



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA – FAMED**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM  
GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA**

**Alterações hepáticas causadas pelo etanol e efeito do  
tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* GG em  
*zebrafish* (*Danio rerio*)**

**ANA CLÁUDIA REIS SCHNEIDER**

**Tese de Doutorado**

**Porto Alegre, Brasil**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA – FAMED**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM**  
**GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA**

**Alterações hepáticas causadas pelo etanol e efeito do  
tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* GG em  
*zebrafish* (*Danio rerio*)**

**ANA CLÁUDIA REIS SCHNEIDER**

**Orientadora: Profa. Dra. Themis Reverbél da Silveira**

A apresentação desta tese é requisito do Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

**Porto Alegre, Brasil**

**2015**

*"De te fabula narratur"*

**Horácio**

65 – 8 a.C

## CIP - Catalogação na Publicação

Reis Schneider, Ana Claudia

Alterações hepáticas causadas pelo etanol e efeito do tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* GG em zebrafish (*Danio rerio*) / Ana Claudia Reis Schneider. -- 2015.

141 f.

Orientadora: Themis Reverbel da Silveira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Esteatose hepática . 2. Etanol. 3. *Lactobacillus rhamnosus* GG. 4. Comportamento. 5. *Danio rerio*. I. Reverbel da Silveira, Themis, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha família:

Aos meus pais, Alfredo e Elza, de quem guardo uma lembrança feliz;

Aos meus irmãos, que são verdadeiros amigos e parceiros de vida;

Ao meu marido, Carlos Sérgio Schneider, que me apoiou desde o princípio;

Aos nossos amados filhos, Cynara, Carlos Guilherme e Daniel, que tornam a jornada da vida mais leve, doce e divertida!

À Rebeca, raio de sol que invadiu nossas vidas!

Obrigada a Deus, pela oportunidade de viver o que vivi, conhecer as pessoas que conheci e ampliar meus limites. Sem Ti eu não chegaria até aqui!

*"Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em coração humano o que Deus tem preparado para aqueles que o amam."*

I Coríntios 2:9.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Themis pela oportunidade que me deu ao me aceitar como sua orientanda no mestrado e doutorado. Vou guardar comigo seu exemplo de determinação incansável, profissionalismo e disposição de enfrentar as dificuldades que surgem pela caminhada. Ela tem o dom peculiar de incentivar os seus alunos a pensar, investigar, descobrir e revelar-lhes as suas capacidades. Sou particularmente grata pelo muito que me ensinou e pelo carinho que me dispensou durante todos esses anos de convivência.

Aos colegas de laboratório, Dr. Jorge Santos, Dra. Carolina Uribe, Thaís Hammes, Maria Inês Wilasco, Larisse Longo, Giovanna Weber, Leila Fratta, Laura Alencastro, Rafael Maurer, Cleandra Gregório e Raquel Ayres. Juntos compartilhamos muitas alegrias, algumas frustrações, e acima de tudo, muitos bons momentos de companheirismo. Foi ótimo estar com vocês!

Às sempre presentes e competentes alunas de iniciação científica, Ranieli Guizzo, Laísa Beduschi e Thayssa Escobar. Vocês foram imprescindíveis!

Ao Dr. Fábio Meurer, professor da Universidade Federal do Paraná, especialista em nutrição de organismos aquáticos, que produziu e gentilmente nos cedeu a ração utilizada neste estudo.

Ao Dr. Afonso Barth, Alice Beatriz Machado, Djuli Hermes e Fernanda de-Paris, pelo precioso auxílio na área de Microbiologia.

À Dra. Luise Meurer e ao Dr. Pedro Schaeffer por me ajudarem a desvendar alguns segredos da Histologia.

À Dra. Tais Malysz e à Dra. Maria Cristina Faccione-Heuser, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, pela enorme colaboração com as análises ultraestruturais.

À Dra. Ursula Matte, por sua atenção!

Aos funcionários do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela ajuda e disponibilidade em todos os momentos, especialmente Everaldo de Almeida (Secretaria do Centro de Pesquisa Experimental), Marta Regina Dotto (GPPG), Vânia Hirakata e Luciano Guimarães (Estatística – GPPG), Flavia Rejane Giuste e Jorge Alberto Lopes (Serviço de Patologia), Patrícia Koehler dos Santos e Jeferson Beck da Silva (UAMP).

