na quantidade de neurotransmissores liberados em uma sinapse e o quanto efetivamente as células vão responder aos neurotransmissores. Os receptores do glutamato *N*-metil-D-aspartato (NMDA) e α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionico (AMPA) são dois dos subjacentes mecanismos moleculares envolvidos na plasticidade sináptica (GAIARSA, 2002).

Durante a transmissão sináptica basal, o glutamato, que é um dos principais neurotransmissores excitatórios do SNC, é liberado pré-sinápticamente, liga-se predominantemente a dois subtipos diferentes de receptores de glutamato ionotrópico (iGluRs), o receptor AMPA e o receptor NMDA e produzem uma despolarização na membrana pós-sináptica (WEN; SCHROETER; KLOCKER, 2013). Embora essas classes de receptores respondam principalmente ao glutamato, os papéis desempenhados por cada classe de receptor são distintos. Os receptores AMPA e NMDA medeiam a maioria das transmissões sinápticas excitatória, são cruciais para a indução de formas específicas de plasticidade sináptica e desempenham papéis importantes em vários distúrbios neuropsiquiátricos (SONG; HUGANIR, 2002).

O LTP dependente de receptor de NMDA no hipocampo, resulta em aumento de cálcio no neurônio pós-sináptico. O cálcio liga-se à calmodulina (CaM) e ativa a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), aumentando NO, o qual ativa a GCs, aumentando assim o GMPc (Figura 8). A ativação desta via do glutamato-NO-GMPc-PKG no hipocampo é necessária para indução e manutenção adequada da LTP (MONFORT; FELIPO, 2002).

Figura 8 - Via de sinalização glutamato-NO-GMPc-PKG dependente de receptor NMDA

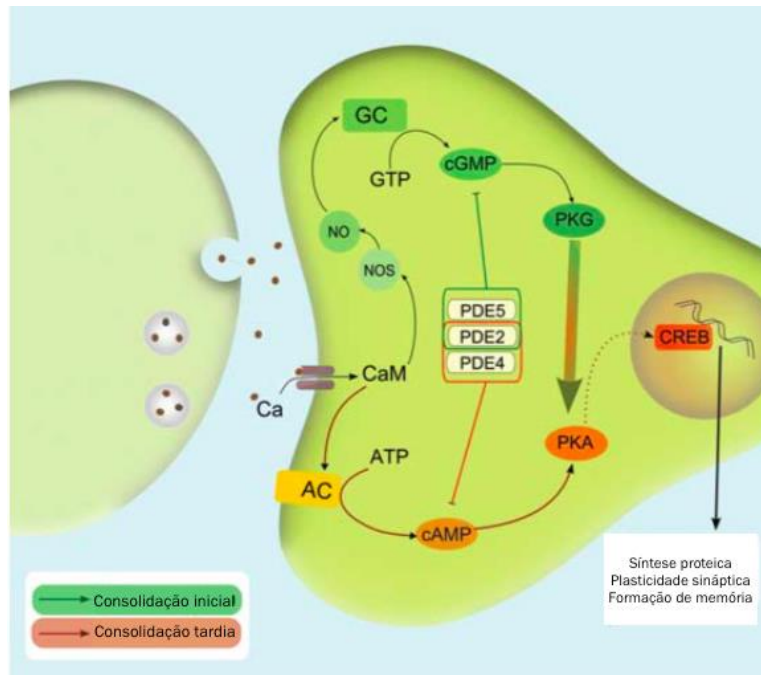


A ativação dos receptores NMDA leva ao aumento do cálcio intracelular que se liga à calmodulina e ativa diferentes enzimas, incluindo a óxido nítrico sintase neuronal, levando ao aumento da produção de óxido nítrico (NO), que ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs), resultando em aumento da formação de GMPc. Parte do GMPc formado é liberado para o fluido extracelular. Fonte: RODRIGO, 2006 (Adaptada).

Por outro lado, alterações nessa via são responsáveis por algumas das alterações neurológicas encontradas na EH, tais como ritmos circadianos alterados ou prejuízo da função intelectual (MONFORT et al., 2007; MONTOLIU et al., 2010).

Além disso, através da via glutamato/NO/PKG e da AMPc/PKA ocorre a fosforilação de um importante fator de transcrição relacionado com a plasticidade sináptica, o CREB e a sua fosforilação é um passo fundamental na indução da potencialização (LU; KANDEL; HAWKINS, 1999). O CREB é um componente chave de diversos processos fisiológicos, incluindo o desenvolvimento do sistema nervoso e a sobrevivência celular, desempenhando um papel essencial na regulação da transcrição de genes envolvidos na plasticidade sináptica e desencadeia a LTP (BENITO; BARCO, 2010). A ativação dessa proteína promove a transcrição de genes como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) que possui efeitos neuroprotetores e está relacionado ao aprendizado e à memória e, portanto, promove o armazenamento da memória de longo prazo (Figura 9) (KIM et al., 2017; PEIXOTO; NUNES; GARCIA-OSTA, 2015)

Figura 9 - Via de sinalização da CREB



A ativação de receptores NMDA, provoca o aumento dos níveis de Ca^{2+} nos neurônios pós-sinápticos. O Ca^{2+} se liga a CaM a qual estimula a NOS a produzir NO. O NO ativa a GC a converter GTP em GMPc, resultando na ativação da PKG (Consolidação inicial da memória). A CaM quando ativada estimula a AC a converter ATP em AMPc, resultando na ativação da PKA (Consolidação tardia da memória). PKG e PKA ativam a CREB, fator de transcrição relacionada com a plasticidade sináptica e formação de memória. Fonte: BOLLEN et al., 2014 (Adaptada).

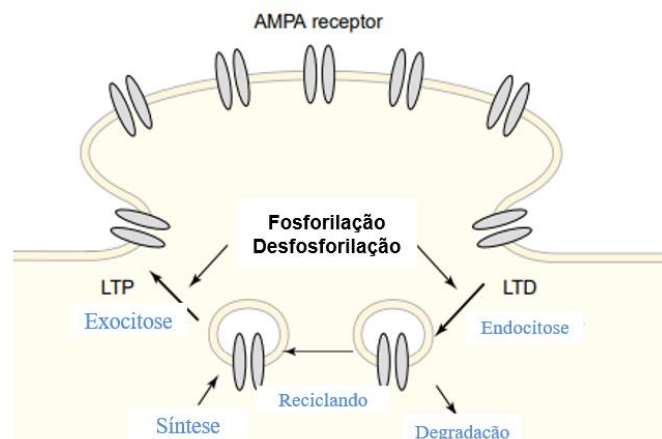
É importante ressaltar que a desregulação da cascata de transcrição da CREB após uma série de distúrbios neurodegenerativos, provoca alteração da viabilidade celular e da função cognitiva (SAKAMOTO; KARELINA; OBRIETAN, 2011). O comprometimento no aprendizado e na memória de indivíduos com EH pode estar relacionado com a desregulação da cascata de transcrição da CREB, visto que as vias do GMPc/PKG e AMPc/PKA estão alteradas em modelo de EH.

Diante disso, estratégias terapêuticas direcionadas no aumento da transcrição mediada por CREB, parecem ser benéficas tanto para o aumento da plasticidade sináptica quanto para a promoção de neuroproteção após lesão no SNC e em várias neuropatologias.

Além dos receptores NMDA, os receptores AMPA também são essenciais na plasticidade sináptica. AMPA são receptores de glutamato ionotrópicos que medeiam a rápida transmissão sináptica no SNC e modulam a função cognitiva e motora (CABRERA-PASTOR et al., 2018a). Esse receptor é composto por quatro subunidades (GluA1 a GluA4), está presente no neurônio pós-sináptico e é responsável por regular as transmissões sinápticas de rápida excitação (MAYER, 2005). A plasticidade sináptica, a qual é essencial para manter a memória e a aprendizagem também está associada com o tráfego dos receptores de glutamato AMPA para membrana (SONG; HUGANIR, 2002)

A função dos receptores AMPA e as consequências de sua ativação é modulado pela regulação dinâmica da expressão das subunidades dos AMPA na membrana. Essa regulação depende da indução da LTP, que aumenta a expressão de receptores AMPA no hipocampo, enquanto que a depressão a longo prazo (LTD) reduz a expressão desses receptores na membrana neuronal, conforme demonstrado na Figura 10. Essa modulação do receptor AMPA é crucial nas modificações da eficácia sináptica (SONG e HUGANIR, 2002; DERKACH et al., 2007).

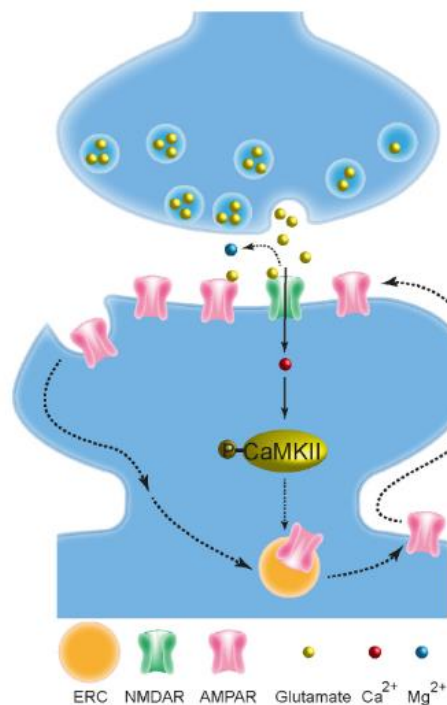
Figura 10 - Regulação da expressão do receptor AMPA



A sinalização do receptor AMPA modulada pela regulação dinâmica dos níveis de receptores na superfície sináptica. O tráfego dos receptores é regulado por muitas proteínas associadas ao receptor de AMPA. A associação do receptor com estas proteínas pode ser dinamicamente regulada pela fosforilação. Indução de LTP aumenta os níveis de receptores AMPA sinápticos, enquanto LTD diminui os níveis do receptor AMPA. A regulação da densidade dos receptores AMPA na membrana plasmática ocorre através da exocitose e endocitose dos receptores. Fonte: SONG, 2002.

A regulação da expressão das subunidades dos receptores AMPA na membrana também pode ter a sua atividade e distribuição sináptica regulada por modificações na LTP dependente de NMDA (Figura 11). Nesse mecanismo, o glutamato pré-sináptico ativa os receptores NMDA, ocorre o influxo pós-sináptico de Ca^{2+} , sequencialmente, a CaM ativada promove a exocitose dos receptores AMPA dos endossomos para os domínios da membrana plasmática extra-sináptica. Os receptores AMPA sinápticos são endocitados, destinados a re-suprir o endossomo ou para degradação, conforme Figura 11 (WEN; SCHROETER; KLOCKER, 2013).

Figura 11 - Mecanismo de regulação dos receptores AMPA dependente dos receptores NMDA



O glutamato pré-sináptico ativa os receptores NMDA, o influxo pós-sináptico de Ca^{2+} induz uma via de transdução de sinal envolvendo ativação e autofosforilação de CaM. A CaM ativada promove a exocitose do receptor AMPA dos endossomos para domínios da membrana plasmática extra-sináptica. Fonte: WEN, 2013.

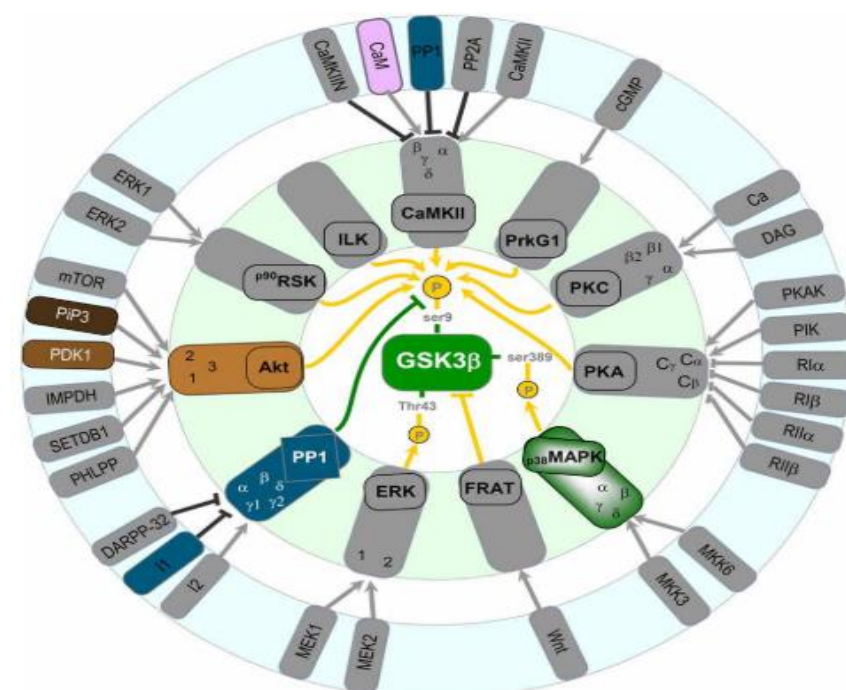
2.9.2 Via de sinalização da GSK3 β

Embora a glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) tenha sido originalmente nomeado por sua capacidade de fosforilar e inativar a síntese de glicogênio e regular metabolismo da glicose 3 α

(MARCAGGI, 2004; MARTINEZ, 2014), esta quinase multifuncional foi posteriormente, encontrada como um componente crítico em inúmeras funções celulares, incluindo a regulação da sinalização celular (ROSE, 2017), divisão celular (BRUSILOV, 2010), diferenciação, proliferação e crescimento (BUTTERWORTH, 2010; WANIEWSKI, 1992) bem como a apoptose (ROSE, 2005). Evidências recentes sugerem que a via de sinalização GSK-3 desempenham funções chave na regulação de diferentes aspectos do desenvolvimento neural, como neurogênese, proliferação e diferenciação neural (JO, 2011). Além disso, a GSK-3 também está envolvida na regulação do tráfego de receptores e na plasticidade sináptica.

A GSK-3 apresenta duas isoformas em mamíferos: a GSK-3 α e GSK-3 β . Essas duas isoformas de serina/treonina (ser/thr) quinase encontram-se intimamente relacionadas, são codificadas por diferentes genes, e são substratos para a fosforilação mediada pela proteína quinase Akt (PAPURA, 2011). Estas proteínas, bastante homólogas nos seus domínios quinases e diferentes em outras regiões, são quinases constitutivamente ativas, cujas atividades são inibidas pela fosforilação na Ser21 da GSK-3 α e na Ser9 da GSK-3 β (MOORE, 2013). A inibição da GSK-3 mediada por fosforilação não está limitada a Akt, outras proteínas quinases tais como proteína quinase A (PKA) e a proteína quinase C (PKC) também fosforilam GSK-3. Além disso, outros reguladores da GSK-3, como a via alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), a via de sinalização de Wnt e a via da MAPK também atuam regulando a GSK-3 β (Figura 12) (COOK, 1996 ; FRAMEAND, 2001).

Figura 12 - Reguladores da GSK3 β no neurônio



Fonte : BRADLEY, 2012

A desregulação da GSK-3 contribui para a patogênese de muitas desordens, como vários tipos de câncer (AZOULAY, 2014), diabetes (GAO, 2012), bem como doenças neuroinflamatórias e neurodegenerativas (LI, 2013; LEI, 2011). Além do mais, a inibição da GSK-3 β altera a produção de citocinas por células nervosas centrais e periféricas (GUMRUAND, 2013; SARAIVAAND, 2010), diminuindo citocinas pro-inflamatórias e aumentando as citocinas anti-inflamatórias (LYMAN, 2013), portanto, a GSK3 pode ser considerado como um regulador para controlar o mecanismo de neuroinflamação.

O principal mecanismo conhecido da GSK3 β é a regulação da função cognitiva através da regulação da LTP e LTD. O LTP aumenta a fosforilação de GSK3 β e dessa forma inibe sua atividade. A superexpressão de GSK3 β prejudica a LTP, o que demonstra que a GSK3 β deve ser inativada (fosforilada) para o estabelecimento ideal da LTP. Logo, a GSK3 β ativa em condições patológicas está associada ao déficit de cognição. Em contrapartida, a LTD aumenta a atividade da GSK3 β enquanto que a inibição da GSK3 β previne a indução de LTD. Assim, a inibição da GSK3 facilita a LTP, mas a atividade da GSK3 é necessária para a LTD (PEINEAU et al., 2007). Foi demonstrado que o LTP e/ou LTD anormais após o tratamento com inibidores da GSK3, resultou em aumento da cognição em modelos de camundongos com síndrome do X e Síndrome de down. Portanto, a inibição da GSK3 pode melhorar o aprendizado e memória em algumas condições, regulando a plasticidade sináptica do hipocampo (CHOI, 2011; FRANKLIN, 2013; LI, 2012 ; MA, 2010).

Figura 13 - Mecanismos modulados pela GSK3



Representação esquemática da modulação da GSK3 em processos que provocam dano cognitivo. Fonte: BRADLEY, 2012 (adaptada).

As diferentes isoformas dessa quinase têm funções específicas na fisiopatologia do Alzheimer: GSK3 α está envolvida na produção de placas β amilóide (A β), enquanto GSK3 β atua fosforilando a proteína Tau (BASSO, 2006; BEUREL; GRIECO; JOPE, 2015; KING, 2013). Sabe-se, que a proteína Tau também é capaz de promover uma interação entre os filamentos de actina e os neurofilamentos (Filamentos intermediários), indicando a existência de inter-relação dos microtúbulos com outros elementos do citoesqueleto. Além disso, existe uma interação com a membrana plasmática neuronal através dos domínios de projeção aminoterminal da Tau. Ademais, menciona-se que há interação da Tau com outras organelas, tais como as mitocôndrias. Para regular o estado de fosforilação da proteína Tau, os tecidos cerebrais contam com a ação conjunta e, por vezes coordenada, de várias quinases e fosfatases. A enzima GSK3 é a mais importante das Tau quinases e apresenta-se distribuída no núcleo, no citosol e na mitocôndria. Através da hiperfosforilação, a GSK3 β impossibilita a ligação das proteínas Tau aos microtúbulos, tornando-as dispersas no citoplasma e passíveis de formar emaranhados neurofibrilares no interior dos neurônios (LOVESTONE, 1996). A hiperfosforilação da Tau compromete a capacidade desta em estabilizar os microtúbulos. Torna-se afetado, pois, o transporte axonal e o dendrítico, bem como a arquitetura celular, essenciais à manutenção da homeostase neuronal. Contudo, já se sabe que a desfosforilação da proteína Tau hiperfosforilada resulta na recuperação do papel biológico da Tau (DFTS, 2009).

A superexpressão condicional da GSK3 β nos neurônios corticais e hipocâmpais de camundongo resultou em desempenho prejudicado no labirinto aquático de Morris, hiperfosforilação da tau, astrocitose reativa e microgliose e morte neuronal (LUCAS, 2001; Hernández et al., 2002). Além disso, a supressão da superexpressão da GSK3 β reverteu o déficit de memória espacial em uma tarefa de reconhecimento do objeto, reduziu a hiperfosforilação da tau e diminuiu a gliose reativa e a morte neuronal (ENGEL, 2006).

Em modelos experimentais da Doença de Alzheimer (DA), a inativação de GSK3 β por inibidores de PDE5 leva a uma diminuição da tau hiperfosforilada nas áreas do cérebro envolvidas na aprendizagem e memória (GARCÍA-BARROSO, 2012). A associação entre a sinalização NO-GMPc e a diminuição da fosforilação de tau por meio da atividade de p-GSK3 β , é evidenciado pela existência de uma cascata de sinalização que liga a ativação de GMPc com a inibição de GSK3 β . Além disso, evidências *in vitro* e *in vivo* apontam para GSK-3 β como uma via de sinalização chave na promoção da neurodegeneração em tal medida que a inibição da GSK-3 β é considerada como uma abordagem terapêutica promissora da Doença de Parkinson (GARCÍA-OSTA, 2012)

2.10 ALTERAÇÕES COGNITIVAS NA EH

Além da hiperamonemia ser um dos principais contribuintes para neuroinflamação, ela também contribui para o comprometimento cognitivo na EH (RODRIGO et al, 2010; FELIPO, 2013). Em um estudo realizado por Marini e Broussard, após a injeção de LPS em ratos normais e hiperamonêmicos observou-se que embora a produção de citocinas tenha aumentado similarmente em ambos os grupos de animais, os déficits cognitivos foram mais fortes e mais longos em ratos hiperamonêmicos (MARINI; BROUSSARD, 2006).

Os mecanismos pelos quais a função cognitiva está prejudicada na EH são esclarecidos em modelos animais. Ratos com EH reproduzem a deficiência cognitiva presente em pacientes com EH e apresentaram memória e aprendizagem espacial reduzidos (MONFORT, 2007; HERNANDEZ-RABAZA, 2015). Ratos com hiperamonemia crônica sem insuficiência hepática também mostram dificuldades de aprendizado espacial (HERNANDEZ-RABAZA et al, 2016) e reduzida capacidade de aprendizagem no labirinto Y (AGUILAR, 2000; ERCEG, 2005b). Ratos com EH também exibiram neuroinflamação no hipocampo e expressão alterada dos receptores de glutamato, os quais, são responsáveis pelo comprometimento do aprendizado espacial no labirinto radial (HERNANDEZ-RABAZA, 2016).

A LTP é prejudicada em cultura de células hipocâmpais expostas a amônia (Muñoz et al. 2000) e também no hipocampo de animais com EH, sendo por sua vez, responsável pelo comprometimento de algumas funções cognitivas, incluindo aprendizagem e memória reduzidas no labirinto aquático de Morris (MONFORT et al., 2007).

Em um recente estudo, animais com hiperamonemia, apresentaram redução da expressão da subunidade GluA2 dos receptores AMPA e aumento da expressão da subunidade GluA1. Desta forma, a expressão alterada das subunidades GluA2 e GluA1 dos receptores AMPA na hiperamonemia resultaria em transdução de sinal alterada, o que contribui para as alterações cognitivas e motoras da encefalopatia hepática (CABRERA-PASTOR et al., 2018b). Ademais, a quantidade de ambos os receptores AMPA e NMDA foi reduzida em modelo animal de EH. Uma possível explicação para essa redução é a diminuição no número de conexões sinápticas nesses animais. (MONFORT ET AL., 2000, 2007; RATNAKUMARI ET AL., 1995; LLANSOLA ET AL., 2007). Tem sido demonstrado que os receptores AMPA e NMDA modulam a via glutamato-NO-GMPc (CABRERA-PASTOR et al., 2012). Corroborando com esses dados, estudos que avaliaram mecanismos envolvidos no comprometimento da função intelectual na EH, mostram que a via NO-GMPc é prejudicada em cérebro de ratos com EH e também em pacientes com EH que foram a óbito

(CAULI et al., 2007; ERCEG et al., 2005a, 2005b). Assim, a hiperamonemia altera a expressão dos receptores do glutamato, prejudica a via glutamato-NO-GMP e consequentemente induz o déficit cognitivo.

Em um modelo de hiperamonemia sem dano hepático, o tratamento crônico com um inibidor de PDE-5 e 6, o zaprinast, normalizou a função da via glutamato-NO-cGMP no cérebro e restaurou a capacidade de aprendizado nesses animais (ERCEG et al., 2005a). Posteriormente, os mesmos autores observaram que a capacidade de aprendizado no labirinto em Y foi prejudicada em ratos cujo modelo animal de EH foi o desvio portossistêmico, procedimento cirúrgico que causa hiperamonemia e mimetiza a EH. Esses animais apresentaram uma função prejudicada da via glutamato-NO-cGMP no cerebelo. Por outro lado, a capacidade de aprendizado foi restaurada em ratos submetidos ao desvio portossistêmico através do tratamento com um outro inibidor da PDE-5, o sildenafil, o qual restaurou a função desta via e a capacidade de aprendizado (ERCEG et al., 2005b). O tratamento com ibuprofeno, um anti-inflamatório, reduziu a neuroinflamação, mas não a hiperamonemia, e também restaurou a função da via glutamato-NO-cGMP e a capacidade de aprendizado nesses animais (CAULI, 2007).

Em resumo, esses resultados sugerem que a hiperamonemia e a neuroinflamação comprometem a via do glutamato-NO-cGMP e prejudicam a capacidade de aprendizado pelo mesmo mecanismo.

2.11 TRATAMENTOS

Atualmente, as abordagens terapêuticas para a melhoria da EH têm efeitos limitados e riscos associados ao seu uso. O gerenciamento de EH é dirigido principalmente para evitar fatores precipitantes e administração de agentes que aumentam a absorção de amônia hepática (por exemplo, L-ornitina, L-aspartato) ou diminuir a produção de amônia pela flora intestinal utilizando antibióticos (MLADENOVIC et al., 2014). No entanto, essas terapias têm efeitos adversos significativos e não demonstram efeitos benéficos na cognição, portanto novas estratégias terapêuticas são necessárias para melhoria da qualidade de vida dos pacientes com EH.

2.11.1 Inibidores de fosfodiesterase-5

A fosfodiesterase 5 (PDE-5), um membro da grande família de enzimas hidrolíticas de nucleotídeos cíclicos, é específico para a GMPc. A ação inibitória da PDE-5, resulta no aumento dos níveis de GMPc. Esse aumento do GMPc reduz citocinas pró-inflamatórias e também modula

processos cerebrais importantes como a LTP e consequentemente melhora o aprendizado e memória (MONFORT et al., 2002a, b) . As evidências acumuladas nos últimos anos indicam que PDE-5 é expressa em populações neuronais e gliais no cérebro dos mamíferos (BENDER e BEAVO, 2004; GARCIA-BARROSO et al, 2013; PRADO et al., 2010) e que a PDE-5 exerce ações neuroprotetoras em modelos de roedores de doenças neurológicas através de diferentes mecanismos.

Inibidores seletivos de PDE-5, como sildenafil, tadalafil e vardenafil, são drogas vasodilatadoras orais extensivamente usadas em seres humanos para o tratamento da disfunção erétil e para hipertensão pulmonar e Síndrome de Reynaud. Na última década, acumulou-se evidências que sugerem efeitos benéficos dos inibidores da PDE-5 na cognição, tanto em condições fisiológicas como patológicas (GARCÍA-OSTA et al., 2012). Além disso, recentes estudos mostraram que tratamento crônico com tadalafil melhora a memória espacial em um modelo de DA em rato e fornece um maior efeito benéfico do que observada com doses comparáveis com outros inibidores de PDE-5 (como por exemplo, o sildenafil). Administração de tadalafil produz uma concentração suficientemente elevada para inibir significativamente a PDE-5 no SNC. Análises multivariadas deste fármaco mostram que a utilização do tadalafil pode reverter rapidamente deficiências cognitivas (GARCIA-OSTA et al, 2012).

O tadalafil é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal e tem uma meia-vida de 17,5 horas no sangue (KULKARNI e PATIL, 2004; FORGUE et al., 2006), logo, requer administração menos frequente do que outros inibidores da PDE-5. Este fármaco apresenta uma segurança comprovada quando administrado cronicamente durante o tratamento de disfunção erétil e hipertensão pulmonar (FORGUE et al., 2006 ; KULKAMI et al., 2004). Além disso, a farmacocinética do tadalafil não é afetada por alimentos, idade, presença de diabetes ou insuficiência hepática (VILA-PETROFF et al., 1999; ROSEN e KOSTIS, 2003). Além de manter um excelente nível de segurança e perfil de tolerabilidade, o tadalafil também parece fornecer um potencial benefício prolongado para várias outras doenças, como por exemplo, desordens relacionadas ao SNC, porém poucos dados sobre esses efeitos existem na literatura.

Até o presente momento, não há trabalhos que investigue o papel do tadalafil na EH interligando o processo neuroinflamatório com a plasticidade sináptica através das moléculas sinalizadoras como a CREB e GSK3 β . Portanto, este trabalho contribui para a compreensão do efeito do tadalafil na neuroinflamação e no comprometimento cognitivo através das principais moléculas participantes da plasticidade sináptica.

3 CONCLUSÃO

No presente estudo, a administração tadalafil levou a uma redução dos níveis de citocinas pró-inflamatória como TNF- α , IL-1 β e IL-6 superexpressas na EH, além de reduzir a intensidade da imunoexpressão da Iba-1, indicando prevenção da ativação microglial.

A ativação de MAPKs contribui para via de sinalização do NF- κ B levando a uma regulação ascendente da iNOS e um aumento na liberação de NO; este último representa um fator importante na o mecanismo do edema de astrócitos induzido por amônia. Nesse sentido, o tadalafil reduziu os níveis de NO e de NF- κ B via inibição de p-ERK e p-p38. O efeito inibitório do tadalafil na via de sinalização ERK / p38 / NF- κ B demonstra seu efeito protetor contra a neuroinflamação induzida por tioacetamida.

O tratamento com tadalafil restaurou a capacidade de aprendizado. Os animais com EH levaram mais tempo para encontrar a caixa-alvo no Labirinto de Barnes, enquanto animais tratados com tadalafil encontraram o alvo caixa em menos tempo quando comparado a animais não tratados. Além disso, os animais tratados com tadalafil apresentaram melhor desempenho no nono dia, demonstrando que a aprendizagem foi adquirida e a memória espacial foi consolidada.

Na EH, a expressão de p-CREB, NeuN, BDNF e synaptofisina foram reduzidos, em contrapartida o tratamento com tadalafil promoveu a fosforilação do CREB via PKG e PKA, aumentou a expressão do fator neurotrófico e do marcador sináptico, promovendo assim neuroproteção e plasticidade sináptica.

O Tadalafil foi capaz de aumentar a fosforilação de GSK3 β , inibindo sua atividade. O fato de GSK3 β ser inibido está relacionado ao excelente desempenho dos animais deste grupo no Labirinto de Barnes pois a inativação de GSK3 β por fosforilação induz a uma melhora no aprendizado e memória.

Sendo assim, os resultados relatados neste estudo demonstraram que o tratamento com tadalafil reduz os níveis de neuroinflamação e neurodegeneração diminuindo marcadores inflamatórios e ativação glial no córtex e hipocampo. Além disso, o Tadalafil também promove e plasticidade sináptica aumentando a PKA / PKG / CREB / BDNF / NeuN / sinafisina, e normaliza a expressão de receptores de glutamato no hipocampo, restaurando capacidade de aprendizagem espacial e memória. Portanto, esses dados apontam para um efeito neuroprotetor do Tadalafil que pode ser útil para melhorar a função cognitiva em pacientes com encefalopatia hepática.

REFERÊNCIAS

- AGUSTI, A. et al. p38 MAP kinase is a therapeutic target for hepatic encephalopathy in rats with portacaval shunts. **Gut**, v. 60, n. 11, p. 1572–1579, nov. 2011.
- AHMED, A. O. et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurocognitive deficits in people with schizophrenia: A meta-analysis. **Psychiatry Research**, v. 226, n. 1, p. 1–13, 2015.
- AL-AMIN, M. M. et al. Tadalafil enhances working memory, and reduces hippocampal oxidative stress in both young and aged mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 745, p. 84–90, 2014.
- ALBRECHT, J.; ZIELINSKA, M.; NOREMBERG, M. D. Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 9, p. 1303–1308, 2010.
- ALDRIDGE, D. R.; TRANAH, E. J.; SHAWCROSS, D. L. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: Role of ammonia and systemic inflammation. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 5, n. S1, p. S7–S20, 2015.
- AMERICANA PARA ESTUDO DE DOENÇAS DO FÍGADO, A. et al. Encefalopatia hepática na doença hepática crônica: 2014 Recomendações da Associação Europeia para o Estudo do Fígado e Associação Americana para o Estudo de Doenças do Fígado. **Journal of Hepatology J Hepatol**, v. xxx, 2014.
- ATLURI, D. K.; PRAKASH, R.; MULLEN, K. D. Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Hepatic Encephalopathy. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 1, n. 2, p. 77–86, 2011.
- AVRAHAM, Y. et al. Capsaicin affects brain function in a model of hepatic encephalopathy associated with fulminant hepatic failure in mice. **British Journal of Pharmacology**, 2009.
- AMODIO P, DEL PICCOLO F, PETTENEO E, MAPELLI D, ANGELI P, IEMMOLO R, MURACA M, MUSTO C, GERUNDA G, RIZZO C, MERKEL C, GATTA A. Prevalence and prognostic value of quantified electroencephalogram (EEG) alterations in cirrhotic patients. **J Hepatol** 35:37–45, 2001.
- AGUSTI, A. et al. p38 MAP kinase is a therapeutic target for hepatic encephalopathy in rats with portacaval shunts. **Gut**, v. 60, n. 11, p. 1572–1579, nov. 2011.
- ALBRECHT, J.; ZIELINSKA, M.; NOREMBERG, M. D. Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 9, p.

1303–1308, 2010.

ALDRIDGE, D. R.; TRANAH, E. J.; SHAWCROSS, D. L. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: Role of ammonia and systemic inflammation. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 5, n. S1, p. S7–S20, 2015.

AMERICANA PARA ESTUDO DE DOENÇAS DO FÍGADO, A. et al. Encefalopatia hepática na doença hepática crônica: 2014 Recomendações da Associação Europeia para o Estudo do Fígado e Associação Americana para o Estudo de Doenças do Fígado. **Journal of Hepatology J Hepatol**, v. xxx, 2014.

ATLURI, D. K.; PRAKASH, R.; MULLEN, K. D. Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Hepatic Encephalopathy. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 1, n. 2, p. 77–86, 2011.

BAJAJ, J. S. et al. Review article: The design of clinical trials in hepatic encephalopathy - An International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) consensus statement. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 33, n. 7, p. 739–747, 2011.

BEMEUR, C. et al. IL-1 or TNF receptor gene deletion delays onset of encephalopathy and attenuates brain edema in experimental acute liver failure. **Neurochemistry International**, v. 56, n. 2, p. 213–215, 2010.

BENITO, E.; BARCO, A. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. **Trends in Neurosciences**, v. 33, n. 5, p. 230–240, 2010.

BLEI, A. T. et al. Ammonia-induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis. **Hepatology**, v. 19, n. 6, p. 1437–1444, 1994.

BLISS, T. V; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31–39, 1993.

BUBICI, C. et al. Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: Molecular basis and biological significance. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6731–6748, 2006.

BUTTERWORTH, R. F. et al. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. **Liver International**, v. 29, n. 6, p. 783–788, 2009.

BUTTERWORTH, R. F. Neuroinflammation in acute liver failure: Mechanisms and novel therapeutic targets. **Neurochemistry International**, v. 59, n. 6, p. 830–836, 2011.

CABRERA-PASTOR, A. et al. Differential effects of chronic hyperammonemia on modulation of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway by metabotropic glutamate receptor 5 and low and high affinity AMPA receptors in cerebellum in vivo. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 1, p. 63–71, 2012.

CABRERA-PASTOR, A. et al. In vivo administration of extracellular cGMP normalizes TNF- α and membrane expression of AMPA receptors in hippocampus and spatial reference memory but not IL-1 β , NMDA receptors in membrane and working memory in hyperammonemic rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 57, p. 360–370, 2016.

CABRERA-PASTOR, A. et al. Increasing extracellular cGMP in cerebellum in vivo reduces neuroinflammation, GABAergic tone and motor in-coordination in hyperammonemic rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2018a.

CABRERA-PASTOR, A. et al. Chronic hyperammonemia alters in opposite ways membrane expression of GluA1 and GluA2 AMPA receptor subunits in cerebellum. Molecular mechanisms involved. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, 2018b.

CARBONERO-AGUILAR, P. et al. Brain biomolecules oxidation in portacaval-shunted rats. **Liver International**, v. 31, n. 7, p. 964–969, 2011.

CAULI, O. et al. Inflammation and hepatic encephalopathy: Ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. **Hepatology**, v. 46, n. 2, p. 514–519, 2007.

CHASTRE, A. et al. Ammonia and proinflammatory cytokines modify expression of genes coding for astrocytic proteins implicated in brain edema in acute liver failure. **Metabolic Brain Disease**, v. 25, n. 1, p. 17–21, 2010.

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. 1–9, 2012.

CHEN RJ et al. Morphological changes of cortical pyramidal neurons in hepatic encephalopathy. **BMC neuroscience**, v. 15, p. 1–15, 2014.

CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: Target of sildenafil. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 20, p. 13729–13732, 1999.

CÓRDOBA, J. New assessment of hepatic encephalopathy. **Journal of Hepatology**, v. 54, n. 5, p. 1030–1040, 2011.

DADSETAN, S. et al. Reducing Peripheral Inflammation with Infliximab Reduces

Neuroinflammation and Improves Cognition in Rats with Hepatic Encephalopathy. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 9, n. November, p. 1–16, 2016.

DAMIANI, D. et al. Encefalopatias : etiologia , fisiopatologia e manuseio clínico de algumas das principais formas de apresentação da doença *. v. 11, n. 1, p. 67–74, 2013.

DFTS, A. The role of TAU protein in the pathophysiology of frontotemporal dementia. v. 36, n. 5, p. 197–202, 2009.

DOS SANTOS, A. Q. et al. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 453, n. 2, p. 161–167, 2006.

ELWIR, S.; RAHIMI, R. S. Review Article Hepatic Encephalopathy : An Update on the Pathophysiology and Therapeutic Options. v. 5, p. 142–151, 2017.

ERCEG, S. et al. Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. **Brain Research**, v. 1036, n. 1–2, p. 115–121, 2005a.

ERCEG, S. et al. Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 41, n. 2, p. 299–306, fev. 2005b.

ERCEG, S. et al. Role of extracellular cGMP and of hyperammonemia in the impairment of learning in rats with chronic hepatic failure. Therapeutic implications. **Neurochemistry International**, v. 48, n. 6–7, p. 441–446, 2006.

FERENCI, P. Hepatic encephalopathy. v. 5, n. April, p. 138–147, 2017.

GARCÍA-OSTA, A. et al. Phosphodiesterases as therapeutic targets for Alzheimer's disease. **ACS chemical neuroscience**, v. 3, n. 11, p. 832–44, 21 nov. 2012.

GOEBELER, M. et al. Multiple signaling pathways regulate NF-kappaB-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells. **Blood**, v. 97, n. 1, p. 46–55, 1 jan. 2001.

GÖRG, B. et al. Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 449, n. 1–2, p. 104–114, 2006.

GÖRG, B.; SCHLIESS, F.; HÄUSSINGER, D. Osmotic and oxidative/nitrosative stress in ammonia toxicity and hepatic encephalopathy. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 536, n. 2, p. 158–163, 2013.

GRANT, S. et al. Direct comparison of the thioacetamide and azoxymethane models of type a hepatic encephalopathy in mice. **Gene Expression**, 2018.

GUNDERSEN, V.; STORM-MATHISEN, J.; BERGERSEN, L. H. Neuroglial Transmission. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 3, p. 695–726, 2015.

HÄUSSINGER, D. et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? **Journal of hepatology**, v. 32, n. 6, p. 1035–1038, 2000.

HÄUSSINGER, D.; GÖRG, B. Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 13, n. 1, p. 87–92, 2010.

HERNANDEZ-RABAZA, V. et al. Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarization of microglia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 83, 2016.

JAYAKUMAR, A. R. et al. NF- κ B in the mechanism of brain edema in acute liver failure: Studies in transgenic mice. **Neurobiology of Disease**, v. 41, n. 2, p. 498–507, 2011.

JAYAKUMAR, A. R. et al. Calcium in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, n. SUPPL. 1, p. 252–257, 2009.

JAYAKUMAR, A. R.; RAMA RAO, K. V.; NORENBURG, M. D. Neuroinflammation in Hepatic Encephalopathy: Mechanistic Aspects. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 5, n. March, p. S21–S28, 2014.

KANDEL. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. v. 294, n. November 2001, p. 1030–1038, 2001.

KELLY, J.; COSTA, L.; BRILHANTE, V. Epidemiological profile of cirrhosis of liver patients treated at the Outpatient of Hepatology Of Medical Specialties CESUPA Center (CEMEC) in Belem - PA. v. 35, n. 1, p. 1–8, 2016.

KIM, D. et al. Decreased hippocampal brain-derived neurotrophic factor and impaired cognitive function by hypoglossal nerve transection in rats. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 12, p. 3752–3760, 2017.

KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. **Physiological Reviews**, v. 81,

n. 2, p. 807–869, 2001.

LIERE, V.; SANDHU, G.; DEMORROW, S. Recent advances in hepatic encephalopathy [version 1 ; referees : 4 approved] Referee Status : v. 6, n. 0, 2017.

LIU, Y. et al. Galantamine improves cognition, hippocampal inflammation, and synaptic plasticity impairments induced by lipopolysaccharide in mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2018.

LU, Y.-F.; KANDEL, E. R.; HAWKINS, R. D. Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 23, p. 10250–10261, 1999.

LUEPTOW, L. M.; ZHAN, C. G.; O'DONNELL, J. M. Cyclic GMP-mediated memory enhancement in the object recognition test by inhibitors of phosphodiesterase-2 in mice. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 3, p. 447–456, 2016.

MANI, R.; NATESAN, V.; ARUMUGAM, R. Neuroprotective effect of chrysin on hyperammonemia mediated neuroinflammatory responses and altered expression of astrocytic protein in the hippocampus. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2017.

MARINI, J. C.; BROUSSARD, S. R. Hyperammonemia increases sensitivity to LPS. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 88, n. 2, p. 131–137, 2006.

MAYER, M. L. Glutamate receptor ion channels. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 15, n. 3 SPEC. ISS., p. 282–288, 2005.

MCAFOOSE, J.; BAUNE, B. T. Evidence for a cytokine model of cognitive function. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 3, p. 355–366, 2009.

MCAVOY, N. C.; HAYES, P. Hepatic encephalopathy. **Medicine**, v. 35, n. 2, p. 108–111, 2007.

MLADENOVIC, D. et al. Finasteride Improves Motor, Eeg and Cellular Changes in Rat Brain in Thioacetamide-Induced Hepatic Encephalopathy. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, 7 ago. 2014.

MONFORT, P. et al. Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 7, p. 2103–2111, 2007.

MONFORT, P.; FELIPO, V. Long-term potentiation in hippocampus involves sequential

activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase and cGMP-degrading phosphodiesterase, alterations in hyperammonemia. **BMC Pharmacology**, v. 5, n. Suppl 1, p. P66, 2002.

MONTOLIU, C. et al. Cyclic GMP pathways in hepatic encephalopathy. Neurological and therapeutic implications. **Metabolic brain disease**, v. 25, n. 1, p. 39–48, mar. 2010.

MURTHY, C. R. K. et al. Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. **Journal of Neuroscience Research**, v. 66, n. 2, p. 282–288, 2001.