Aos sempre prestativos funcionários da Unidade de Experimentação Animal, Marta Cioato, Fabíola Meyer, Eduardo da Silveira, Juliana Mautone e Rosalina Braga, agradeço a todos por sua inestimável ajuda.

Ao pessoal do departamento de Bioquímica da UFRGS, pela amizade, discussões científicas e por toda contribuição no aprimoramento desta tese, especialmente os professores Dr. Diogo Losch de Oliveira e Dr. Denis Broock Rosenberg, Dr. Eduardo Pacheco Rico e Dr. Adriano de Assis Martimbianco.

Às Professoras Ana Helena Paz, Carolina Uribe e Valesca D'Alba, pela participação na Banca do Exame Geral de Qualificação, e por suas importantes contribuições para o aprimoramento do presente trabalho.

À Dra. Carolina Uribe por toda força, estímulo e enorme auxílio prestado.

Aos excelentes professores e por todo apoio recebido do Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia. Sou muito grata a todos vocês!

Ao CNPq e FINE pelo suporte financeiro, sem o qual a realização deste estudo não seria possível.

A todos que contribuíram de tantas formas para que este estudo acontecesse...  
meu muito obrigada!



## SUMÁRIO

1-	RESUMO .....	1
2-	ABSTRACT .....	3
3-	LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	5
4-	LISTA DE FIGURAS .....	7
5-	LISTA DE TABELAS .....	8
6-	INTRODUÇÃO .....	9
7-	REVISÃO DA LITERATURA.....	12
7.1	Esteatose Hepática Alcoólica .....	12
7.1.1	Considerações sobre o Tratamento para a Doença Hepática Alcoólica .....	16
7.1.2	Efeitos do Etanol no Eixo Entero-Hepático .....	18
7.1.3	Efeitos do Etanol no Eixo Enterocerebral .....	19
7.2	Probióticos: <i>Lactobacillus Rhamnosus</i> GG.....	21
7.3	Zebrafish como Modelo Experimental.....	25
7.3.1	Aspectos do Aparelho Digestório do Zebrafish .....	27
8-	JUSTIFICATIVA.....	31
9-	QUESTÕES DE PESQUISA .....	32
10-	HIPÓTESES .....	33
11-	OBJETIVOS .....	34
11.1	OBJETIVO GERAL .....	34
11.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
12-	CAPITULO I - ARTIGO I.....	35
13-	CAPITULO II - ARTIGO II .....	57
14-	CAPITULO III - ARTIGO III .....	78
15-	CONCLUSÕES .....	95
16 -	CONSIDERAÇÕES GERAIS/PERSPECTIVAS.....	98
17-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
18-	ANEXO I.....	130
19-	ANEXO II.....	131

## 1- RESUMO

Introdução: Em relação ao fígado, a esteatose é a consequência mais comum do consumo abusivo do etanol e predispõe à doença hepática mais grave. Os mecanismos da doença hepática alcoólica não são plenamente conhecidos e as terapias são escassas. Os objetivos desta tese foram: 1) averiguar os efeitos do etanol no fígado, utilizando o zebrafish como modelo experimental; 2) avaliar o tratamento com o *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) na esteatose hepática; 3) observar os efeitos do etanol e do tratamento com o LGG no comportamento do *zebrafish*.

Métodos: Foram realizados três experimentos utilizando peixes *zebrafish*, adultos, *wild-type*. O primeiro experimento foi formado por dois grupos, Controle (C) e Etanol (E), com 52 animais em cada um. O grupo E foi exposto a 0,5% de etanol por quatro semanas. Foram conduzidas análises histológicas e moleculares dos genes *il-1b*, *tnf- $\alpha$* , *il-10*, *sirt1*, *adiponectina* e *adipor2* nos fígados dos animais. No 2º experimento foram avaliados quatro grupos: Controle (C), Probiótico (P), Etanol (E) e Probiótico + Etanol (P + E), com 220 animais respectivamente. Durante quatro semanas os grupos P + E e P foram alimentados com ração com o probiótico LGG e os grupos E e C com ração sem probiótico. Foram realizadas análises histológicas e morfométricas no tecido hepático, quantificações de lipídeos séricos e hepáticos. No 3º experimento, os grupos C, E, P e P+E foram formados (n=15 animais por grupo) e, após duas semanas, o comportamento dos animais foi analisado no teste *open-tank* com o programa ANY-maze®.