NORENBERG, M. D. et al. Ammonia-Induced Astrocyte Swelling in Primary Culture. v. 16, n. 7, p. 833–836, 1991.

NORENBERG, M. D.; JAYAKUMAR, A R.; RAMA RAO, K. V. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. **Metabolic brain disease**, v. 19, n. 3–4, p. 313–29, 2004.

PATIDAR, K. R.; BAJAJ, J. S. Covert and Overt Hepatic Encephalopathy: Diagnosis and Management. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, 2015.

PEIXOTO, C. A.; NUNES, A. K. S.; GARCIA-OSTA, A. Phosphodiesterase-5 inhibitors: Action on the signaling pathways of neuroinflammation, neurodegeneration, and cognition. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

RAO, J. S. et al. Neuroinflammation and synaptic loss. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 5, p. 903–910, 2012.

RODRIGO, R. et al. Hyperammonemia Induces Neuroinflammation That Contributes to Cognitive Impairment in Rats With Hepatic Encephalopathy. **YGAFT**, v. 139, p. 675–684, [s.d.].

ROMERO-GÓMEZ, M.; MONTAGNESE, S.; JALAN, R. Hepatic encephalopathy in patients with acute decompensation of cirrhosis and acute-on-chronic liver failure. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 2, p. 437–447, 2015.

SAKAMOTO, K.; KARELINA, K.; OBRIETAN, K. CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. **Journal of neurochemistry**, v. 116, n. 1, p. 1–9, jan. 2011.

SAVLAN, I.; LIAKINA, V.; VALANTINAS, J. Concise review of current concepts on nomenclature and pathophysiology of hepatic encephalopathy. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 50, n. 2, p. 75–81, jan. 2014.

SCHWAB, C.; MCGEER, P. L. Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. **Handbook of Infection and Alzheimer's Disease**, v. 13, p. 27–37, 2008.

SHEN, H.-M. TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 10, p. 1589–1598, 2006.

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. 54, n. 6, p. 41–51, 2016.

SINKE, A. P. et al. NFB in the Mechanism of Ammonia-Induced Astrocyte Swelling in Culture. **Journal of Neurochemistry**, v. 106, n. 6, p. 2302–2311, 2008.

SONG, I.; HUGANIR, R. L. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. v. 25, n. 11, p. 578–588, 2002.

SQUIRE, L. R.; BARONDES, S. H. Memory impairment during prolonged training in mice given inhibitors of cerebral protein synthesis. **Brain Research**, v. 56, n. C, p. 215–225, 1973.

TORRES, D. S.; ABRANTES, J.; BRANDÃO-MELLO, C. E. Cognitive assessment of patients with minimal hepatic encephalopathy in Brazil. **Metabolic Brain Disease**, v. 28, n. 3, p. 473–483, 2013.

VERKHRATSKY, A.; PARPURA, V. Astroglipathology in neurological, neurodevelopmental and psychiatric disorders. **Neurobiology of Disease**, v. 85, p. 254–261, 2016.

VILSTRUP, H. et al. AASLD PRACTICE GUIDELINE 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. p. 715–735, 2014.

WEN, S.; SCHROETER, A.; KLOCKER, N. Synaptic plasticity in hepatic encephalopathy - a molecular perspective. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 536, n. 2, p. 183–188, 2013.

WILMS, H. et al. Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 3, p. 500–502, 2003.

WOLF, D. C. Hepatic encephalopathy. **Nejm**, p. 2017–2019, 2016.

ZHANG, J. et al. Hyperammonemia enhances the function and expression of P-glycoprotein and Mrp2 at the blood-brain barrier through NF- κ B. **Journal of Neurochemistry**, v. 131, n. 6, p. 791–802, 2015.

APÊNDICE A - ARTIGO I - TADALAFIL RESTORES LONG-TERM MEMORY AND SYNAPTIC PLASTICITY IN MICE WITH HEPATIC ENCEPHALOPATHY

Toxicology and Applied Pharmacology 379 (2019) 114673



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology and Applied Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/taap



Tadalafil restores long-term memory and synaptic plasticity in mice with hepatic encephalopathy



Maria Eduarda Rocha França^{a,b,*}, Renata Kelly Luna Gomes Ramos^a, Wilma Helena Oliveira^{a,b}, Eduardo Duarte-Silva^{a,c}, Shyrlene Meyre Rocha Araújo^{a,b}, Deniele Bezerra Lós^{a,d}, Christina Alves Peixoto^{a,d,*}

^a Laboratory of Ultrastructure, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Recife, Pernambuco, Brazil

^b Postgraduate Program in Biological Sciences (PPGCB), Federal University of Pernambuco Recife, Pernambuco, Brazil

^c Postgraduate Program in Biosciences and Biotechnology for Health (PPGBBS), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ-PE)/ Aggeu Magalhães Institute (IAM), Recife, Pernambuco, Brazil

^d Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

PDE5 inhibitor
Hepatic encephalopathy
Neuroinflammation
Learning and memory
Synaptic plasticity

ABSTRACT

Background and aim: Tadalafil displays important neuroprotective effects in experimental models of neurodegenerative diseases, however its mechanisms of action remain poorly understood. The aim of the present study was to investigate the action of Tadalafil on learning and memory, neuroinflammation, glial cell activation and neuroprotection in the experimental model of hepatic encephalopathy (HE) induced by Thioacetamide (TAA) in mice.

Methods: Mice received intraperitoneal injections of TAA, for 3 consecutive days, reaching the final dose of 600 mg/kg. Tadalafil 15 mg/kg body weight was administered by gavage during 15 days after TAA induction. Mice underwent a Barnes maze for learning and memory evaluation.

Results: Animals with hepatic encephalopathy showed reduced learning and spatial memory in the Barnes Maze, presented astrocyte and microglia activation and increased neuroinflammatory markers such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, p-p38, p-ERK and p-NF- κ B. In addition, the signaling pathway PKA/PKG/CREB/BDNF/NeuN/synaptophysin and glutamate receptors were deregulated by TAA. Tadalafil treatment regulated the inflammation signaling pathways restoring learning and spatial memory.

Conclusion: Tadalafil significantly reduced neuroinflammation, promoted neuroprotection and plasticity, regulated the expression of hippocampal glutamate receptor and restored spatial learning ability and memory.

1. Introduction

Hepatic encephalopathy (HE) is a serious neuropsychiatric syndrome that occur during acute liver failure or chronic liver injury (Liere et al., 2017). HE covers a wide range of neuropsychiatric disturbances with altered cognitive function, motor activity, spatial memory dysfunction besides affecting health-related quality of life (Erceg et al., 2006; McMillin et al., 2014).

The elevated blood and brain ammonia levels have been implicated in the pathogenesis of the acute and chronic liver failure (Jayakumar et al., 2014). In addition, activation of intracellular signaling systems, including c-Fos, mitogen-activated protein kinases, neurotrophic factors, and transcription of Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B) have been associated to the mechanism of ammonia neurotoxicity, particularly in

neuroinflammation (McMillin et al., 2014). Indeed, the number of activated microglia, TNF- α , IL-1 and IL-6 levels are increased in rodents models of acute liver failure (Bémeur et al., 2010) and in patients with acute liver failure (Wright and Jalan, 2007), supporting the importance of neuroinflammatory components in HE.

The ammonia potentially acts in concert with neuroinflammation to induce cognitive impairment in HE (Luo et al., 2015) and this is related with altered neurotransmission (Hernandez-Rabaza et al., 2015; Moore et al., 2009). Spatial learning and memory are modulated in the hippocampus (Moser et al., 1995) through the AMPA and NMDA receptors (Keifer and Zheng, 2010). The change in this modulation during the hyperammonemia and HE are associated with impaired Long-term potentiation (LTP) in the hippocampus (Monfort et al., 2009). LTP is a form of synaptic plasticity leading to sustained increase of synaptic

* Corresponding authors at: Laboratory of Ultrastructure, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail addresses: mariaeduarda.rfranca@gmail.com (M.E.R. França), cpeixoto@cpqam.fiocruz.br (C.A. Peixoto).

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114673>

Received 5 June 2019; Received in revised form 10 July 2019; Accepted 15 July 2019

Available online 16 July 2019

0041-008X/ © 2019 Published by Elsevier Inc.



Fig. 1. Experimental design.

efficiency and is considered the basis for some forms of learning and memory (Bliss and Collingridge, 1993; Monfort et al., 2009). Induction of LTP in the hippocampus requires modulation of the AMPA and NMDA receptors and consequently activation glutamate/NO/cGMP/PKG pathway (Montoliu et al., 2010). However, hippocampal activation of this pathway is decreased in the rat model of hyperammonemia, resulting in LTP impairment (Dadsetan et al., 2016; Monfort et al., 2009).

In addition, the NO/cGMP/PKG cascade also participates in a mechanism that promotes the survival of neural cells. NO/cGMP/PKG are activated through the cAMP-responsive element binding protein (CREB), a transcription factor that plays an important role in development of memory through modulation of synaptic plasticity and growth factors (Nagai-Kusuhara et al., 2007). As far as we know, there are no studies on the modulation of PDE5 inhibitors on the CREB/BDNF/NeuN/ synaptophysin pathway in HE experimental model.

No specific treatments for cognitive alterations of patients with HE are available. As neuroinflammation contributes to the deficiency of cognition and memory, a possible mechanism to reduce those alterations can be done by treatment with anti-inflammatory drugs (Hernández-rabaza et al., 2016). According to Agusti et al. (2011) and Cauli et al. (2007), the reduction of neuroinflammation with Ibuprofen or with inhibitors of MAP kinase p38 improves cognitive function in rats with HE (Agusti et al., 2011; Cauli et al., 2007). In addition, increased cGMP reduces proinflammatory cytokines and also modulates important brain processes such as LTP and consequently improves learning and memory (Monfort and Felipe, 2002). Thus, anti-inflammatory drugs or blocking the degradation of cGMP by phosphodiesterase 5 inhibitors could be a therapeutic approach to improve learning and memory in HE (Erceg et al., 2005; Peixoto et al., 2015). However, recent studies have shown that treatment with Tadalafil, a PDE-5 inhibitor with longer half-life (~18 h), improves spatial memory in a mice model of Alzheimer's disease (AD) and provides a greater beneficial effect than observed with other PDE-5 inhibitors (García-Barroso et al., 2013). According to the author's knowledge, there are no studies investigating the role of tadalafil in HE by interlinking the neuroinflammatory process with synaptic plasticity through molecules such as CREB, BDNF, NeuN, synaptophysin and GSK3 β . Therefore, the present study demonstrates that the administration of tadalafil restored spatial learning, memory deficits in thioacetamide (TAA)-induced HE by attenuation of hippocampal neuroinflammation.

2. Methods

2.1. Animals and experimental design

Male 10-week-old C57BL/6 mice were randomly assigned into three groups of 15 animals. All the experiments in the present study were approved by the Animal Studies Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Institute under protocol number 86/2015. The animals were kept in a light-dark cycle (natural light) and stored in plastic cages (40 $\times$ 32 cm), at a temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$, with free access to water and fed (commercial diet). They were distributed into three experimental groups: I. Control, II. TAA 600 mg/Kg, III. TAA 600 mg/Kg + Tadalafil 15 mg/Kg. All animals were anesthetized and euthanized on the 19th day. Three different experiments were performed in order to confirm

the results, totaling 45 animals.

2.2. Induction of hepatic failure

The experimental model of hepatic encephalopathy using Thioacetamide (TAA) in mice was previously validated (Honda et al., 2002; Núñez et al., 2004; Schnur, 2004) and was induced at a dose of 200 mg/kg, injected intraperitoneally for 3 consecutive days, reaching the final dose of 600 mg/kg (Avraham et al., 2009; De Miranda, 2010). TAA was obtained from Sigma-Aldrich in powder form and was dissolved in sterile saline solution. Twenty-four hours after each TAA injection, 0.5 ml of a solution containing 0.45% NaCl, 5% dextrose and 0.2% KCl was injected subcutaneously into all animals (including control) in order to avoid hypovolemia, hypokalemia and hypoglycaemia (Panikashvili et al., 2001).

2.3. Treatment with Tadalafil

After 24 h of TAA induction, the animals of the treated group received solutions composed of distilled water and Tadalafil at a concentration of 15 mg/kg, standardized daily according to the animals' weight (García-Osta et al., 2012). Daily administration of Tadalafil solution was performed by gavage (stomach cannula), in total volume of 100 μl , for 15 days. The animals in the control groups received only 100 μl of distilled water via the same route of administration. On the final week of treatment (11-18th days), the mice were subjected to a Barnes maze to evaluate the cognitive function (Fig. 1).

2.4. Barnes circular

To evaluate spatial memory performance and learning in the last week of the experiment the animals were submitted to the Barnes labyrinth (Jolivald et al., 2010, 2008). It consists of a circular illuminated platform with 20 holes equidistant. One of the holes has a target dark box and is marked by a visual clue, while the others are closed. In the adaptation period, the mouse was put into a black cylindrical tube in the center of the labyrinth for ten seconds and then led to the target box. In the learning phase, the mouse was placed in a black cylindrical tube in the center of the labyrinth for ten seconds and then allowed to explore the labyrinth for 5 min. The session ended when the mouse found the box or after five minutes had elapsed. The animals that did not find the target box after the 5 min were driven by the tail to the target box site and remained there for one minute. In this learning phase, the animals were trained to find the exit for four consecutive days and afterwards they had three days without training. On the eighteenth day, the animals were submitted to the memory test as described above, except for the conduction of animals by the tail to the target box, as described previously (Jolivald et al., 2010).

2.5. Immunohistochemistry

The animals were anesthetized and the transcardiac perfusion was then performed with physiological saline (20 ml) followed by paraformaldehyde (PFA) 4% (40 ml) in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), pH7.2. Brains were post-fixed overnight in the same fixative solution. The material was then processed into paraffin, as routinely

and coronal sections (5 μ m) were obtained by microtome. For antigenic retrieving, sections were rehydrated and treated with 20 mM citrate buffer, pH6.0 at 100 °C for 30 min. After, they were incubated in 1% BSA / 1 h and 3% H₂O₂/30 min in order to block peroxidase. Next, sections were incubated with the following primary antibodies: anti-GFAP (NB300-141, Novus biological), anti-Iba1 (019-19,741, Wako), anti-NeuN (ab104225, Abcam) and anti-IL-1 (18-732-292,194, Genway) overnight at 4 °C and for 1 h in biotin-conjugated secondary IgG antibody. The immunohistochemical reaction was amplified by using the Kit Dako LSAB + System-HRP, revealed with 3'-3-diaminobenzidine (DAB) and counterstained with Harris Hematoxylin. The frontal cortex and hippocampus region were evaluated by comparing the intensity of the label between the groups with the program GIMP 2.6.2.

2.6. Immunofluorescence

The material was processed into paraffin, as described above. For antigenic retrieving, sections (5 μ m) were rehydrated and treated with 20 mM citrate buffer, pH6.0 at 100 °C for 30 min. After, they were permeabilized with 0.5% Triton X-100 and incubated for 1 h with blocking solution (3% BSA plus 0.2% Tween 20 in Tris buffered saline). Subsequently, the sections were incubated with antibodies: anti-BDNF (ANT-010, Alomone) and anti-Synaptophysin (MAB5258-I, Millipore). The primary antibodies were incubated overnight and then incubated with polyclonal fluor 488- conjugated secondary antibody (Alexa) against rabbit immunoglobulin for 1 h and then treated with 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 5 min. The slices were washed and mounted in fluorescent Prolong Gold Antifade medium (Life Technologies, catalog number: P36930) for observation under an inverted fluorescence microscope (Leica) equipped with a camera. The evaluation was made by comparing the intensity of the marking between the groups with the program GIMP 2.6.2.

2.7. Quantification of labeling of immunohistochemistry and immunofluorescence

The GIMP2.8 software (GNU Image Manipulation Program software, CNET Networks, Inc. Australia) was used for analysis of reaction intensity. The labeling reaction was quantified in five arbitrarily selected pictures per animal. The results are expressed as mean $\pm$ SD of three mice per group.

2.8. Western blot

The hippocampi were rapidly dissected and homogenized in an extraction cocktail containing protease inhibitors (10 mM EDTA, 2 mM PMSF, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM NaVO₄, 10 mg aprotinin / ml and 100 mM Tris, pH 7.4). A pool of 5 animals by each group was homogenized and centrifuged at 3000 $\times$ g for 10 min and the supernatant stored at -70 °C. Proteins (30 mg) were separated on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels by electrophoresis and transferred onto a nitrocellulose membrane (BioRad, CA, USA). After blocking (5% skim milk in TBS-T - 0.1% Tris buffered saline added with Tween20, pH7.4), the membranes were incubated overnight with the anti-TNF- α (ab34674, Abcam), anti-IL-6 (ab6672, Abcam), anti-p-NF- κ B (ab97726, Abcam), anti-NF- κ B (ab31418, Abcam), anti-p-p38 (9211S, cell signaling), anti-p38 (9212S, cell signaling), anti-p-ERK (sc-16,982, Santa Cruz), anti-ERK (sc-292,838, Santa Cruz), anti-p-GSK3 β (9323, cell signaling), anti-GSK3 β (12456S, cell signaling), anti-PKA (ab59253, Abcam), anti-PRKG1 (LS-C26472, Lifespan), anti-p-CREB (9198, cell signaling), anti-CREB (9197, cell signaling), anti-NR2 (AGC-001, Alomone), anti-GluR1 (AGC-004, Alomone) and anti-GluR2 (AGC-005, Alomone) with secondary IgG antibody, conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (1: 3000 or 1: 8000, Sigma) for 2 h at RT. The protein bands were visualized by a chemiluminescent agent and

revealed by the ChemiDoc (Bio-rad) scanner. For quantification, densitometry values were obtained by measuring the pixel density of each band using Image J program 1.38. The results were confirmed by three different experiments for each investigated protein. The immunoblot was performed for β -actin (1:1000; A228, Sigma) as control of the expression of the studied proteins.

2.9. Determination of nitric oxide

Griess' colorimetric reaction was used to measure nitric oxide. In duplicate, the serum was added to a 96-well ELISA plate, followed by the same volume of Griess reagent. A solution of sodium nitrite at an initial concentration of 100 M was serially diluted to prepare the standard curve. After 10 min incubation in a dark room, spectrophotometric measurements were taken at 490 nm. The absorbance of the different samples was compared to the standard curve and the results were expressed as mean $\pm$ standard deviation using GraphPad Prism V6.0.

2.10. Statistical analysis

The groups were compared by the one-way variance test (ANOVA-one way) followed by Tukey's post-test for multiple comparisons by using the GraphPad Prism program (San Diego, CA, USA). Differences with $p < .05$ will be considered significant. Data will be presented as the mean $\pm$ standard deviation.

3. Results

3.1. Learning and memory are restored by Tadalafil

The learning ability of the different groups was tested with the Barnes maze to evaluate the cognitive performance of HE animals. The animals were trained (learning) for four consecutive days in the second week after induction of HE, once a day. The latency to find the target box was recorded. On the first day, all animals of the three groups spent a similar time in the labyrinth to find the exit. On the ninth day, the animals of the control group had significantly reduced the time to find the target box ($p < .05$) compared to the second day, indicating learning and memory acquisition. In contrast, the TAA group did not have significantly reduced the time to find the target box on the ninth day. These animals needed more time to find the exit than the control group and the TAA + Tadalafil group, suggesting learning and memory damage. On the other hand, animals from the TAA + Tadalafil group had significantly reduced time to find the target box on the fourth day compared to the second day ($p < .05$), indicating an improved learning. Also the TAA + Tadalafil group had significantly reduced time on the eighteenth day when compared to the twelfth day ($p < .001$) (Fig. 2), demonstrating that besides improving learning, the spatial memory was consolidated. The control group exhibited a mean time of 56.3 s to find target box whereas the HE group showed a mean time of 88.5 s. In contrast, the TAA + Tadalafil group had decreased time to find the target box to 53.5 s.

3.2. Tadalafil reduces astrocyte and microglia activation in the cortex area and in the hippocampus

An important mechanism that leads to neuroinflammation is the activation of microglia, which releases inflammatory factors. Regions of cortex and CA1 of hippocampus were analyzed for Iba-1 expression. In control animals, immunohistochemistry for Iba-1 revealed microglia with typically branched and fine filaments, typical of latent state (Fig. 3A and 4A). On the other hand, in the group exposed to TAA, there was a greater intensity for Iba-1 labeling in the cortex ($p < .0001$) and hippocampus ($p < .001$), with numerous microglial cells exhibiting phagocytic phenotype, showing amoeboid appearance and thicker

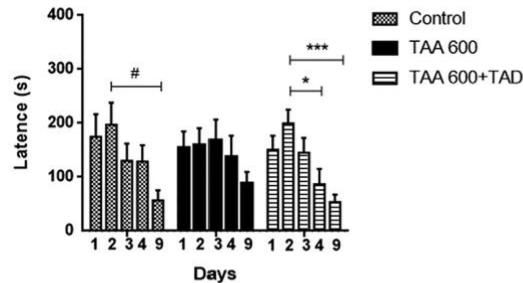


Fig. 2. Effects of Tadalafil on learning and memory. Analysis of the time in seconds to find the target box. Values are the mean $\pm$ S.D. of 10 mice per group, using analysis of variance (2 way ANOVA) followed by Tukey post-hoc test. # $p < .05$ when compared the ninth day with the second day of the control group, * $p < .05$ when compared the second day with fourth day of TAA + TAD group, *** $p < .001$ when compared the second day with ninth day of TAA + TAD group.

filaments (Fig. 3B and 4B). In contrast, administration of Tadalafil led to a reduction in the intensity of Iba-1 immunostaining in the cortex ($p < .0001$) and hippocampus ($p < .01$) and microglia presented fine filaments similar to the latent state phenotype, indicating reduction of microglial proliferation and activation (Fig. 3C and 4C).