Resultados: No 1º experimento os animais do grupo E apresentaram intensa esteatose hepática, aumento de glicogênio plasmático associado às gotículas lipídicas, alterações no retículo endoplasmático rugoso e degeneração de canalículos biliares. Houve acentuação na expressão hepática de *il-1b*, *tnf- $\alpha$* , *sirt1* e *do adipor2*, indicando que o etanol desencadeou resposta inflamatória e de proteção hepática. No 2º experimento, o grupo E apresentou intensa esteatose após quatro semanas, ao contrário do grupo P + E. A morfometria celular mostrou um aumento de 14,8 vezes no tamanho dos hepatócitos do grupo E (4º semana) quando comparado com C (p <0,0001). Os triglicerídeos séricos diminuíram no grupo P + E em comparação com C, P (p <0,001) e E (p = 0,004). O colesterol sérico do grupo P diminuiu comparado aos grupos C e E na segunda semana

( $p = 0,002$  e  $p = 0,007$ ) e do grupo P + E diminuiu comparado aos grupos E e C ( $p < 0,0001$ ), na quarta semana. As concentrações de triglicérides hepáticos reduziram no grupo P + E na quarta semana em comparação com E ( $p = 0,006$ ). No 3º experimento, os animais expostos ao etanol apresentaram menor ansiedade em relação ao novo ambiente, evidenciada pela maior exploração da área superior do aquário. O efeito desinibidor do etanol não foi significativamente atenuado pelo tratamento com o LGG.

Conclusões: Os resultados do primeiro estudo indicaram que o etanol desencadeia uma série de eventos celulares e moleculares e que a inflamação desempenha papel significativo na esteatose hepática. No segundo, foi demonstrado que o tratamento com LGG diminuiu os níveis séricos de triglicérides e de colesterol, atenuando a esteatose hepática. O terceiro estudo mostrou que o etanol teve efeito significativo no comportamento do *zebrafish*, que não foi modificado pelo LGG.

**Palavras-chave: Doença hepática alcoólica, Esteatose hepática, Inflamação, *Lactobacillus rhamnosus* GG, Comportamento, Etanol, Zebrafish.**

## 2- ABSTRACT

Introduction: Regarding to the liver, hepatic steatosis is the most common consequence of abusive alcohol consumption and predisposes to more severe liver disease. The mechanisms of alcoholic liver disease are not fully known and therapies are scarce.

The objectives of this thesis were: 1) to verify the effects of ethanol in the liver using the zebrafish as an experimental model; 2) to evaluate a treatment with the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) in hepatic steatosis; 3) to observe the effects of ethanol and treatment with LGG in zebrafish behavior.

Methods: Three experiments were performed using zebrafish, adult, wild-type. For the 1<sup>st</sup> trial, two groups were formed: Control (C) and Ethanol (E), with 52 animals in each group. E group was exposed to 0.5% ethanol during four weeks. Histological and molecular analysis of genes *il-1b*, *tnf- $\alpha$* , *il-10*, *sirt1*, *adiponectin*, and *adipor2* were conducted in zebrafish livers. For the 2<sup>nd</sup> trial, four groups were evaluated: Control (C), Probiotic (P), Ethanol (E) and Probiotic + Ethanol (P + E). During four weeks, the P + E and P groups were fed with food supplemented with LGG and E and C groups received food without probiotic. Histological and morphometric analysis in liver tissue, measurements of serum and hepatic lipids were performed. In the 3<sup>rd</sup> trial, C, E, P and P + E groups were formed and after two weeks, the animals' behavior was analyzed in open-tank test with ANY-maze® program.