Glial fibrillary acidic protein (GFAP), an astrocyte activation marker (reactive gliosis) was evaluated in the CA1 region of the hippocampus and in the cortex by immunohistochemistry. Immunoreexpression of GFAP was physiological in the brain of control animals (Fig. 3E and 4E), while after exposure to TAA, there was a significant increase in the immunoreexpression of this protein in the cerebral cortex and hippocampus ($p < .05$) (Fig. 3F and 4F). On the other hand, treatment with Tadalafil reduced astrocyte activation in the cortex and hippocampus, improving the astrogliosis when compared to the TAA group ($p < .05$) (Fig. 3G and 4G). Moreover, the immunostaining of GFAP in the TAA + TAD group was not significantly different from control group.

3.3. Tadalafil inhibits neuroinflammation markers

In the brain, activated microglial cells and astrocytes produce cytokines in response to injury or inflammation. One of the first cytokines to be released is tumor necrosis factor (TNF- α), which is involved in the induction of IL-1 and IL-6 (Fong et al., 1989). The TNF- α content of the hippocampus, analyzed by western blot analysis, revealed basal expression in the control group. After exposure to TAA, there was a significant increase in TNF- α expression ($p < .01$), while treatment with tadalafil reduced the expression of this cytokine compared to the TAA group ($p < .05$) (Fig. 6A). Similar results were observed for IL-1 β and IL-6 analyses. In the group of animals with HE, there was a significant increase in the expression of these interleukins when compared to the control group ($p < .05$), indicating the presence of cortical and hippocampal neuroinflammation in these animals, while tadalafil treatment significantly prevented the hyperammonemia-induced upregulation of these pro-inflammatory cytokines ($p < .05$) evaluated by immunohistochemical (Fig. 5G) and western blotting (Fig. 6B). Besides, there were no significant differences in IL-1 β , IL-6, and TNF- α expression between the control and tadalafil groups.

As the expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 is modulated by the NF- κ B, a transcription factor that plays crucial roles in neuroinflammation, we evaluated whether tadalafil could diminish the expression of these cytokines acting through NF- κ B. The NF- κ B expression was significantly higher in the TAA group than in the control group ($p < .01$), while there was a significant reduction in the expression of this transcription factor after tadalafil treatment ($p < .05$) (Fig. 6C). These results suggest that tadalafil prevents HE-induced activation of NF- κ B.

The iNOS/NO system takes part in the pathogenesis of neuroinflammatory diseases, and NO levels are greatly increased in the CNS during inflammatory processes in both patient and animal models (Danilov et al., 2003; Lieb et al., 2003). The serum NO dosage of the animals of control group presented a basal expression of NO. In contrast, NO levels were dramatically increased in animals with HE compared to control ($p < .01$). Treatment with tadalafil was able to reverse this process and significantly reduced NO levels in animals exposed to TAA ($p < .01$) (Fig. 6D).

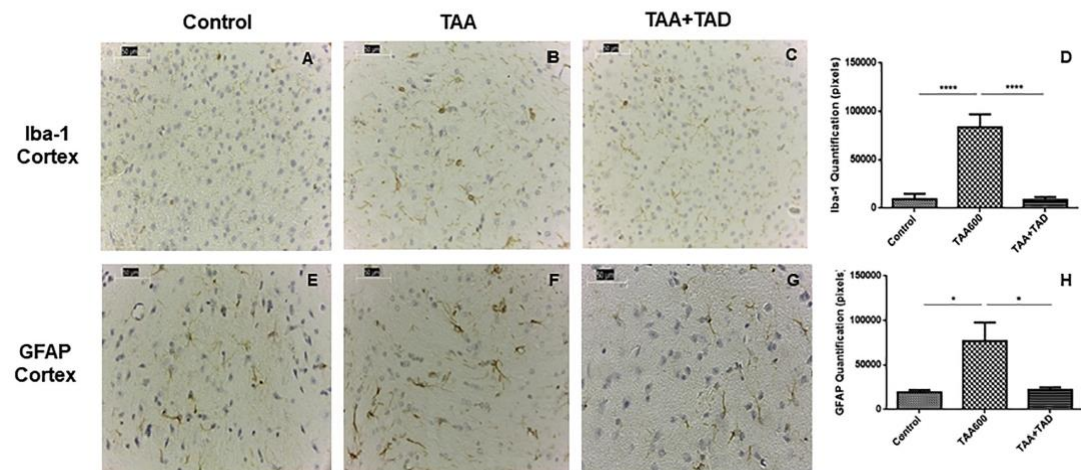


Fig. 3. Effects of Tadalafil on microglial and astrocyte activation in the cerebral cortex. Immunohistochemistry for Iba-1 and GFAP. Magnification of 400 $\times$. (a, e) Control, (b, f) TAA 600, (c, g) TAA + TAD. Quantification of pixels (five areas arbitrarily selected per animal) was performed using GIMP 2.8 image analysis software. The results are expressed as mean $\pm$ SD of three mice per group. d) Quantification of Iba-1, **** $p < .0001$ when compared to the control group and TAA + TAD group, h) Quantification of GFAP, * $p < .05$ when compared to the control group and TAA + TAD group. Data represent the mean $\pm$ S.D., using Analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-hoc test.

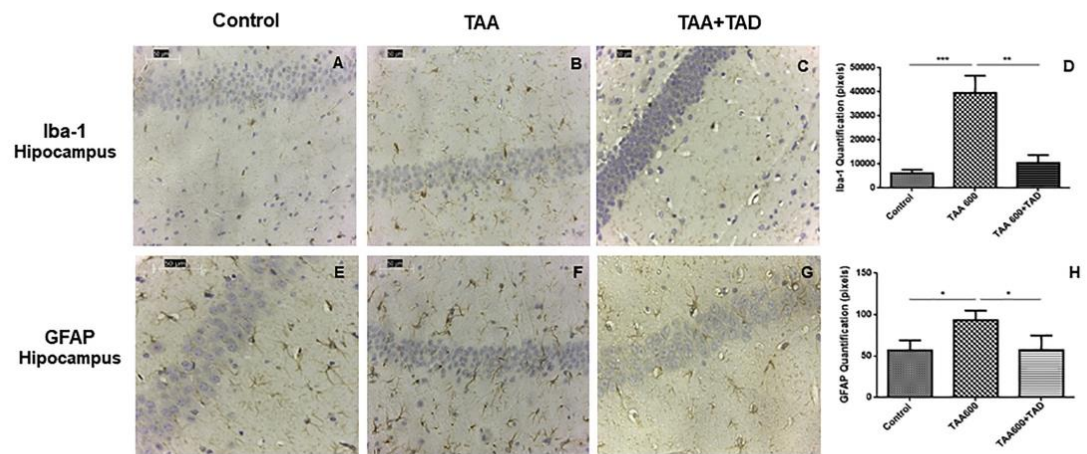


Fig. 4. Effects of Tadalafil on microglial and astrocyte activation in the hippocampus. Immunohistochemistry (IHQ) for Iba-1 and GFAP. Magnification of 400 $\times$. (a, e) Control, (b, f) TAA 600, (c, g) TAA + TAD. Quantification of pixels (five areas arbitrarily selected per animal) was performed using GIMP 2.8 image analysis software. The results are expressed as mean $\pm$ SD of three mice per group. d) Quantification of Iba-1, ***p < .001 when compared to the control group and **p < .01 when compared to the TAA + TAD group, h) Quantification of GFAP, *p < .05 when compared to the control group and TAA + TAD group. Data represent the mean $\pm$ S.D. using analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-hoc test.

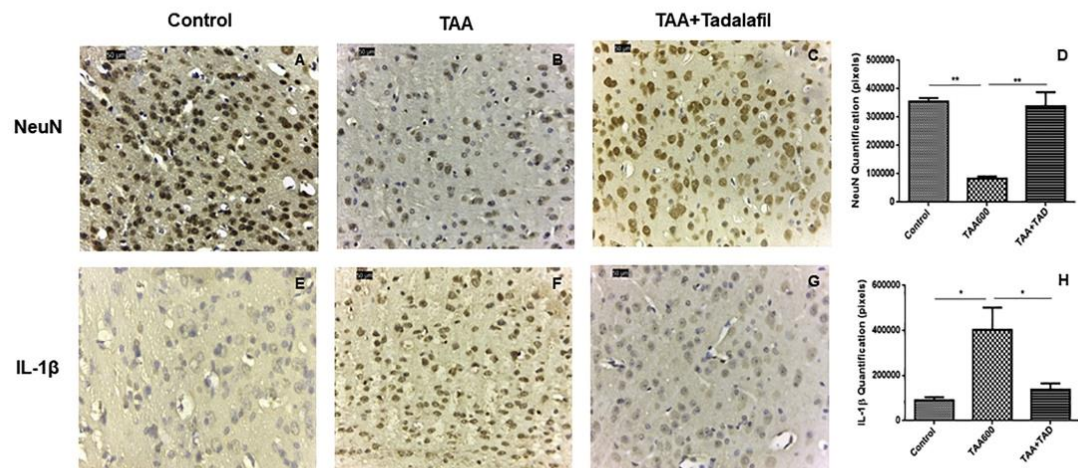


Fig. 5. Tadalafil treatment reduces immunoreactivity of IL-1 β and the neuronal injury. Immunohistochemistry for NeuN and IL-1 β . Magnification of 400 $\times$. (a, e) Control, (b, f) TAA 600, (c, g) TAA + TAD. Quantification of pixels (five areas arbitrarily selected per animal) was performed using GIMP 2.8 image analysis software. The results are expressed as mean $\pm$ SD of three mice per group. d) Quantification of NeuN, **p < .01 when compared to the control group and TAA + TAD group h) Quantification of IL-1 β , *p < .05 when compared to the control group and TAA + TAD group. Data represent the mean $\pm$ S.D. using analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-hoc test.

3.4. Tadalafil reduces MAPK activation

As MAPKs are proteins known to activate NF- κ B (SINKE et al., 2008), we examined whether Tadalafil inhibits MAPK activation, and therefore, consequently decrease the activation of NF- κ B induced by TAA. It was possible to observe that in the control group there was basal expression of p-ERK. The TAA group showed a significant increase in ERK phosphorylation, whereas tadalafil treatment significantly inhibited the phosphorylation of this protein compared to the TAA group ($p < .05$) (Fig. 7A). Similarly, TAA group exhibited an increased expression of p-p38 when compared to control ($p < .05$) and TAA 600 +

Tadalafil group ($p < .05$) (Fig. 7B).

3.5. Assessment of the effect of Tadalafil on synaptic plasticity

Since neuroinflammation and microglial activation are responsible for the cognitive changes induced by hyperammonemia, the anti-inflammatory action of tadalafil could restore the cognitive function in mice with HE.

Microglia, as well as astrocytes, play a fundamental role in neuroinflammation, and play an important role in the cellular and molecular mechanisms of learning, memory and cognitive processes. IL-6,

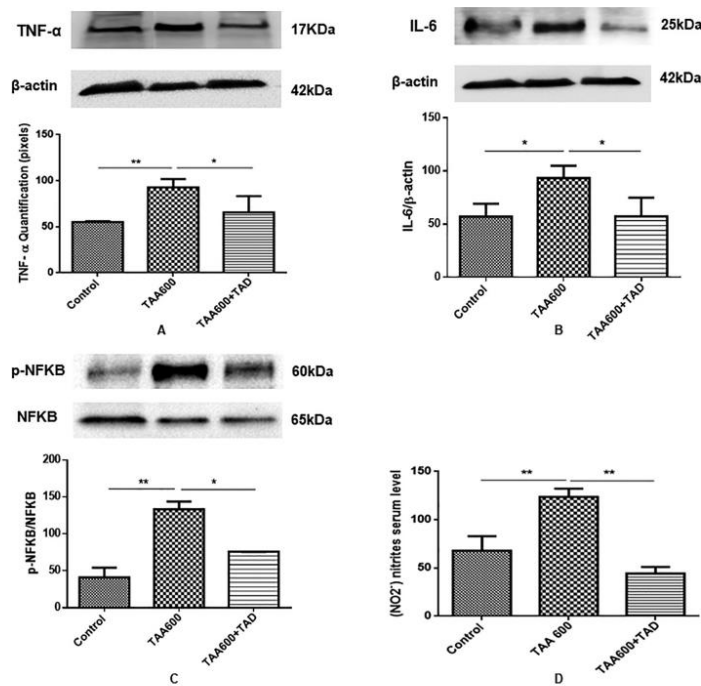


Fig. 6. Effects of Tadalafil on neuroinflammation. a) Immunoblot for TNF-α, ** $p < .01$ when compared to the control group, * $p < .05$ when compared to the TAA + TAD group, b) Immunoblot for IL-6, * $p < .05$ when compared to the control group and TAA + TAD group, c) Immunoblot for NF-κB, ** $p < .01$ when compared to the control group, * $p < .05$ when compared to the TAA + TAD group. Data represent the mean $\pm$ S.D. using analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-hoc test. d) Quantification of NO (mean $\pm$ S.D.) using analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-hoc test. ** $p < .01$ when compared to the control group and TAA + TAD group.

IL-1 β and TNF- α are important for synapses plasticity, long-term potentiation, neurogenesis and memory consolidation and, therefore, variations in the levels of these cytokines can disrupt these processes (McAfoose and Baune, 2009). Hyperammonemia and inflammation cooperate in the induction of neurological changes in HE. We investigated whether treatment with tadalafil restores signaling pathways of synaptic plasticity in mice with HE.

PKG and also PKA are involved in the CREB phosphorylation, which is involved with LTP induction through the transcription of genes involved with synaptic plasticity. In the control group, PRKG1, PKA and p-CREB were expressed at physiologic levels. The TAA group displayed a significant decrease in the expression of PKA and p-CREB when compared to control groups ($p < .05$). In contrast, the TAA + Tadalafil group had increased expression of PRKG1 ($p < .05$), PKA ($p < .001$)

and p-CREB ($p < .05$), to levels similar to the control group, confirming the restoration of the synaptic plasticity (Fig. 8 A, B and C).

GSK3 β is a key signaling pathway in promoting neurodegeneration since it regulates Tau phosphorylation. Expression of p-GSK3 β was assessed by western blotting. In the control group, high expression of p-GSK3 β was observed (Fig. 8D). After TAA exposure, it was possible to observe a reduction in the expression of this enzyme ($p < .05$), whereas the treatment with tadalafil increased p-GSK3 β expression compared to the TAA groups ($p < .01$).

The expression of the GluR1 and GluR2 subunit of AMPA receptors were reduced in hippocampus of mice with HE ($p < .05$) (Fig. 9A and B). However, Tadalafil normalized the expression of both GluR1 and GluR2 subunit when compared to the TAA ($p < .05$), not differing from control mice. Regarding NMDA receptor, the expression of the

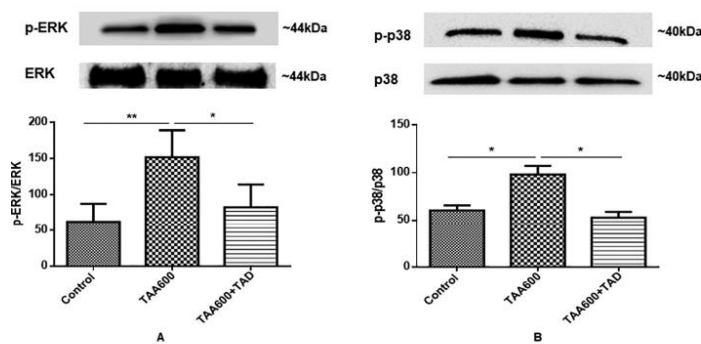


Fig. 7. Tadalafil treatment reduces MAPK expression. a) Immunoblot for p-ERK, ** $p < .01$ when compared to the control group, * $p < .05$ when compared to the TAA + TAD group, b) Immunoblot for p-p38, * $p < .05$ when compared to the control group and TAA + TAD group. Data represent the mean $\pm$ S.D. using analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-hoc test.

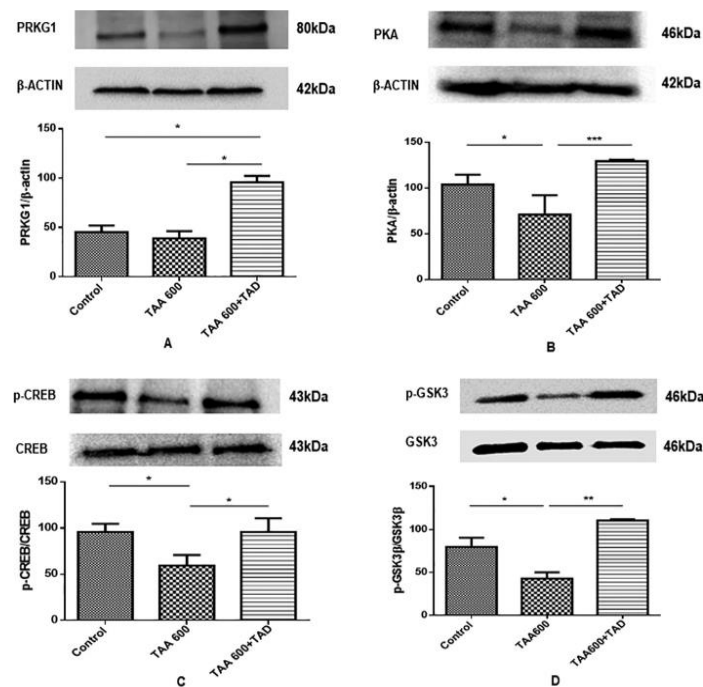


Fig. 8. a) Immunoblot for PRKG1, * $p < .05$ when compared to the control and TAA + TAD groups. b) Immunoblot for PKA, * $p < .05$ when compared to the control group, ** $p < .001$ when compared to the TAA + TAD group. c) Immunoblot for p-CREB, * $p < .05$ when compared to the control and TAA + TAD groups. d) Immunoblot for p-GSK3β, * $p < .05$ when compared to the control group, ** $p < .01$ when compared to the TAA + TAD group. Data represent the mean $\pm$ S.D. using analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-hoc test.

NR2A subunit was also reduced in TAA group. In contrast, the expression of NR2 was normalized in TAA600 + tadalafil group ($p < .05$) (Fig. 9C).

3.6. Tadalafil exerts neuroprotective effect

The NeuN protein has been used as a universal mature neuron-specific marker (Guse'nikova and Korzhevskiy, 2015). The staining intensity of NeuN did not differ between the control group and the

Tadalafil treated group. The NeuN labeling of the neurons in the HE group was significantly lower ($p < .01$) than the control (Fig. 5E and F). When the HE animals were treated with tadalafil, NeuN expression significantly increased in comparison with the TAA groups ($p < .01$) (Fig. 5G). BDNF is neurotrophin crucial for the regulation of neuronal maintenance, differentiation, and survival. Its dysregulation has been implicated in enhanced susceptibility to neurodegenerative diseases (Shen et al., 2018). Studies show that the increased expression of genes, such as BDNF, are indicators of neuroprotection (Esenaliev et al., 2018).

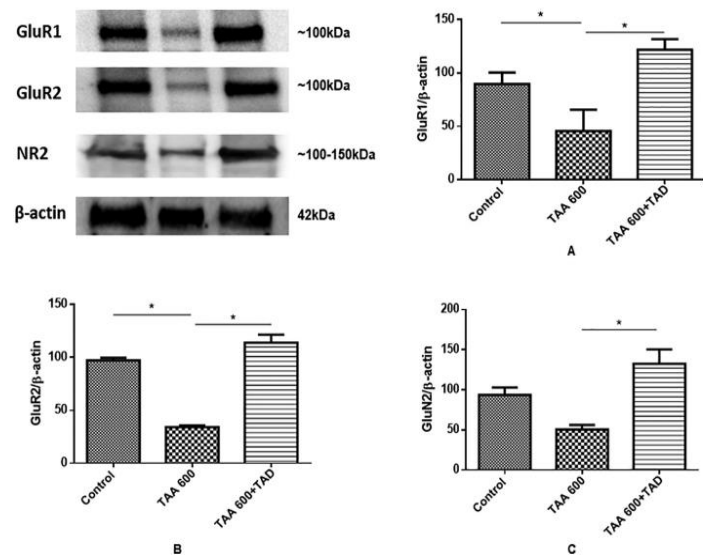


Fig. 9. Tadalafil treatment restores glutamate receptors expression. a) Immunoblot for GluR1 protein, * $p < .05$ when compared to the control and TAA + TAD groups. b) Immunoblot for GluR2, * $p < .05$ when compared to the control and TAA + TAD groups. c) Immunoblot for NR2A, * $p < .05$ when compared to the TAA + TAD group. Data represent the mean $\pm$ S.D. using analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-hoc test.