Results: In the 1<sup>st</sup> trial, animals in E group developed severe liver steatosis and cell abnormalities were observed: increase of glycogen associated to lipid droplets, alterations in the rough endoplasmic reticulum, degeneration of biliary canaliculi with presence of myelin figures inside. Increased hepatic expression of *il-1b*, *tnf- $\alpha$* , *sirt1* and *adipor2* possibly indicates that ethanol triggered both inflammatory and hepatic protection responses. In the 2<sup>nd</sup> trial, E group presented severe steatosis after four weeks, in contrast to the E + P group. Cell morphometry showed a 14.8 fold in hepatocytes size of E (4<sup>th</sup> week) compared to C group ( $p < 0.0001$ ). Serum triglycerides decreased in the P + E group compared with C, P ( $p < 0.001$ ) and E groups ( $p = 0.004$ ). Serum cholesterol decreased in P group compared to C and E groups at second week ( $p = 0.002$

and  $p = 0.007$ ) and in E + P group decreased compared with E and C groups ( $p < 0.0001$ ) at fourth week. Liver triglycerides were reduced in the P + E group at the fourth week compared to E group ( $p = 0.006$ ). In the 3<sup>rd</sup> trial, there was an alteration in the behavior of animals exposed to ethanol compared to that non-exposed, an effect not significantly attenuated by treatment with LGG.

Conclusions: Results of the first study indicate that ethanol triggers a series of cellular and molecular events and inflammation plays a significant role in hepatic steatosis. Then, it was shown that treatment with LGG decreased serum levels of triglycerides and cholesterol, attenuating hepatic steatosis. The third study showed that the ethanol, but not LGG has a significant effect on zebrafish behavior

**Key-words: Alcoholic hepatic disease, Hepatic steatosis, Inflammation, *Lactobacillus rhamnosus* GG, Behavior, Ethanol, Zebrafish.**

### 3- LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADH	Álcool desidrogenase
ADIPOR1	Receptor 1 de adiponectina
ADIPOR2	Receptor 2 de adiponectina
ALDH	Aldeído desidrogenase
AMPK	<i>AMP-activated kinase</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de variância
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
C	Controle
CYP 2E1	Citocromo P 450 2E1
DALY	<i>Disability Adjusted Life Years</i>
DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern</i>
DHA	Doença Hepática Alcoólica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Etanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA	Ácido gama aminobutírico
IL-1b	Interleucina 1b
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
LPS	Lipopolissacarídeos
MALDI -TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight</i>
MEOS	Sistema microssomal de oxidação do etanol
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro.
NAD <sup>+</sup>	Dinucleotídeo de adenina nicotinamida oxidada
NADH	Dinucleotídeo de adenina nicotinamida reduzida
P	Probiótico
P+E	Probiótico + Etanol
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PPAR- $\alpha$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha</i>
PPAR- $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i>
PRR	<i>Pattern-Recognition Receptor</i>
RER	Reticulo Endoplasmático Rugoso
SIRT1	Sirtuína-1
SREBP1	<i>Sterol regulatory element binding protein-1</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor – alpha</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia

#### 4- LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Aspecto histológico das lesões hepáticas e fatores de risco causados pela exposição crônica ao etanol.....	10
<b>FIGURA 2</b>	Aspectos do <i>zebrafish</i> fêmea e macho.....	25
<b>FIGURA 3</b>	Aspectos anatômicos do <i>zebrafish</i> .....	28
<b>FIGURA 4</b>	Comparação da arquitetura hepática de mamíferos e teleósteos.....	29



## 5- LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Mecanismos de ação dos probióticos.....	22
<b>Tabela 2:</b> Estudos que envolvem o uso de probióticos na DHA.....	23
<b>Tabela 3:</b> Estudos sobre os efeitos da exposição ao etanol em <i>zebrafish</i> .....	27