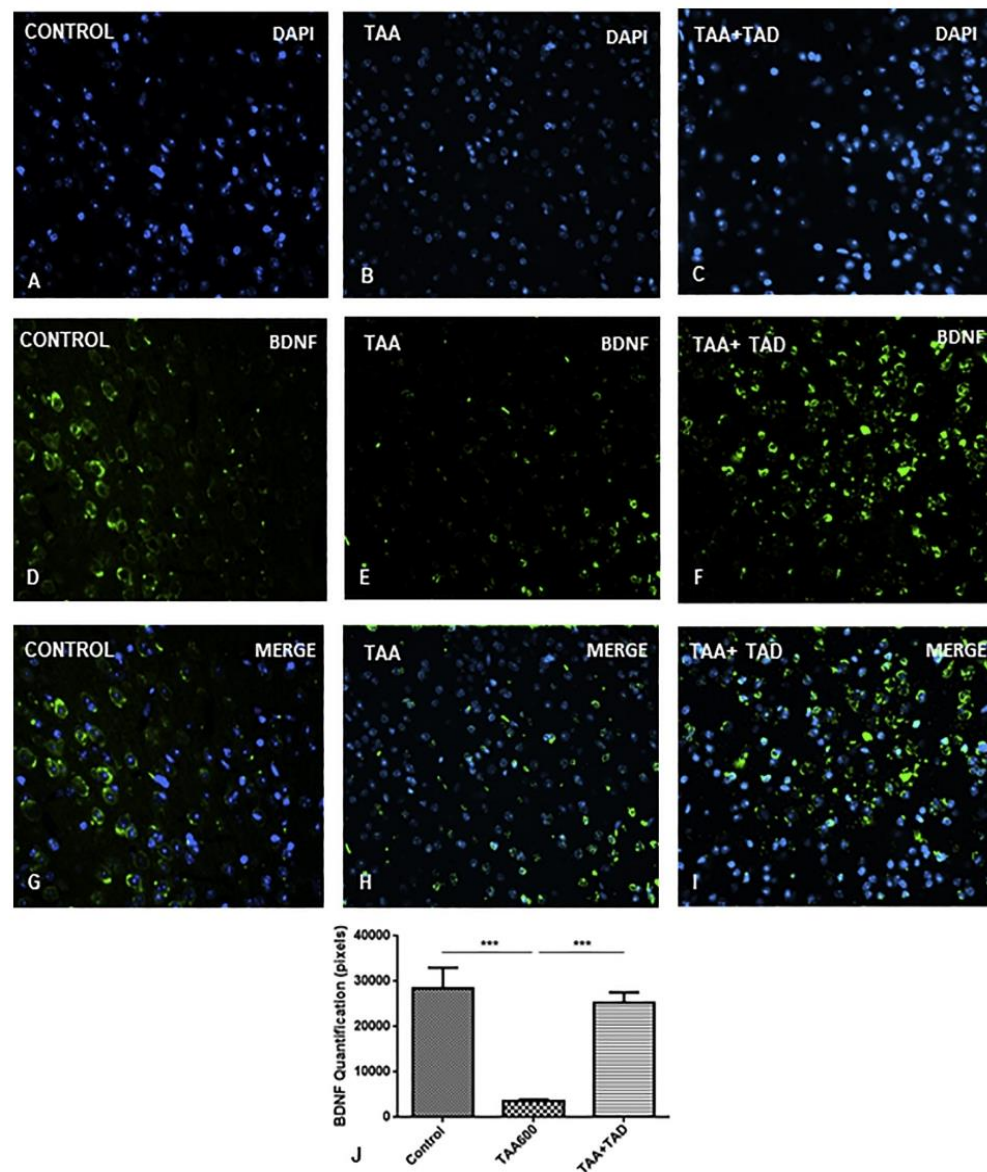


Fig. 10. BDNF immunoexpression in cerebral cortex of Tadalafil-treated mice. Magnification of $400\times$. (a, d, g) Control, (b, e, h) TAA 600, (c, f, i) TAA + TAD, (j) Quantification of BDNF (five areas arbitrarily selected per animal) was performed using GIMP 2.8 image analysis software. The results are expressed as mean $\pm$ SD of three mice per group, *** $p < .001$ when compared to the control and TAA + TAD groups. Data represent the mean $\pm$ S.D. using analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-hoc test.

In order to determine the effect of Tadalafil on the expression of neurotrophic factors, we analyzed BDNF immunoexpression by immunofluorescence. BDNF immunoexpression was downregulated in cortical neurons in mice with HE when compared with the control group ($p < .001$). However, there was an increased of BDNF immunoexpression in mice treated with Tadalafil when compared with the TAA groups ($p < .001$) (Fig. 10 A-J). To further determine whether Tadalafil has the preventive effects on synaptic degeneration, immunostaining with an anti-synaptophysin antibody was performed to detect presynaptic buttons. In the control animals, synaptophysin immunostaining was observed in a punctate distribution, consistent with

localization of presynaptic buttons and showed basal synaptophysin immunoreactivity. In the exposed TAA mice, the intensities of synaptophysin staining were reduced when compared with the control group at the corresponding area in the cortex, indicating synaptic degeneration ($p < .001$). In contrast, Tadalafil treatment increased intensity of synaptophysin staining ($p < .0001$) (Fig. 11 A-J). The results indicated that Tadalafil treatment prevented synaptic degeneration in the cortex area.

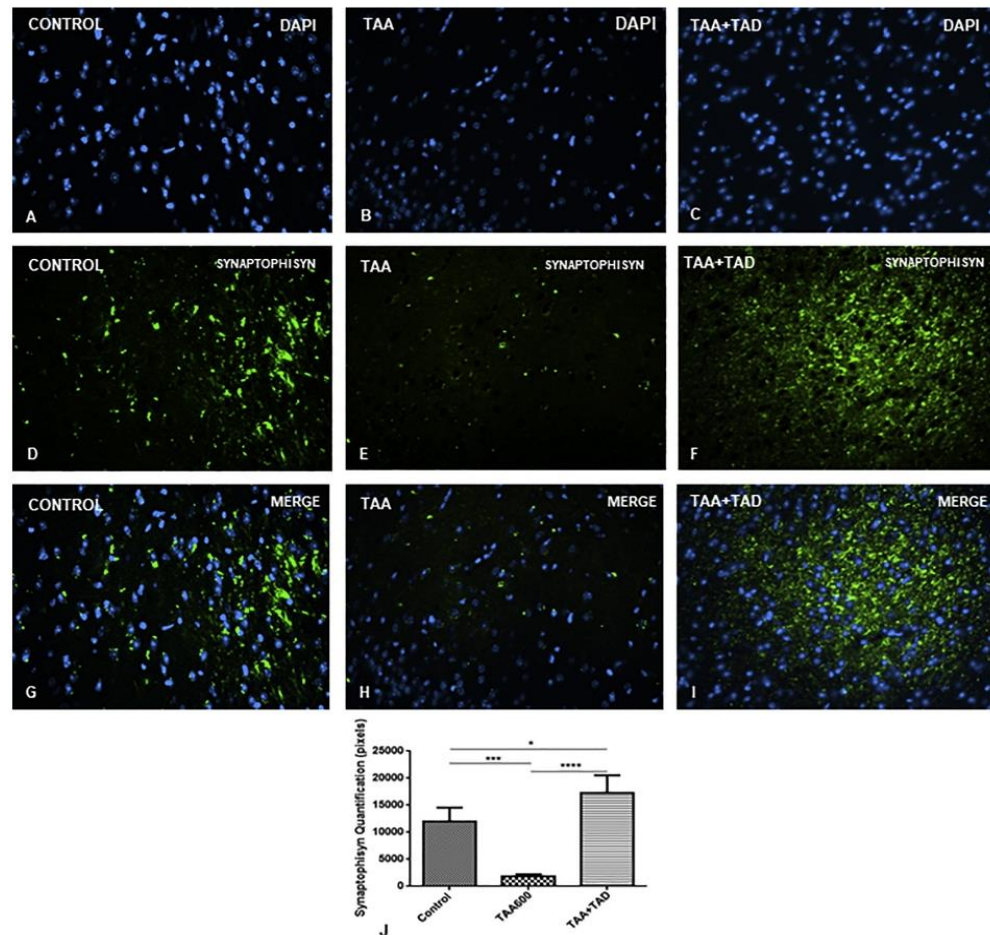


Fig. 11. Effects of Tadalafil on Synaptophysin immunoreactivity in cerebral cortex. Magnification of $400\times$. (a, d, g) Control, (b, e, h) TAA 600, (c, f, i) TAA + TAD, (j) Quantification of Synaptophysin (five areas arbitrarily selected per animal) was performed using GIMP 2.8 image analysis software. The results are expressed as mean $\pm$ SD of three mice per group, * $p < .05$ and *** $p < .001$ when compared to the control group, **** $p < .0001$ when compared to TAA + TAD group. Data represent the mean $\pm$ S.D. using analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-hoc test.

4. Discussion

The etiology of HE is multifactorial, but blood levels of ammonia are a key component of its pathogenesis (Butterworth, 2011a, b). In healthy individuals, ammonia is largely metabolized by the liver and to a lesser extent by the muscle. In healthy liver, ammonia is metabolized in urea by periportal hepatocytes through the urea cycle (Wright et al., 2011). Patients with cirrhosis show increased ammonia production and absorption besides reduced elimination of ammonia, and these factors contribute to arterial hyperammonemia (Misel et al., 2013).

Recent studies show that the NO-cGMP signaling is impaired in the brain of rats with hyperammonemia or chronic liver failure and in patients who died of hepatic encephalopathy. This deficiency leads to a reduction in the extracellular concentration of cGMP in the brain and cerebellum and is associated with neuroinflammation and decreased learning ability in these animal models (Montoliu et al., 2010). Inflammation, together with hyperammonemia, plays an important role in the pathogenesis of HE. Ammonia activates microglia through

initiation of inflammatory cascade and neuroinflammation. The consequences of this inflammatory response (synthesis and release of inflammatory mediators of activated microglia and endothelial cells), together with hyperammonemia, lead to astrocytic swelling / cerebral edema in hepatic encephalopathy. In the present study, the administration of tadalafil led to a reduction in the intensity of Iba-1 immunoreactivity, indicating prevention of microglial activation.

IL-6, IL-1 β and TNF- α take part in the cellular and molecular mechanisms of learning, memory and cognitive processes and are important for the plasticity of synapses, long-term potentiation and neurogenesis (McAfoose and Baune, 2009). However, proinflammatory cytokines levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 are increased by ammonia and several studies show that these cytokines are overexpressed in HE (Bobermin et al., 2012; Butterworth, 2011a, b). These cytokines play an important role in the activation cascade of other cytokines in the inflammatory response (Tanabe et al., 2010). Primary rat and human neuronal cultures presented elevated expression of IL-1 β and TNF- α and may induced neuronal death and apoptosis in vitro (Ye et al.,

2013). In addition, IL-1 β and TNF- α as well as NF- κ B activation leads to a decrease of the functional activity and expression of glial excitatory amino acid transporters (EAATs), which are responsible for the glutamate removal from the synaptic cleft. Moreover, neuroinflammation may also impair the glutamate-glutamine cycle, contributing also for glutamate accumulation and, ultimately, excitotoxicity (Haroon and Miller, 2012). In this sense, we observed that tadalafil was able to prevent the increase of cytokines in animals with HE and also reverted the cognitive impairment possibly by reducing the neuronal excessive glutamate transmission and excitotoxicity.

The ERK pathway has been implicated in the regulation of glial inflammatory responses after an insult (Fernandes et al., 2007). According to Bobermin et al., 2012, under exposure to ammonia, MEK/ERK inhibitor reduced the increase of inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 (Bobermin et al., 2012). Ammonia can induce NF- κ B activation through the activation of MAPKs (Bubici et al., 2006; Kyriakis and Avruch, 2001; Sinke et al., 2008). Antioxidants and MAPK inhibitors reduce NF- κ B activation, reducing ammonia-induced astrocyte edema, demonstrating a role of MAPK in the activation of ammonia-induced NF- κ B. Besides, the blockade of NF- κ B activation is associated with a reduction in iNOS protein expression and NO production (Sinke et al., 2008). Thus, MAPKs activation contributes to NF- κ B signaling pathways leading to an upward regulation of iNOS and an increase in NO release; the latter represents an important factor in the mechanism of ammonia-induced astrocyte edema. In the present study we demonstrated that Tadalafil reduced NO levels, confirming its anti-inflammatory effects.

Results from other studies have shown that inhibition of p38 phosphorylation inhibits microglial activation, thereby reducing neuroinflammation (Wilms et al., 2003). Many companies developed inhibitors of p38 for treatment of different inflammatory diseases (Goldstein and Gabriel, 2005; Lee and Dominguez, 2005). Hyperammonemic rat showed increased p38 phosphorylation in the cerebellum and cortex. The hyperammonemia may contribute to the increased activation of p38 in the brains because this activation is implicated in astrocyte swelling (Norenberg et al., 2007). The inhibitor of p38 reduces microglial activation in HE rats, reduces inflammatory markers in brain (cyclooxygenase activity, PGE₂, iNOS, TNF- α and IL-1 β) and increases anti-inflammatory substances, indicating the elimination of neuroinflammation in hyperammonemic rats. The reduction in neuroinflammation in these rats treated with inhibitor of p38 was associated with the restoration of learning ability and of motor activity and coordination (Agusti et al., 2011). These data suggest that inhibition of ERK and p38 may be useful to improve cognitive and motor function in patients with minimal or clinical HE. In the present study, tadalafil reduced the activation of NF- κ B via inhibition of p-ERK and p-p38 and consequently reduced production of pro-inflammatory cytokines. The inhibitory effect of Tadalafil on ERK/p38/NF- κ B signaling pathway demonstrates its protective effect against thioacetamide-induced neuroinflammation.

Neuroinflammation is also involved with cognitive impairment in HE. Studies using models of HE mice suggested that neuroinflammation, partly induced by mild chronic alterations of hyperammonemia (Shawcross et al., 2004), leads to changes in different aspects of neurotransmission (Felipo et al., 2008). In HE, the impairment of hippocampal LTP contributes to the reduction in the learning ability and memory in the Morris water maze (Monfort et al., 2007). In the present work, we evaluated if treatment with tadalafil restores learning ability. Animals with HE has taken longer to find a target box in the Barnes Maze labyrinth, while animals treated with tadalafil found the target box in less time when compared to untreated animals. Moreover, animals treated with tadalafil showed a better performance on the ninth day, demonstrating that learning was acquired and spatial memory was consolidated.

cGMP and cAMP signaling exert an important role in the inflammation and also participate in learning process and memory

consolidation (García-Osta et al., 2012; Zhu et al., 2001). PDE5 inhibitors regulate signaling pathways, elevates cGMP, which consequently elevates the cAMP levels. Elevated cGMP and cAMP levels then activates PKG and PKA, respectively, and promotes CREB phosphorylation (Lu et al., 1999; Zhang et al., 2013). CREB plays an essential role in regulating the transcription of genes involved in synaptic plasticity and trigger LTP (Benito and Barco, 2010). In this work, the expression of p-CREB was decreased in HE mice, while treatment with tadalafil promoted CREB phosphorylation by PKG and PKA.

The activation of CREB promotes the transcription of genes, such as BDNF, which has been proposed to contribute to neuroprotective effects (Peixoto et al., 2015). BDNF is a neurotrophic factor that is related to learning and memory and, therefore, promotes persistence of long-term memory storage (Kim et al., 2017). All levels of cell generation, such as proliferation, survival, and differentiation in the hippocampus are affected by BDNF (Lee et al., 2002). Studies demonstrated a decrease in BDNF levels in brain diseases, such as schizophrenia (Ahmed et al., 2015), Alzheimer's disease (Budni et al., 2015) and depression (Lee and Kim, 2010). In rats treated with urease, the ammonia reduced the BDNF content in the hippocampus (Galland et al., 2017), thus a reduction in BDNF content could indicate alterations in BDNF production/secretion by neurons. In the same way, this reduction in BDNF secretion may contribute to the impairment in memory function observed in HE patients. The deficiency of BDNF may result in accelerated cell damage and enhanced vulnerability to neurodegenerative diseases. Besides, this neurotrophin has been shown to be required for synaptogenesis and synaptic function (Barrientos et al., 2010; Ding et al., 2017). Synaptophysin is a pre-synaptic protein and is related to synapse formation and long-term potentiation (Janz et al., 1999; Tarsa and Goda, 2002). Furthermore, memory performance was improved through restoration of synaptophysin levels (Frick and Fernandez, 2003; Imbimbo et al., 2010). In our study, mice exposed in the TAA presented a reduction of BDNF and synaptophysin, while animals treated with Tadalafil increased the expression of neurotrophic factor and synaptic markers that explains the memory improvement observed in these mice. The results reported demonstrated that tadalafil has the ability to modulate the synaptic plasticity and neuroprotection.

In experimental models of Alzheimer's disease (AD), inactivation of cGMP-dependent GSK3 β by PDE5 inhibitors leads to a decrease in hyperphosphorylated tau in brain areas involved in learning and memory. The association between cGMP signaling and decreased tau phosphorylation by p-GSK3 β activity is evidenced by the existence of a signaling pathway that links cGMP activation with GSK3 inhibition (García-Osta et al., 2012). Studies demonstrated the GSK3 β regulates the LTP and LTD, which are the components of plasticity and the regulators of learning and memory (Bradley et al., 2012). During LTP, occurs increase phosphorylation of GSK3 β , resulting in its inhibition (Hooper et al., 2007). In the current work, mice with HE showed reduced p-GSK3 β , whereas Tadalafil enhanced the phosphorylation of this protein, inhibiting its activity. The fact that GSK3 β is inhibited after treatment with Tadalafil may be related to the excellent performance of the animals of this group in the Barnes Maze. Studies with inactivation of GSK3 β by phosphorylation have shown an improvement in memory and learning (Choi et al., 2011; King et al., 2014; Yang et al., 2018). Similarly, increased levels of p-GSK3 β were proposed to promote learning and memory consolidation observed in AD mice treated with sildenafil and tadalafil (García-Osta et al., 2012).

The neuronal nuclear protein NeuN is used as a marker of post-mitotic neurons and injuries to the nervous system can affect its expression (Gusel'nikova and Korzhnevskiy, 2015). It has been shown that immunoreactivity to NeuN reduces under various pathological conditions such as ischemia and brain injury (Igarashi et al., 2001; Ünal-Çevik et al., 2004). According to Igarashi et al., 2001, the loss of NeuN immunoreactivity is considered as a marker of neuronal injury (Igarashi et al., 2001). Our data showed that NeuN immunoreactivity was significantly lower in the cortex of animals with HE, whereas animals

- novel therapeutic targets. *Neurochem. Int.* 59, 830–836. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.07.014>.
- Cauli, O., Rodrigo, R., Piedrafita, B., Boix, J., Felipo, V., 2007. Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology* 46, 514–519. <https://doi.org/10.1002/hep.21734>.
- Cauli, O., Rodrigo, R., Llansola, M., Montoliu, C., Monfort, P., Piedrafita, B., El Mili, N., Boix, J., Agustí, A., Felipo, V., 2009. Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.* 24, 69–80. <https://doi.org/10.1007/s11011-008-9115-4>.
- Choi, C.H., Schoenfeld, B.P., Bell, A.J., Hinchey, P., Kollars, M., Gertner, M.J., Woo, N.H., Tranfaglia, M.R., Bear, M.F., Zukin, R.S., McDonald, T.V., Jengens, T.A., McBride, S.M.J., 2011. Pharmacological reversal of synaptic plasticity deficits in the mouse model of Fragile X syndrome by group II mGluR antagonist or lithium treatment. *Brain Res.* 1380, 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.11.032>.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–39. <https://doi.org/10.1038/361031a0>.
- Dadsetan, S., Balzano, T., Forteza, J., Cabrera-Pastor, A., Taoro-Gonzalez, L., Hernandez-Rabaza, V., Gil-Pérotin, S., Cubas-Núñez, L., García-Verdugo, J.-M., Agustí, A., Llansola, M., Felipo, V., 2016. Reducing peripheral inflammation with infliximab reduces neuroinflammation and improves cognition in rats with hepatic encephalopathy. *Front. Mol. Neurosci.* 9, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00106>.
- Danilov, A.I., Andersson, M., Bavand, N., Wiklund, N.P., Olsson, T., Brundin, L., 2003. Nitric oxide metabolite determinations reveal continuous inflammation in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 136, 112–118. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00464-2](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00464-2).
- de Miranda, A.S., 2010. A thioacetamide-induced hepatic encephalopathy model in C57BL/6 mice: a behavioral and neurochemical study. *Arq. Neuropsiquiatr.* 68, 597–602.
- Ding, S., Yang, J., Huang, X., Liu, J., Hu, J., Xu, Z., 2017. Dopamine burden induced the inactivation of sonic hedgehog signaling to cognitive decline in minimal hepatic encephalopathy. *Aging Dis.* 8, 442–457.
- Erceg, S., Monfort, P., Hernandez-Viadel, M., Llansola, M., Montoliu, C., Felipo, V., 2005. Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain Res.* 1036, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.12.045>.
- Erceg, S., Monfort, P., Cauli, O., Montoliu, C., Llansola, M., Piedrafita, B., Felipo, V., 2006. Role of extracellular cGMP and of hyperammonemia in the impairment of learning in rats with chronic hepatic failure. Therapeutic implications. *Neurochem. Int.* 48, 441–446. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.10.016>.
- Esenaliev, R.O., Petrov, I.Y., Petrov, Y., Guptarak, J., Boone, D.R., Mocciaro, E., Weisz, H., Parsley, M.O., Sell, S.L., Hellmich, H.L., Ford, J.M., Pogue, C., DeWitt, D., Prough, D.S., Micci, M.A., 2018. Nano pulsed laser therapy is neuroprotective in a rat model of blast-induced Neurotrauma. *J. Neurotrauma* 1522. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5249>.
- Fernandes, A., Falcão, A.S., Silva, R.F.M., Brito, M.A., Brites, D., 2007. MAPKs are key players in mediating cytokine release and cell death induced by unconjugated bilirubin in cultured rat cortical astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1058–1068. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05340.x>.
- Fong, B.Y.Y., Tracey, K.J., Moldawer, I.L.L., Hesse, D.G., Manogue, K.B., S. J.S.K., Lee, A. T., Kuo, G.C., Allison, A.C., Lowry, S.F., Cerami, A., 1989. ANTIBODIES TO CACHECTIN / TUMOR NECROSIS FACTOR REDUCE INTERLEUKIN 1 α AND INTERLEUKIN 6 APPEARANCE DURING LETHAL BACTEREMIA The cytokine cachectin / tumor necrosis factor (cachectin / TNF) plays a pivotal role in the pathophysiological consequences of se 170.
- Frick, K.M., Fernandez, S.M., 2003. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol. Aging* 24, 615–626. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00138-0](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00138-0).
- Galland, F., Negri, E., Da Ré, C., Frés, F., Strapazzon, L., Guerra, M.C., Tortorelli, L.S., Gonçalves, C.-A., Leite, M.C., 2017. Hyperammonemia compromises glutamate metabolism and reduces BDNF in the rat hippocampus. *Neurotoxicology* 62, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.05.006>.
- García-Barroso, C., Ricobaraza, A., Pascual-Lucas, M., Unceta, N., Rico, A.J., Goicolea, M.A., Sallés, J., Lanciego, J.L., Oyarzabal, J., Franco, R., Cuadrado-Tejedor, M., García-Osta, A., 2013. Tadalafil crosses the blood-brain barrier and reverses cognitive dysfunction in a mouse model of AD. *Neuropharmacology* 64, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.052>.
- García-Osta, A., Cuadrado-Tejedor, M., García-Barroso, C., Oyarzabal, J., Franco, R., 2012. Phosphodiesterases as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *ACS Chem. Neurosci.* 3, 832–844. <https://doi.org/10.1021/cn3000907>.
- Goldstein, D.M., Gabriel, T., 2005. Pathway to the clinic: inhibition of P38 MAP kinase. A review of ten chemotypes selected for development. *Curr. Top. Med. Chem.* 5, 1017–1029. <https://doi.org/10.2174/1568026054985939>.
- Guse'nikova, V.V., Korzhovskiy, D.E., 2015. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Nat.* 7, 42–47.
- Haroon, E., Miller, A.H., 2012. The role of diffusion tensor imaging in the study of cognitive aging. *Brain Imaging Behav. Neurosci.* 289–320. <https://doi.org/10.1007/7854>.
- Hernandez-Rabaza, V., Agustí, A., Cabrera-Pastor, A., Fustero, S., Delgado, O., Taoro-Gonzalez, L., Montoliu, C., Llansola, M., Felipo, V., 2015. Sildenafil reduces neuroinflammation and restores spatial learning in rats with hepatic encephalopathy: underlying mechanisms. *J. Neuroinflammation* 12, 195. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0420-7>.
- Hernández-rabaza, V., Cabrera-pastor, A., Taoro-gonzález, L., Malaguarra, M., Agustí, A., 2016. Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning : reversal by sulforaphane. *J. Neuroinflammation* 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0505-y>.
- Honda, H., Ikejima, K., Hirose, M., Yoshikawa, M., Lang, T., Enomoto, N., Kitamura, T., Takei, Y., Sato, N., 2002. Leptin is required for fibrogenic responses induced by thioacetamide in the murine liver. *Hepatology* 36, 12–21. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.33684>.
- Hooper, C., Markevich, V., Plattner, F., Killick, R., Schofield, E., Engel, T., Hernandez, F., Anderton, B., Rosenblum, K., Bliss, T., Cooke, S.F., Avila, J., Lucas, J.J., Giese, K.P., Stephenson, J., Lovestone, S., 2007. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *Eur. J. Neurosci.* 25, 81–86. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05245.x>.
- Igarashi, T., Huang, T.T., Noble, L.J., 2001. Regional vulnerability after traumatic brain injury: gender differences in mice that overexpress human copper, zinc superoxide dismutase. *Exp. Neurol.* 172, 332–341. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7820>.
- Imbimbo, B.P., Giardino, L., Sivilia, S., Giuliani, A., Gusciglio, M., Pietrini, V., Del Giudice, E., D'Arrigo, A., Leon, A., Villetti, G., Calzà, L., 2010. CHF5074, a novel γ -secretase modulator, restores hippocampal neurogenesis potential and reverses contextual memory deficit in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 20, 159–173. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1366>.
- Janz, R., Südhof, T.C., Hammer, R.E., Unni, V., Siegelbaum, S.A., Bolshakov, V.Y., 1999. Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron* 24, 687–700. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)01122-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)01122-8).
- Jayakumar, A.R., Rama Rao, K.V., Norenberg, M.D., 2014. Neuroinflammation in hepatic encephalopathy: mechanistic aspects. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 5, S21–S28. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2014.07.006>.
- Jolival, C.G., Lee, C.A., Beiswenger, K.K., Smith, J.L., Orlov, M., Torrance, M.A., Masliah, E., 2008. Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice : parallels with Alzheimer's disease and correction by insulin. *J. Neurosci. Res.* 3265–3274. <https://doi.org/10.1002/jnr.21787>.
- Jolival, C.G., Hurford, R., Lee, C.A., Dumaop, W., Rockenstein, E., Masliah, E., 2010. Type 1 diabetes exaggerates features of Alzheimer's disease in APP transgenic mice. *Exp. Neurol.* 223, 422–431. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.11.005>.
- Keifer, J., Zheng, Z., 2010. AMPA receptor trafficking and learning. *Eur. J. Neurosci.* 32, 269–277. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07339.x>.
- Kim, D., Chung, S., Lee, S.-H., Choi, S.-Y., Kim, S.-M., Koo, J., Lee, J.-H., Jahng, J.W., 2017. Decreased hippocampal brain-derived neurotrophic factor and impaired cognitive function by hypoglossal nerve transection in rats. *J. Cell. Mol. Med.* 21, 3752–3760. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13284>.
- King, M.K., Pardo, M., Cheng, Y., Downey, K., Jope, R.S., Beurel, E., 2014. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors: rescuers of cognitive impairments. *Pharmacol. Ther.* 141, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.010>.
- Kyriakis, J.M., Avruch, J., 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81, 807–869. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.807>.
- Lee, B.H., Kim, Y.K., 2010. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. *Psychiatry Investig.* 7, 231–235. <https://doi.org/10.4306/pi.2010.7.4.231>.
- Lee, J., Duan, W., Mattson, M.P., 2002. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J. Neurosci.* 22, 1367–1375. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01085.x>.
- Lee, M.R., Dominguez, C., 2005. MAP kinase p38 inhibitors: clinical results and an intimate look at their interactions with p38 α protein. *Curr. Med. Chem.* 12, 2979–2994. <https://doi.org/10.2174/092986705774462914>.
- Lieb, K., Engels, S., Fiebich, B.L., 2003. Inhibition of LPS-induced iNOS and NO synthesis in primary rat microglial cells. *Neurochem. Int.* 42, 131–137. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00076-1](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00076-1).
- Liere, V., Sandhu, G., Demorrow, S., 2017. Recent advances in hepatic encephalopathy [version 1; referees: 4 approved] Referee Status : 6. doi:10.12688/f1000research.11938.1
- Lu, Y.-F., Kandel, E.R., Hawkins, R.D., 1999. Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J. Neurosci.* 19, 10250–10261.
- Luo, M., Guo, J.Y., Cao, W.K., 2015. Inflammation: a novel target of current therapies for hepatic encephalopathy in liver cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* 21, 11815–11824. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i41.11815>.
- McAfoose, J., Baune, B.T., 2009. Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 355–366. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.10.005>.
- McMillin, M., Frampton, G., Thompson, M., 2014. Neuronal CCL2 is upregulated during hepatic encephalopathy and contributes to microglia activation and neurological decline. *J. Neuroinflammation* 11, 121. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-121>.
- Misel, M.L., Gish, R.G., Patton, H., Mandler, M., 2013. Hepatic Encephalopathy 9, 219–227.
- Monfort, P., Felipo, V., 2002. Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase and cGMP-degrading phosphodiesterase, alterations in hyperammonemia. *BMC Pharmacol.* 5, P66. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-5-S1-P66>.
- Monfort, P., Erceg, S., Piedrafita, B., Llansola, M., Felipo, V., 2007. Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2103–2111. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05444.x>.
- Monfort, P., Cauli, O., Montoliu, C., Rodrigo, R., Llansola, M., Piedrafita, B., El Mili, N., Boix, J., Agustí, A., Felipo, V., 2009. Mechanisms of cognitive alterations in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: Therapeutic implications. *Neurochem. Int.* 55, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.01.021>.

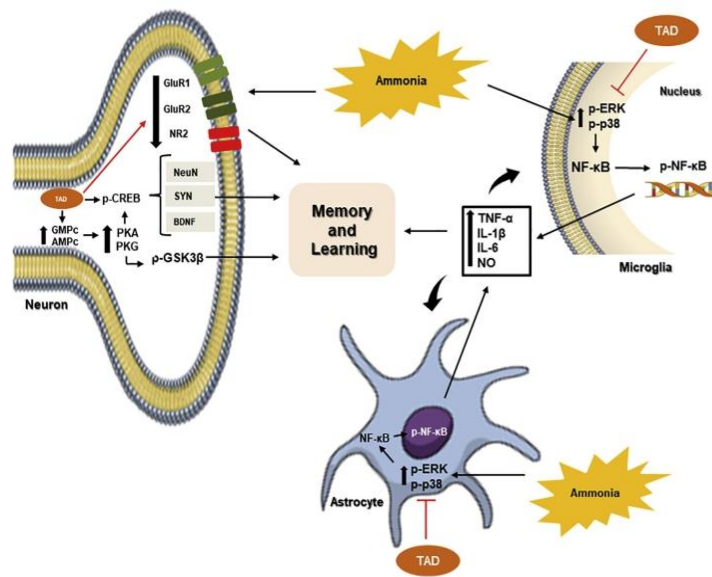


Fig. 12. Graphic resume showing signaling pathways possibly involved in mechanisms of action of Tadalafil in neuroinflammation, learning and memory. Tadalafil attenuates neuroinflammation via downregulation of p38 MAPK, ERK, NF- κ B, IL-1 β , IL-6 and TNF- α . Besides, Tadalafil promotes neurogenesis and plasticity by increasing PKA/PKG/CREB/BDNF/NeuN/synaptophysin and normalizes the expression of hippocampal glutamate receptors, restoring spatial learning ability and memory. Black arrows indicate activation, red arrows indicate regulation and T-shaped arrows indicate inhibition. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

treated with Tadalafil counteracted this effect, suggesting an important role of Tadalafil in neuroprotection. Besides, this result may be related to decreased levels of IL- β and increased BDNF levels observed after Tadalafil treatment.

The mechanism by which neurotransmission in hippocampus was altered by neuroinflammation involves pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β and TNF- α , which alter the expression of AMPA and NMDA receptors (Dadsetan et al., 2016). LTP is a form of synaptic plasticity that constitutes the bases for some forms of learning and memory and it is modulated by AMPA and NMDA receptors (Cauli et al., 2009; Montoliu et al., 2010; Morris and Frey, 1997). An altered LTP in the hippocampus as a consequence of the altered expression of AMPA, NMDA, and GABA receptors is related with glial activation, neuroinflammation and impaired spatial learning (Hernández-rabaza et al., 2016). According to previous studies, the Infliximab, an inhibitor of the TNF- α , reduced neuroinflammation and restored membrane expression of AMPA receptors and spatial learning (Dadsetan et al., 2016). In the present study, HE mice reduced the expression of the GluR1 and GluR2 (subunits of AMPA receptors) and GluN2 (subunit of NMDA receptor), which are related to increased pro-inflammatory cytokines. On the other hand, treatment with tadalafil modulated the expression of both glutamate receptors and inflammatory cytokines.

In conclusion, the results reported here demonstrated that treatment with tadalafil reduces neuroinflammation and neurodegeneration levels by decreasing inflammatory markers and glial activation in the cortex and hippocampus. Besides, Tadalafil also promotes and synaptic plasticity by increasing PKA/PKG/CREB/BDNF/NeuN/synaptophysin, and normalizes the expression of hippocampal glutamate receptors, restoring spatial learning ability and memory (Fig. 12). Therefore, our data point to a neuroprotective effect of Tadalafil that could be useful to improve cognitive function in patients with hepatic encephalopathy.

Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 301777/2012-8 and 140415/2015-7), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), the Instituto Aggeu Magalhães and Fundação de Amparo à Ciência e

Tecnologia de Estado de Pernambuco (IAM/FACEPE - APQ- 1572-2.10/15), Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM).

Conflict of interest

The authors declare no competing conflict of interest.

References

- Agusti, A., Cauli, O., Rodrigo, R., Llansola, M., Hernández-Rabaza, V., Felipo, V., 2011. p38 MAP kinase is a therapeutic target for hepatic encephalopathy in rats with portacaval shunts. *Gut* 60, 1572–1579. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.236083>.
- Ahmed, A.O., Mantini, A.M., Fridberg, D.J., Buckley, P.F., 2015. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurocognitive deficits in people with schizophrenia: a meta-analysis. *Psychiatry Res.* 226, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2014.12.069>.
- Avraham, Y., Grigoriadis, N.C., Magen, I., Poutahidis, T., Vorobiov, L., Zolotarev, O., Ilan, Y., Mechoulam, R., Berry, E.M., 2009. Capsaicin affects brain function in a model of hepatic encephalopathy associated with fulminant hepatic failure in mice. *Br. J. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00368.x>.
- Barrientos, R.M., Frank, M.G., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2010. Memory impairments in healthy aging: role of aging-induced microglial sensitization. *Aging Dis.* 1, 212–231. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3182540562>.
- Bémeur, C., Desjardins, P., Butterworth, R.F., 2010. Antioxidant and anti-inflammatory effects of mild hypothermia in the attenuation of liver injury due to azoxymethane toxicity in the mouse. *Metab. Brain Dis.* 25, 23–29. <https://doi.org/10.1007/s11011-010-9186-x>.
- Benito, E., Barco, A., 2010. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends Neurosci.* 33, 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.02.001>.
- Bobermin, L.D., Quincozes-Santos, A., Guerra, M.C., Leite, M.C., Souza, D.O., Gonçalves, C.A., Gottfried, C., 2012. Resveratrol prevents ammonia toxicity in Astroglial cells. *PLoS One* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052164>.
- Bradley, C.A., Peineau, S., Taghibiglou, C., Nicolas, C.S., Whitcomb, D.J., Bortolotto, Z.A., Kaang, B.-K., Cho, K., Wang, Y.T., Collingridge, G.L., 2012. A pivotal role of GSK-3 in synaptic plasticity. *Front. Mol. Neurosci.* 5, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00013>.
- Bubici, C., Papa, S., Dean, K., Franzoso, G., 2006. Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance. *Oncogene* 25, 6731–6748. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209936>.
- Budni, J., Belletini-Santos, T., Mina, F., Lima Garcez, M., Ioppi Zugno, A., 2015. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis.* 6, 331. <https://doi.org/10.14336/AD.2015.0825>.
- Butterworth, R.F., 2011a. Hepatic encephalopathy: a central neuroinflammatory disorder? *Hepatology* 53, 1372–1376. <https://doi.org/10.1002/hep.24228>.
- Butterworth, R.F., 2011b. Neuroinflammation in acute liver failure: mechanisms and

- Montoliu, C., Rodrigo, R., Monfort, P., Llansola, M., Cauli, O., Boix, J., Elmlili, N., Agusti, A., Felipo, V., 2010. Cyclic GMP pathways in hepatic encephalopathy. Neurological and therapeutic implications. *Metab. Brain Dis.* 25, 39–48. <https://doi.org/10.1007/s11011-010-9184-z>.
- Moore, A.H., Wu, M., Shaftel, S.S., Graham, K.A., O'Banion, M.K., 2009. Sustained expression of interleukin-1 β in mouse hippocampus impairs spatial memory. *Neuroscience* 164, 1484–1495. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.073>.
- Morris, R.G.M., Frey, U., 1997. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 352, 1489–1503. <https://doi.org/10.1098/rstb.1997.0136>.
- Moser, M.B., Moser, E.I., Forrest, E., Andersen, P., Morris, R.G., 1995. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9697–9701. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9697>.
- Nagai-Kusuhara, A., Nakamura, M., Mukuno, H., Kanamori, A., Negi, A., Seigel, G.M., 2007. cAMP-responsive element binding protein mediates a cGMP/protein kinase G-dependent anti-apoptotic signal induced by nitric oxide in retinal neuro-glial progenitor cells. *Exp. Eye Res.* 84, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.09.010>.
- Norenberg, M.D., Jayakumar, A.R., Rama Rao, K.V., Panickar, K.S., 2007. New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab. Brain Dis.* 22, 219–234. <https://doi.org/10.1007/s11011-007-9062-5>.
- Núñez, O., Fernández-Martínez, A., Majano, P.L., Apolinario, A., Gómez-Gonzalo, M., Benedicto, I., López-Cabrera, M., Boscá, L., Clemente, G., García-Monzón, C., Martín-Sanz, P., 2004. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut* 53, 1665–1672. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.038364>.
- Panikashvili, D., Simeonidou, C., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Breuer, A., Mechoulam, R., Shohami, E., 2001. An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* 413, 527–531. <https://doi.org/10.1038/35097089>.
- Peixoto, C.A., Nunes, A.K.S., Garcia-Osta, A., 2015. Phosphodiesterase-5 inhibitors: action on the signaling pathways of neuroinflammation, neurodegeneration, and cognition. *Mediat. Inflamm.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/940207>.
- Schnur, 2004. Thioacetamide-induced hepatic fibrosis in transforming growth factor beta-1 transgenic mice. *Ter Nagy a and Ja. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 127–133. <https://doi.org/10.1097/01.meg.0000085545.79233.da>.
- Shawcross, D.L., Davies, N.a., Williams, R., Jalan, R., 2004. Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J. Hepatol.* 40, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2003.10.016>.
- Shen, T., You, Y., Joseph, C., Mirzaei, M., Klistorner, A., Stuart, L., Gupta, V., 2018. BDNF polymorphism: a review of its diagnostic and clinical relevance in neurodegenerative disorders. *Aging Dis.* 9, 1–14. <https://doi.org/10.14336/AD.2017.0717>.
- Sinke, A.P., Jayakumar, A.R., Panickar, K.S., Moriyama, M., Reddy, P.V.B., Norenberg, M.D., 2008. NFB in the mechanism of Ammonia-induced astrocyte swelling in culture. *J. Neurochem.* 106, 2302–2311. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05549.x>.
- Tanabe, K., Matsushima-Nishiwaki, R., Yamaguchi, S., Iida, H., Dohi, S., Kozawa, O., 2010. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. *J. Neuroinflammation* 7, 16. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-16>.
- Tarsa, L., Goda, Y., 2002. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1012–1016. <https://doi.org/10.1073/pnas.022575999>.
- Ünal-Çevik, I., Kilinc, M., Gürsoy-Özdemir, Y., Gurer, G., Dalkara, T., 2004. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res.* 1015, 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.04.032>.
- Wilms, H., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., Zecca, L., Lucius, R., 2003. Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *FASEB J.* 17, 500–502. <https://doi.org/10.1096/fj.02.0314fe>.
- Wright, G., Jalan, R., 2007. Management of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 21, 95–110. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2006.07.009>.
- Wright, G., Noiret, L., Olde Damink, S.W.M., Jalan, R., 2011. Interorgan ammonia metabolism in liver failure: the basis of current and future therapies. *Liver Int.* 31, 163–175. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02302.x>.
- Yang, L., Wang, H., Liu, L., Xie, A., 2018. The role of insulin/IGF-1/PI3K/Akt/GSK3 β signaling in parkinson's disease dementia. *Front. Neurosci.* 12, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00073>.
- Ye, L., Huang, Y., Zhao, L., Li, Y., Sun, L., Zhou, Y., Qian, G., Zheng, J.C., 2013. IL-1 β and TNF- α induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *J. Neurochem.* 125, 897–908. <https://doi.org/10.1111/jnc.12263>.
- Zhang, J., Guo, J., Zhao, X., Chen, Z., Wang, G., Liu, A., Wang, Q., Zhou, W., Xu, Y., Wang, C., 2013. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil prevents neuroinflammation, lowers beta-amyloid levels and improves cognitive performance in APP/PS1 transgenic mice. *Behav. Brain Res.* 250, 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.017>.
- Zhu, J., Mix, E., Winblad, B., 2001. The antidepressant and antiinflammatory effects of rolipram in the central nervous system. *CNS Drug Rev.* 7, 387–398. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2001.tb00206.x>.

APÊNDICE B - ARTIGO II - CGMP SIGNALING PATHWAY IN HEPATIC ENCEPHALOPATHY NEUROINFLAMMATION AND COGNITION

International Immunopharmacology 79 (2020) 106082



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp



cGMP signaling pathway in hepatic encephalopathy neuroinflammation and cognition



Maria Eduarda Rocha de França^{a,b,*}, Christina Alves Peixoto^{a,c,*}

^a Laboratory of Ultrastructure, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Recife, Pernambuco, Brazil

^b Postgraduate Program in Biological Sciences (PPGCB), Federal University of Pernambuco Recife, Pernambuco, Brazil

^c Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

cGMP
Hepatic encephalopathy
Synaptic plasticity
CREB
Glutamate receptors

ABSTRACT

Hepatic encephalopathy (HE) is a complex neuropsychiatric syndrome that results from liver failure and is characterized by a wide range of symptoms such as alteration in the sleep-waking cycle, neuromuscular coordination, mood, and cognition. The deregulation of nitric oxide (NO)/cyclic guanosine monophosphate (cGMP)/protein kinase G (PKG) signaling pathway is thought to play an important role in the etiology and progression of neurodegenerative diseases, and several studies pointed that the cGMP signaling is impaired in patients with HE and experimental models of chronic hyperammonemia. This review aimed to briefly present the current knowledge of the cGMP signaling pathways in neuroinflammation, neurogenesis, and memory in hepatic encephalopathy and its potential therapeutic role.

1. Introduction

Hepatic encephalopathy (HE) is a multifactorial neuropsychiatry syndrome associated with severe acute and chronic liver disease, which exhibits a wide range of neuropsychiatric symptoms such as alteration in the sleep-waking cycle, neuromuscular coordination, mood and cognition. Although HE can be reversible, in some worse cases it can lead to coma and death [1].

The liver failure is responsible for impairment of the detoxification leading to an accumulation of ammonia and other toxic substances in the blood, which in turn reach the central nervous system and alter its function, however, the precise mechanism underlying the neurotoxicity of HE is still unknown. Although hyperammonemia has been considered the main factor responsible for neurological changes, more recently other factors have been proposed to contribute to neurotoxicity such as inflammation, oxidative stress and increased levels of bile acids and lactate. These factors induce blood-brain barrier (BBB) breakdown and the entry of neurotoxic substances into brain extracellular space, leading to brain edema. Astrocytes constitute a key component of the BBB and play a crucial role in the pathogenesis of brain edema and HE. Hyperammonemia leads to an excess of glutamine in astrocytes that cause hypertonicity, cytotoxic astrocyte swelling, and brain edema. These astrocytic functional changes impair the glutamate-glutamine metabolism leading to excitotoxicity and neuronal dysfunction. Additionally, damage to the astrocyte-neuronal communication as

well as the impairment of the glutamatergic and GABAergic neurotransmission are directly associated with neurological deficits of HE [1,2].

Interestingly, although hyperammonemia is always present in HE patients, the ammonia levels varies widely and seems to not correlate with the clinical severity (West Haven grade II-IV) [3]. More recently, some studies have shown that hyperammonemia, inflammation and oxidative stress have synergistic effects, which contribute to the pathogenesis of HE [4]. There is a positive correlation between the severity of HE and the serum inflammatory cytokine levels (TNF- α , IL-1 β , IL-2R, IL-6, IL-8) [5], as well as their reduction after treatment with lactulose [6]. Analyses by western blot of postmortem cortical brain tissue from patients with liver cirrhosis and HE showed a significant expression of microglial activation marker Iba-1, that was not associated with an up-regulation of inflammatory cytokines [7]. Interestingly, these results were confirmed by a microarray approach that showed an up-regulation of genes associated with microglia activation, in spite of unchanged pro-inflammatory cytokine messenger RNA profiles in the brains of patients with liver cirrhosis. In contrast, many genes related to counteracting inflammatory pathways and anti-inflammatory cytokine expression were up-regulated in these patients [8]. The HE pathogenesis is complex and one must avoid drawing simplistic conclusions based on conflicting reports that in fact could reflect the chronic stage of disease development, when negative feedback pathways signaling are upregulated.

* Address: Laboratory of Ultrastructure, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail addresses: mariaeduarda.rfanca@gmail.com (M.E.R.d. França), cpeixoto@cpqam.fiocruz.br (C.A. Peixoto).

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106082>

Received 27 August 2019; Received in revised form 5 November 2019; Accepted 24 November 2019

1567-5769/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

The oxidative stress is another important factor in HE pathogenesis. Post mortem cortical brain tissue samples from patients with cirrhosis with HE showed significantly elevated levels of tyrosine-nitrated proteins, heat shock protein-27, and 8-hydroxyguanosine as a marker for RNA, whereas glutamine synthetase (GS) activity was significantly decreased. According to the authors, the high levels of protein tyrosine nitration and RNA oxidation suggest a crucial role of oxidative/nitrosative in the pathogenesis of HE in patients with cirrhosis [9]. Another clinical study showed that minimal hepatic encephalopathy (MHE) patients show elevated serum 3-nitro-tyrosine levels, confirming that nitrosative stress is a feature of HE [10].

Cirrhotic patients without any evident symptom of neurological alterations have “minimal hepatic encephalopathy” (MHE) with mild impaired cognition, which includes psychomotor slowing and impaired ability to sustained attention, deficits of memory and visual perception. Hyperammonemia per se leads to an enhancement of inhibitory GABAergic neurotransmission. Besides, the synergic effects between hyperammonemia and neuroinflammation contribute to cognitive and motor alterations [11,12].

Peripheral inflammation in the portocaval shunt (PCS) rats induced activation of microglia (microgliosis) and astrocytes (astrogliosis) in the cerebellum and increased TNF α and IL-1 β . These pro-inflammatory cytokines promoted an increased membrane expression of GABA transporter GAT-3 in astrocytes, as well as increased extracellular GABA in the cerebellum, which led to motor incoordination and a reduced ability to learn the Y-maze task (review in Cabrera-Pastor et al., 2019) [13].

Clinical and experimental shreds of evidence indicated that the NO-cGMP-PKG signaling pathway interconnects neuroinflammation, neurodegeneration, and cognitive disorders. The accumulation of cGMP inhibits neuroinflammation and improves synaptic plasticity and memory resulting in an increased pharmaceutical interest in Phosphodiesterase type 5 inhibitors (PDE5Is) as promising therapeutic targets for neuropsychiatric diseases [14,15]. In the present article, we review the literature regarding cGMP in the development of HE and also discuss the potentials of the use of PDE5Is in the context of HE.

2. The role of NO-cGMP signaling pathway in hepatic encephalopathy neuroinflammation

Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) exert many neuroimmunological roles such as immunomodulation, synaptic transmission, neuroplasticity, neuronal survival consolidation of memory [16–20]. Both cAMP and cGMP can alter cell function by activating or inactivating proteins by phosphorylation by their main signal transducers, the cAMP-dependent protein kinase A (PKA) and the cGMP-dependent protein kinase G (PKG). Phosphodiesterases are responsible for the breakdown of cAMP and cGMP in their inactive forms, 5AMP and 5GMP, respectively. Some phosphodiesterases hydrolyze GMP and cAMP (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10, and PDE11), whereas others cleave preferentially cAMP (PDE4, PDE7, and PDE 8) or cGMP (PDE5, PDE6, and PDE9) [21]. Interestingly some brain areas are enriched in PDE5 such as cerebellum, hippocampus, caudate, Substantia nigra, and cerebellum [22,23]. The deregulation of nitric oxide (NO)/cGMP/PKG signaling pathway is thought to play an important role in the etiology and progression of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), multiple sclerosis (MS) (reviewed in [21]) and Huntington's disease (HD) [23].

The inflammatory response involves a well-coordinated expression of inflammatory mediators. The transcription factor Nuclear Factor-kappaB (NF- κ B) plays a crucial role in the gene expression of several pro-inflammatory and immune mediators. The NO-cGMP pathway can directly or indirectly inhibit vascular NF- κ B inflammatory activity, limiting local inflammation [24].

The NO/cGMP/PKG pathway appears to play an important crucial

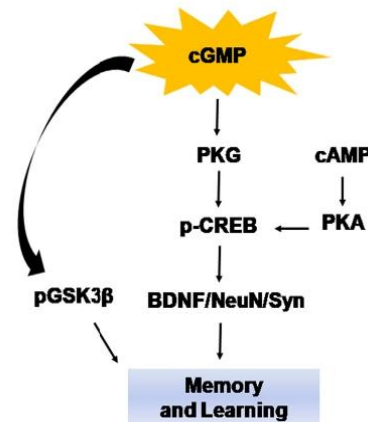


Fig. 1. Schematic illustration of the effects of PDE5Is in learning and memory. The increase in cGMP promotes an improvement in the synaptic plasticity by increasing the GSK3 β phosphorylation and activating the signaling cascade of PKA, PKG, ERK, CREB, BDNF, NeuN and synaptophysin, which normalizes the expression of hippocampal glutamate receptors, restoring spatial learning ability and memory.

role as an antiapoptotic/prosurvival factor [25]. Takuma et al (2001) demonstrated that cGMP analog can inhibit apoptosis in cultured astrocytes exposed to H₂O₂ by inhibiting the release of cytochrome c [26].

NO/cGMP/PKG antiapoptotic cascade is activated through the cAMP-responsive element binding protein (CREB) [27], the transcription factor with essential functions for neurogenesis, neuronal survival, synaptic plasticity, and memory consolidation [28,29]. CREB activates the transcription of several survival genes, such as B cell leukemia/lymphoma-2 (Bcl2) and Myeloid cell leukemia 1 (Mcl1), as well as bdnf gene to promote cell survival [30,31]. The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is one of the major gene products of CREB-mediated transcription and has an important role in the differentiation and survival of neurons of the CNS and in long-term potentiation (LTP) [32]. Thus, the NO/cGMP/PKG/CREB/BDNF pathway has a critical role in neurogenesis and synaptic plasticity.

Recently, Duarte-Silva et al (2018) demonstrated that treatment with sildenafil, a PDE5 inhibitor, ameliorated EAE by decreasing apoptosis in the spinal cord of C57BL/6 mice. Sildenafil modulated the expression of pro- and antiapoptotic proteins of extrinsic (Caspase-8, -3, TNF- α , FADD) and intrinsic (Caspase-9, Bax and Cytochrome C) pathways, as well as diminished the expression of non-caspasemediators (p-I κ B α and p-MAPK-p38) and promoted remyelination in the spinal cord, indicating neuroprotective effects of the NO/cGMP/PKG pathway [33].

The inflammation plays an important role in the pathology of HE [34] and several evidence show that cGMP can play a role in modulating the inflammatory response such as reduction of oxidative stress and the production of proinflammatory cytokines such as interleukins (ILs) and TNF- α [35].

Another study reported that rats with minimal hepatic encephalopathy (MHE) due to PCS, showed microglia activation in the hippocampus evidenced by a cellular reduced perimeter. In contrast, treatment with the inhibitor of phosphodiesterase 5, sildenafil, restored the microglial morphology as well as the cellular perimeter. Moreover, MHE animals showed an increased expression of IL-1 β and TNF- α in the hippocampus, whereas treatment with sildenafil reduced the expression of these proinflammatory cytokines. This work reported that sildenafil reduces neuroinflammation through an increased cGMP and activation of cGMP-dependent protein kinase (PKG) [36].

Another study investigated another brain area to elucidate whether

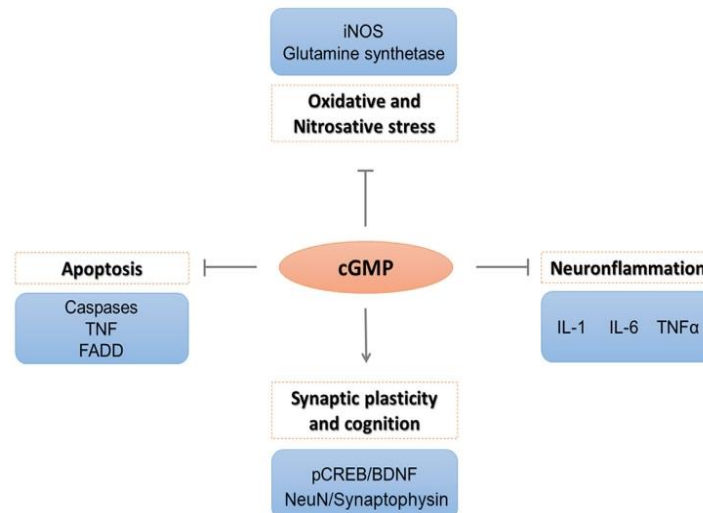


Fig. 2. Graphic resume showing signaling pathways possibly involved in mechanisms of action cGMP in neuroinflammation, oxidative stress, apoptosis and synaptic plasticity and cognition.

sildenafil regulates the neuroinflammation in the cerebellum of MHE rats. MHE rats exhibited an increased extracellular GABA concentration in the cerebellum, resulting in increased gabaergic tone and impaired motor coordination. Besides, these animals showed an activation of microglia and astrocytes associated with increased levels of IL-1 β and TNF- α . In contrast, Sildenafil treatment increased cGMP levels and reduced all these neuroinflammation parameters. Sildenafil also normalized membrane expression of GABA receptor and transporters as well as restored motor coordination. Thus, this work showed that MHE rats present reduced cGMP associated with neuroinflammation in the cerebellum and that sildenafil treatment acted as an anti-inflammatory [37].

Recently, Cabrera-Pastor et al demonstrated that rats with hyperammonemia induced by 20% of ammonium acetate in the diet, presented astrocytes and microglia activated in the cerebellum, effects that were counteracted by cGMP. Microgliosis and astrogliosis reflected by an increase of Iba-1 and GFAP levels respectively were normalized by treatment with cGMP. Besides, the nuclear content of the p50 subunit of NF- κ B was increased in hyperammonemic rats, but normalized after treatment with cGMP. Thus, these authors demonstrated that extracellular cGMP reduces neuroinflammation in the cerebellum in HE model [38].

A study conducted by Chung et al., (2001) showed that rats treated with the nonsteroidal anti-inflammatory drug, indomethacin, after portocaval anastomosis, prevented the development of brain edema [39]. Similarly, Cauli et al demonstrated that treatment with the anti-inflammatory ibuprofen reduced the activity of inflammatory markers such as iNOS and COX in the cerebral cortex of rats with PCS. Moreover, ibuprofen restored the ability to learning in the Y-maze task by normalizing the function of the glutamate-NO-cGMP pathway [40]. Besides, these authors also showed that both rats with hyperammonemia without hepatic insufficiency induced by feeding an ammonium-containing diet, and rats with hyperammonemia and hepatic damage induced by ligation of the bile duct, exhibited alteration in the glutamate-NO-cGMP pathway, microglial activation and neuroinflammation in the cerebellum. On the other hand, treatment with Ibuprofen reduced microglial activation and restored motor and cognitive function in both hyperammonemic models. These studies have demonstrated that high levels of ammonia can directly induce

neuroinflammation and cognitive impairment in hepatic encephalopathy that can be counteracted by the glutamate-NO-cGMP pathway.

3. The role of NO-cGMP signaling pathway in hepatic encephalopathy cognition

Hippocampal cAMP/PKA and cGMP/PKG signaling are a crucial event that contributes to synaptic plasticity and memory acquisition and consolidation through CREB-mediated gene transcription (Bollen et al., 2014; Rutten et al., 2007). LTP is a form of synaptic plasticity that is required in the hippocampus for certain forms of learning and memory [42]. Activation of the glutamate-NO-cGMP pathway is necessary for adequate induction and maintenance of NMDA receptor-dependent LTP [43]. The late protein synthesis-dependent phase of LTP (L-LTP) is dependent on genes transcription via CREB phosphorylation, which is mediated by PKA and PKG [18,41]. Thus, targeting and enhancing components of NO/cGMP/CREB pathway represent a therapeutic opportunity to treat cognitive dysfunction in neurodegenerative diseases [44].

According to Monfort et al. (2007), in hyperammonemia and hepatic altered glutamatergic neurotransmission deregulates LTP inducing the cognitive deficits in patients with liver diseases. They demonstrated that hippocampal LTP impairment observed in liver failure is caused by reduced activation of AMPA and NMDA receptors. Also, rats with MHE showed reduced expression of the GluR1 and GluR2 subunits of the AMPA receptor and NR1, NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor in the hippocampus. Interestingly, these animals presented low levels of hippocampal cGMP and learning impairment in the Morris water maze task. As activation of the glutamate-NO-cGMP pathway is required for proper induction and maintenance of NMDA receptor-dependent LTP, this study reports a link between altered cGMP metabolism and LTP, which contribute to a learning deficit in hepatic failure [45,46].

Other studies showed that impairment of the learning ability of hyperammonemic rats is completely reversed after intracerebral administration of zaprinast, a phosphodiesterase 5-6 inhibitor (PDE5-6I), evaluated by Y maze test. This result demonstrates that increasing cGMP through inhibition of its degradation restores learning capacity in hyperammonemic rats induced by ammonia diet. The possible

explanation for the beneficial effects of PDE5-61 administration evolves the NMDA/nNOS/soluble guanylate cyclase/cGMP signaling. Activation of NMDA receptors leads to increased calcium in the post-synaptic neuron, which by its turn, binds to calmodulin, activating the nitric oxide synthase resulting in increased NO. Thus, NO activates the soluble guanylate cyclase, increasing the cGMP content, that plays an important role in learning and memory [47]. Later these authors studying rats with PCS and hyperammonemic rats without hepatic failure confirmed an alteration of the glutamate-NO-cGMP pathway. Besides, they observed that these animals had a reduction in the levels of cGMP in cerebellar extracellular fluid and impairment of learning ability when performing Y-Maze test. Conversely, the chronic treatment with sildenafil increased the extracellular cGMP content, normalizing the glutamate-NO-cGMP pathway and the learning ability [48]. It has been reported that increased alpha-aminobutyric acid ("GABAergic tone") implies in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. Cauli et al demonstrated that rats with chronic hyperammonemia showed increased "GABAergic tone" in the cerebellum. When the "GABAergic tone" is increased, it means that there is increased activation of GABA receptors, which interfere with the glutamate-NO-cGMP pathway in the cerebellum [49] and in the cerebral cortex [50] resulting in the reduction of cGMP. It is known that the reduced function of the glutamate-NO-cGMP pathway in the cerebellum is responsible for impaired learning in hyperammonemic rats. Chronic treatment with a GABAA receptor blocker, bicuculline, was able to restore glutamate-NO-cGMP pathway, increase extracellular cGMP levels in the cerebellum, and improve learning ability task in Y-maze. On the other hand, blockade of GABAA receptors in the cerebral cortex did not affect extracellular cGMP levels in hyperammonemic rats. Thus, hyperammonemia may differentially affect the modulation of the NO-cGMP pathway in the cerebellum and cortex. In fact, this study supports that the increase of the GABA receptors contributes to the reduction of the glutamate-NO-cGMP pathway while that the inhibition of GABA receptor can restore the function of this pathway and improves learning capacity in HE [51].

Hernandez-Rabaza et al. demonstrated that the expression of the alpha 1 subunit of GABA A receptors was increased in PCS rats [36]. Differently from the results obtained by Monfort et al (2007), they showed that expression of the NR1 and NR2A (subunits of NMDA) and GluR1 (subunit of AMPA) receptors were reduced, while the expression of the GluR2 subunit (subunit of AMPA) was strongly increased in rats with MHE [46]. However, treatment with sildenafil normalized the expression of all glutamatergic subunits in these animals. In addition, rats with MHE showed reduced learning ability in Morris water maze, which was restored by sildenafil treatment. Thus, according to these authors, hippocampal neuroinflammation induces alteration in GABAergic and glutamatergic neurotransmission and consequently causes impairment of spatial learning in MHE model. On another hand, treatment with sildenafil was able to reduce the levels of proinflammatory cytokines, normalize expression of GABA, AMPA and NMDA receptor and restore spatial learning ability [36]. These data suggest that modulation of cGMP levels through phosphodiesterase inhibitors is sufficient to restore learning ability.

A recent study of Cabrera-Pastor et al. (2019) demonstrated that chronic hyperammonemia alters extracellular glutamate, glutamine, GABA and GABA transporters in rat cerebellum. According to these authors, hyperammonemic rats showed increased membrane expression of the astrocytic glutamine transporter SNAT3 and reduced membrane expression of the neuronal transporter SNAT1; (b) reduced membrane expression of the neuronal GABA transporter GAT1 and increased membrane expression of the astrocytic GAT3 transporter; (c) reduced membrane expression of the astrocytic glutamate transporters GLAST and GLT-1 and of the neuronal transporter EAAC1. Intracerebral administration of cGMP counteracted these effects and normalized the levels of glutamate, glutamine and GABA and GABA transporters [52].

Results obtained in our lab demonstrated that the PDE5 inhibitor, tadalafil, reduced the microgliosis and astrogliosis in the cortex and

hippocampus as well as reduced inflammatory markers such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 in mice with thioacetamide-induced HE. Tadalafil was also able to normalize the expression of glutamate receptors (AMPA and NMDA) in the hippocampus, restoring spatial learning capacity and memory of hyperammonemic animals in Barnes maze test. In addition, tadalafil also promoted neurogenesis and synaptic plasticity, increasing the levels of PKA/PKG/CREB /BDNF/NeuN/synaptophysin. Moreover, mice with HE showed a reduction of p-GSK3 β , whereas Tadalafil potentiated the phosphorylation of this protein, inhibiting its activity, which may also be related to the improvement in the performance of the animals in Barnes maze [53]. In sum, this study demonstrated a neuroprotective effect of PDE5 inhibitor and highlighted its pharmacological potential to improve cognitive function in patients with hepatic encephalopathy [53] (Fig. 1).

4. Conclusion

In recent years, knowledge about cGMP/PKG signaling has emerged as a promising target for neuroinflammation and cognitive disorders such as hepatic encephalopathy. The mechanisms of action of cGMP possibly involve signaling pathways of modulation of neuroinflammation, oxidative stress, apoptosis and synaptic plasticity and cognition (Fig. 2). Several clinical and preclinical studies have shown that PDE5Is appear to be safe and effective in treating neurological disorders. Certainly, knowledge of this subject will provide a conceptual framework for the use of PDE5Is and/or for the design and delivery of novel selective agents.

Funding

The authors would like to express their gratitude to Oswaldo Cruz Foundation of Pernambuco (FIOCRUZ-PE), the Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM; #465489/2014-1) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; #301777/2012-8) for research support. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

Declaration of Competing Interest

None.

References

- [1] A.R. Jayakumar, M.D. Norenberg, Hyperammonemia in Hepatic encephalopathy, *J. Clin. Exp. Hepatol.* 8 (2018) 11–13, <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2018.06.007>.
- [2] R. Ochoa-Sanchez, C.F. Rose, Pathogenesis of hepatic encephalopathy in chronic liver disease, *J. Clin. Exp. Hepatol.* 8 (2018), <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2018.08.001>.
- [3] M. Mallet, N. Weiss, D. Thabut, M. Rudler, Why and when to measure ammonemia in cirrhosis?, 2018, pp. 1–7.
- [4] C.R. Bosoi, C.F. Rose, Oxidative stress: a systemic factor implicated in the pathogenesis of hepatic encephalopathy, 2013, pp. 175–178. doi:10.1007/s11011-012-9351-5.
- [5] Goral, The relation between pathogenesis of liver cirrhosis, hepatic encephalopathy and serum cytokine levels: what is the role of tumor necrosis factor α ?, 2011.
- [6] L. Jain, B.C. Sharma, S. Srivastava, S.K. Puri, P. Sharma, Serum endotoxin, inflammatory mediators, and magnetic resonance spectroscopy before and after treatment in patients with minimal hepatic encephalopathy, 28 (2013) 1187–1193. doi:10.1111/jgh.12160.
- [7] I. Zemtsova, B. Görg, V. Keitel, H.J. Bidmon, K. Schrör, D. Häussinger, Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans, *Hepatology* 54 (2011) 204–215, <https://doi.org/10.1002/hep.24326>.
- [8] B. Görg, M. Wettstein, S. Metzger, F. Schliess, D. Häussinger, Lipopolysaccharide-induced tyrosine nitration and inactivation of hepatic glutamine synthetase in the rat, *Hepatology* 41 (2005) 1065–1073, <https://doi.org/10.1002/hep.20662>.
- [9] B. Görg, N. Qvarthava, H.J. Bidmon, N. Palomero-Gallagher, G. Kirchheis, K. Zilles, D. Häussinger, Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and

- hepatic encephalopathy, *Hepatology* 52 (2010) 256–265, <https://doi.org/10.1002/hep.23656>.
- [10] C. Montoliu, O. Cauli, A. Urios, N. Elmlili, M.A. Serra, R. Giner-duran, O. Gonz, J.A. Del Olmo, A. Wassel, 3-Nitro-Tyrosine as a peripheral biomarker of minimal hepatic encephalopathy in patients with liver Cirrhosis, (2011) 1629–1637. doi:10.1038/ajg.2011.123.
 - [11] M. Llansola, C. Montoliu, A. Agustí, V. Hernández-Rabaza, A. Cabrera-Pastor, B. Gomez-Gimenez, M. Malaguarnera, S. Dadsetan, M. Belghiti, R. Garcia-Garcia, T. Balzano, L. Taoro, V. Felipo, Interplay between glutamatergic and GABAergic neurotransmission alterations in cognitive and motor impairment in minimal hepatic encephalopathy, *Neurochem. Int.* 88 (2015) 15–19, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.10.011>.
 - [12] E.A. Jones, Ammonia, the GABA neurotransmitter system, and hepatic encephalopathy, 17 (2002) 275–281.
 - [13] A. Cabrera-Pastor, M. Llansola, C. Montoliu, M. Malaguarnera, T. Balzano, L. Taoro-Gonzalez, R. Garcia-Garcia, A. Mangas-Losada, P. Izquierdo-Altarejos, Y.M. Arenas, P. Leone, V. Felipo, Peripheral inflammation induces neuroinflammation that alters neurotransmission and cognitive and motor function in hepatic encephalopathy: underlying mechanisms and therapeutic implications, *Acta Physiol.* 226 (2019), <https://doi.org/10.1111/apha.13270>.
 - [14] C.A. Peixoto, A. Karolina, S. Nunes, A. Garcia-osta, Phosphodiesterase-5 Inhibitors: Action on the Signaling Pathways of Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Cognition, 2015, 2015. doi:10.1155/2015/940207.
 - [15] A. Garcia-Osta, M. Cuadrado-Tejedor, C. Garcia-Barroso, J. Oyarzábal, R. Franco, Phosphodiesterases as therapeutic targets for Alzheimer's disease, *ACS Chem. Neurosci.* (2012), <https://doi.org/10.1021/cn3000907>.
 - [16] C. Raposo, R.L. de A. Luna, A.K.S. Nunes, R. Thomé, C.A. Peixoto, Role of iNOS-NO-cGMP signaling in modulation of inflammatory and myelination processes, *Brain Res. Bull.* 104 (2014) 60–73.
 - [17] K.T. Ota, V.J. Pierre, J.E. Ploski, K. Queen, G.E. Schafe, The NO-cGMP-PKG signaling pathway regulates synaptic plasticity and fear memory consolidation in the lateral amygdala via activation of ERK / MAP kinase, 2008, pp. 792–805. doi:10.1101/im.1114808.Holscher.
 - [18] Y. Matsumoto, S. Unoki, H. Aonuma, M. Mizunami, Critical role of nitric oxide-cGMP cascade in the formation of cAMP-dependent long-term memory, (2006) 35–44. doi:10.1101/im.130506.1.
 - [19] Y.-F. Lu, E.R. Kandel, R.D. Hawkins, Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus, *J. Neurosci.* 19 (1999) 10250–10261.
 - [20] J. Garthwaite, Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission, 27 (2008) 2783–2802. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06285.x.
 - [21] E. Bollen, J. Prickaerts, Phosphodiesterases in neurodegenerative disorders, *IUBMB Life* (2012), <https://doi.org/10.1002/iub.1104>.
 - [22] J. Kotera, K. Fujishige, K. Omori, Immunohistochemical Localization of cGMP-binding cGMP-specific Phosphodiesterase (PDE5) in Rat Tissues, 48 (2000) 685–693.
 - [23] A. Saavedra, A. Giral, H. Arumi, J. Alberch, E. Pérez-Navarro, Regulation of Hippocampal cGMP Levels as a Candidate to Treat Cognitive Deficits in Huntington's Disease, *PLoS One*. 8 (2013) 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0073664.
 - [24] C.A. Peixoto, A.K.S. Nunes, A. Garcia-Osta, Phosphodiesterase-5 inhibitors: action on the signaling pathways of neuroinflammation, neurodegeneration, and cognition, *Mediat. Inflamm.* 2015 (2015), <https://doi.org/10.1155/2015/940207>.
 - [25] E. Duarte-silva, C.A. Peixoto, Molecular Mechanisms of Phosphodiesterase-5 Inhibitors on Neuronal Apoptosis, 37 (2018) 1–5. doi:10.1089/dna.2018.4410.
 - [26] K. Takuma, P. Phuagphong, E. Lee, K. Mori, A. Baba, T. Matsuda, Anti-apoptotic Effect of cGMP in Cultured Astrocytes, 276 (2001) 48093–48099. doi:10.1074/jbc.M10862200.
 - [27] A. Nagai-Kusuhara, M. Nakamura, H. Mukuno, A. Kanamori, A. Negi, G.M. Seigel, cAMP-responsive element binding protein mediates a cGMP/protein kinase G-dependent anti-apoptotic signal induced by nitric oxide in retinal neuro-glial progenitor cells, *Exp. Eye Res.* 84 (2007) 152–162, <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.09.010>.
 - [28] R.S. Bitner, Cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation: a mechanistic marker in the development of memory enhancing Alzheimer's disease therapeutics, *Biochem. Pharmacol.* 83 (2012) 705–714, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.11.009>.
 - [29] C. Cunha, R. Brambilla, K.L. Thomas, A simple role for BDNF in learning and memory? *Front. Mol. Neurosci.* 3 (2010) 1, <https://doi.org/10.3389/fnmo.02.001.2010>.
 - [30] M.R. Walton, M. Dragunow, Is CREB a key to neuronal survival, ? (2000) 48–53.
 - [31] Dawson, Ginty, CREB family transcription factors inhibit neuronal suicide, 8 (2002) 450–451.
 - [32] C. Cunha, R. Brambilla, K.L. Thomas, A simple role for BDNF in learning and memory? *Front. Mol. Neurosci.* 3 (2010), <https://doi.org/10.3389/fnmo.02.001.2010>.
 - [33] E. Duarte-silva, S. Meiry, W. Helena, D. Bezerra, D. Lós, M. Eduarda, R. De França, A. Pires, G. Peron, L. De Lima, L. Verinaud, A. Karolina, D.S. Nunes, Sildenafil i ameliorates EAE by decreasing apoptosis in the spinal cord of C57BL/6 mice, *J. Neuroimmunol.* 321 (2018) 125–137, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.06.002>.
 - [34] A.R. Jayakumar, K.V. Rama Rao, M.D. Norenberg, Neuroinflammation in hepatic encephalopathy: mechanistic aspects, *J. Clin. Exp. Hepatol.* 5 (2014) S21–S28, <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2014.07.006>.
 - [35] V. Felipo, Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function, *Nat. Rev. Neurosci.* 14 (2013) 851–858, <https://doi.org/10.1038/nrn3587>.
 - [36] V. Hernandez-Rabaza, A. Agustí, A. Cabrera-Pastor, S. Fustero, O. Delgado, L. Taoro-Gonzalez, C. Montoliu, M. Llansola, V. Felipo, Sildenafil reduces neuroinflammation and restores spatial learning in rats with hepatic encephalopathy: underlying mechanisms., *J. Neuroinflamm.* 12 (2015) 195. doi:10.1186/s12974-015-0420-7.
 - [37] A. Agustí, V. Hernández-Rabaza, T. Balzano, L. Taoro-Gonzalez, A. Ibañez-Grau, A. Cabrera-Pastor, S. Fustero, M. Llansola, C. Montoliu, V. Felipo, Sildenafil reduces neuroinflammation in cerebellum, restores GABAergic tone, and improves motor incoordination in rats with hepatic encephalopathy, *CNS Neurosci. Ther.* 23 (2017) 386–394, <https://doi.org/10.1111/cns.12688>.
 - [38] A. Cabrera-Pastor, T. Balzano, V. Hernández-Rabaza, M. Malaguarnera, M. Llansola, V. Felipo, Increasing extracellular cGMP in cerebellum in vivo reduces neuroinflammation, GABAergic tone and motor incoordination in hyperammonemic rats, *Brain Behav. Immun.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.12.013>.
 - [39] and B. Chung, Gottstein, Indomethacin Prevents the Development of Experimental Ammonia-Induced Brain Edema in Rats After Portacaval Anastomosis, 2001. doi:10.1053/jhep.2001.26383.
 - [40] O. Cauli, R. Rodrigo, B. Piedrafit, J. Boix, V. Felipo, Inflammation and hepatic encephalopathy: Ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts, *Hepatology* 46 (2007) 514–519, <https://doi.org/10.1002/hep.21734>.
 - [41] K. Rutten, J. Prickaerts, M. Hendrix, F.J. Van Der Staay, Time-dependent involvement of cAMP and cGMP in consolidation of object memory: studies using selective phosphodiesterase type 2, 4 and 5 inhibitors, 558 (2007) 107–112. doi:10.1016/j.ejphar.2006.11.041.
 - [42] T.V. Bliss, G.L. Collingridge, A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus, *Nature* 361 (1993) 31–39, <https://doi.org/10.1038/361031a0>.
 - [43] P. Monfort, V. Felipo, Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase and cGMP-degrading phosphodiesterase, alterations in hyperammonemia, *BMC Pharmacol.* 5 (2002) P66, <https://doi.org/10.1186/1471-2210-5-S1-P66>.
 - [44] M.A. Hollas, M. Ben Aissa, S.H. Lee, J.M. Gordon-blake, R.J. Thatcher, Pharmacological manipulation of cGMP and NO/cGMP in CNS drug discovery, *Nitric Oxide* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.10.006>.
 - [45] P. Monfort, Effects of Hyperammonemia and Liver Failure on Glutamatergic Neurotransmission, 17 (2002) 237–238.
 - [46] P. Monfort, S. Erceg, B. Piedrafit, M. Llansola, V. Felipo, Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability, *Eur. J. Neurosci.* 25 (2007) 2103–2111, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05444.x>.
 - [47] S. Erceg, P. Monfort, M. Hernandez-Viadel, M. Llansola, C. Montoliu, V. Felipo, Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain, *Brain Res.* 1036 (2005) 115–121, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.12.045>.
 - [48] S. Erceg, P. Monfort, M. Hernández-Viadel, R. Rodrigo, C. Montoliu, V. Felipo, Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts, *Hepatology* 41 (2005) 299–306, <https://doi.org/10.1002/hep.20565>.
 - [49] E. Fedele, M.A. Ansakdo, G. Varnier, M. Raiteri, Benzodiazepine-sensitive GABA(A) receptors limit the activity of the NMDA/NO/cyclic GMP pathway: a microdialysis study in the cerebellum of freely moving rats, *J. Neurochem.* 75 (2000) 782–787, <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750782.x>.
 - [50] O. Pepicelli, A. Brescia, E. Gherzi, M. Raiteri, E. Fedele, GABAA, but not NMDA, receptors modulate in vivo NO-mediated cGMP synthesis in the rat cerebral cortex, *Neuropharmacology* 46 (2004) 480–489, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2003.10.010>.
 - [51] O. Cauli, M.T. Mansouri, A. Agustí, V. Felipo, Hyperammonemia Increases GABAergic tone in the cerebellum but decreases it in the rat cortex, *Gastroenterology* 136 (2009) 1359–1367.e2, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.12.057>.
 - [52] A. Cabrera-Pastor, Y.M. Arenas, L. Taoro-Gonzalez, C. Montoliu, V. Felipo, Chronic hyperammonemia alters extracellular glutamate, glutamine and GABA and membrane expression of their transporters in rat cerebellum. Modulation by extracellular cGMP, *Neuropharmacology*. (2019), <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.01.011>.
 - [53] M.E.R. De França, R. Kelly, L. Gomes, W. Helena, E. Duarte-silva, S. Meyre, R. Araújo, D. Bezerra, Tadala fi l restores long-term memory and synaptic plasticity in mice with hepatic encephalopathy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 379 (2019) 114673, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114673>.
 - [54] M.K. King, M. Pardo, Y. Cheng, K. Downey, R.S. Jope, E. Beurel, Glycogen synthase kinase-3 inhibitors: rescuers of cognitive impairments, *Pharmacol. Ther.* (2014), <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.010>.
 - [55] B. Peineau, Taghibiglou, Article LTP Inhibits LTD in the Hippocampus via Regulation of GSK3 b, (2007) 703–717. doi:10.1016/j.neuron.2007.01.029.

APÊNDICE C – ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DE 2015-2019

DUARTE-SILVA, EDUARDO ; ARAÚJO, SHYRLENE MEIRY DA ROCHA ; OLIVEIRA, WILMA HELENA ; LÓS, DENIELE BEZERRA DE ; **FRANÇA, MARIA EDUARDA ROCHA DE** ; BONFANTI, AMANDA PIRES ; PERON, GABRIELA ; THOMAZ, LIVIA DE LIMA ; VERINAUD, LIANA ; NUNES, ANA KAROLINA DE SANTANA ; PEIXOTO, CHRISTINA ALVES . Sildenafil ameliorates EAE by decreasing apoptosis in the spinal cord of C57BL/6 mice. JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, v. 321, p. 125-137, 2018.

SANTOS, LAISE ALINE MARTINS DOS ; RODRIGUES, GABRIEL BARROS ; MOTA, FERNANDA VIRGÍNIA BARRETO ; **FRANÇA, MARIA EDUARDA ROCHA DE** ; DE SOUZA BARBOSA, KARLA PATRÍCIA ; OLIVEIRA, WILMA HELENA DE ; ROCHA, SURA WANESSA SANTOS ; LÓS, DENIELE BEZERRA ; SILVA, AMANDA KAROLINA SOARES ; SILVA, TERESINHA GONÇALVES DA ; PEIXOTO, CHRISTINA ALVES . New thiazolidinedione LPSF/GQ-2 inhibits NFκB and MAPK activation in LPS-induced acute lung inflammation. INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY, v. 57, p. 91-101, 2018.

FRANÇA, MARIA EDUARDA ROCHA DE; ROCHA, SURA WANESSA SANTOS ; OLIVEIRA, WILMA HELENA ; SANTOS, LAISE ALINE ; DE OLIVEIRA, ANNE GABRIELLE VASCONCELOS ; BARBOSA, KARLA PATRÍCIA SOUSA ; NUNES, ANA KAROLINA SANTANA ; RODRIGUES, GABRIEL BARROS ; LÓS, DENIELE BEZERRA ; PEIXOTO, CHRISTINA ALVES . Diethylcarbamazine attenuates the expression of pro-fibrogenic markers and hepatic stellate cells activation in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. INFLAMMOPHARMACOLOGY, v. 2017, p. 1-11, 2017.

RODRIGUES, GABRIEL BARROS ; OLIVEIRA, ELQUIO ELEAMEN ; JUNIOR, FRANCISCO JAIME BEZERRA MENDONÇA ; SANTOS, LAISE ALINE MARTINS DOS ; OLIVEIRA, WILMA HELENA DE ; **FRANÇA, MARIA EDUARDA ROCHA DE** ; LÓS, DENIELE BEZERRA ; GABÍNIO, BRENNDA MARTINS ; DE LIRA, FÁBIA CRISTIANE MELO LEITE ; PEIXOTO, CHRISTINA ALVES . Characterization and evaluation of nanoencapsulated diethylcarbamazine in model of acute hepatic inflammation. INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY, v. 50, p. 330-337, 2017.

DE OLIVEIRA, WILMA HELENA ; DE SANTANA NUNES, ANA KAROLINA ; **FRANÇA, M. E. R.** ; DOS SANTOS, LAISE ALINE ; LÓS, DENIELE BEZERRA ; ROCHA, SURA WANESSA SANTOS ; DE SOUSA BARBOSA, KARLA PATRÍCIA ; RODRIGUES, GABRIEL BARROS ; PEIXOTO, C. A. . Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice. Brain Research, v. 1644, p. 149-160, 2016.

KHALAJ, KASRA ; LUNA, RAYANA LEAL ; **FRANÇA, MARIA EDUARDA ROCHA DE** ; OLIVEIRA, WILMA HELENA DE ; PEIXOTO, CHRISTINA ALVES ; TAYADE, CHANDRAKANT . RNA binding protein, tristetraprolin in a murine model of recurrent pregnancy loss. OncoTarget, v. 7, p. 72486-72502, 2016.

RODRIGUES, GABRIEL BARROS ; ROCHA, SURA WANESSA SANTOS ; SANTOS, LAISE ALINE MARTINS DOS ; DE OLIVEIRA, WILMA HELENA ; GOMES, FABIANA OLIVEIRA DOS SANTOS ; **FRANÇA, MARIA EDUARDA ROCHA** ; LÓS, DENIELE BEZERRA ; PEIXOTO, CHRISTINA ALVES . Diethylcarbamazine: Possible therapeutic alternative in the treatment of alcoholic liver disease in C57BL/6 mice. Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology, v. 42, p. 369-379, 2015

ANEXO A- CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

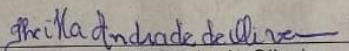
Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE-5 SOBRE A NEURODEGENERAÇÃO E COGNIÇÃO EM MODELO DE ENCEFALOPATIA HEPÁTICA INDUZIDO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 WILD TYPE" protocolado sob nº 86/2015 pelo (a) pesquisador (a) Dr^a Christina Alves Peixoto está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 11/04/2016. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até abril de 2018.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongo isogênico C57BL6/J macho	310
TOTAL	310

We certify that project "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE-5 SOBRE A NEURODEGENERAÇÃO E COGNIÇÃO EM MODELO DE ENCEFALOPATIA HEPÁTICA INDUZIDO EM CAMUNDONGOS C57BL/6 WILD TYPE" (CEUA Protocol nº 86/2015) coordinated by CHRISTINA ALVES PEIXOTO is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz on April, 12, 2016. In present version this project is licensed and valid until april 2018.

Recife (PE, BRAZIL) April, 12, 2016


Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira
Coordenadora CEUA/CPqAM
Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira
Coordenadora da Comissão de Ética
no Uso de Animais - CEUA
Mat. SIAPE 1554975
e-mail: sheilla@cpqam.fiocruz.br
CPqAM/Fiocruz

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
Recife - PE - CEP: 50.670-420
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
www.cpqam.fiocruz.br