## 6 - INTRODUÇÃO

O alcoolismo é uma das doenças mais devastadoras, tanto em seus aspectos psíquicos como físicos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 4,5% da carga global de doenças e lesões e 4% de todas as mortes no mundo são atribuíveis ao consumo excessivo de álcool (OMS, 2011). A doença hepática alcoólica é uma importante causa de doença hepática crônica (GAO & BATALLER, 2011). Dados globais mostraram que, no ano de 2010, a cirrose foi responsável por 493.300 mortes (47,9%) atribuíveis ao consumo de álcool, sendo 156.900 óbitos femininos e 336.400 masculinos (RHEM *et al.*, 2013). O câncer hepático, atribuível ao álcool, foi responsável por 80.600 mortes (14.800 óbitos femininos e 65.900 masculinos) (RHEM *et al.*, 2013). No Brasil, estima-se que 70 a 80 % das doenças hepáticas terminais são causadas por consumo excessivo de álcool e por hepatites virais, ambas as doenças passíveis de prevenção (da SILVA *et al.*, 2006). Estudo mais recente, onde foram avaliados o uso/dependência de álcool e a prevalência da cirrose de etiologia não viral no Brasil, revelou que 3% e 1% respectivamente, de DALY (*Disability Adjusted Life Years*) são atribuíveis ao consumo excessivo de álcool (PORTUGAL *et al.*, 2015). Considerando-se as dez primeiras causas de DALY para homens, o consumo abusivo de álcool ocupou a segunda, terceira e sexta posições nas idades de 15-29, 30-44 e 45-59 anos, respectivamente. A cirrose ocupou a oitava posição no grupo de 30-44 anos; a quinta, no de 45-59 e a oitava, no de 60-69 anos. A distribuição dos agravos por faixa etária sugere que intervenções direcionadas ao uso/dependência de álcool poderão ter efeitos na incidência de cirrose alcoólica no país (PORTUGAL *et al.*, 2015).

O álcool/etanol é altamente difusível através das membranas celulares, assim, a sua toxicidade afeta a maioria dos órgãos. O seu metabolismo ocorre principalmente no

fígado, tornando-o um dos principais alvos para a lesão induzida pelo etanol. A hepatotoxicidade está relacionada com a quantidade ingerida, a frequência e o tempo de consumo, e o sexo, sendo a mulher mais suscetível do que o homem (O'SHEA *et al.*, 2010). Na figura 1 estão demonstrados os fatores de risco e o espectro das lesões hepáticas causadas pela exposição crônica ao etanol, que abrange desde esteatose à esteato-hepatite, fibrose, cirrose e hepatocarcinoma.



**FIGURA 1-** Aspecto histológico das lesões hepáticas e fatores de risco causados pela exposição crônica ao etanol. HCC=hepatocarcinoma. Fonte: Adaptado de Gao & Bataller, 2011.

A doença hepática alcoólica (DHA) tem uma patogênese complexa. É bem aceito o conceito de que há um processo multifatorial, envolvendo fatores genéticos, nutricionais, ambientais, anormalidades do metabolismo energético, estresse oxidativo, mecanismos imunológicos e condições de comorbidade hepática (O'SHEA *et al.*, 2010; GAO & BATALLER, 2011; RUSYN & BATALLER, 2013).

Apesar dos avanços que vem sendo obtidos no conhecimento dos mecanismos da DHA, aspectos de sua patogênese e progressão ainda não estão completamente elucidados e pouco progresso tem sido feito no manejo de pacientes alcoolistas. A abstinência continua sendo a intervenção terapêutica mais importante no tratamento da DHA (O'SHEA *et al.*, 2010).

Estudos experimentais e clínicos têm apontado para a importância da microbiota intestinal no curso da DHA: camundongos com mutação do receptor tipo Toll-4 (UESUGI *et al.*, 2001) ou tratados com antibióticos (ADACHI *et al.*, 1995), são menos propensos ao desenvolvimento da DHA, evidenciando o papel das endotoxinas intestinais no desencadeamento da inflamação hepática; em pacientes com hepatite alcoólica, observou-se que os níveis de endotoxinas plasmáticas são marcadamente elevados (FUJIMOTO *et al.*, 2000). Yan e colaboradores mostraram que a indução intragástrica contínua de etanol, resulta em supercrescimento bacteriano e substituição da microbiota comensal por uma patogênica (YAN *et al.*, 2011). O aumento da translocação de endotoxinas para o fígado é propiciado pelo aumento da permeabilidade do epitélio intestinal, provocado principalmente pelo acetaldeído, um dos metabólitos do etanol (RAO, 2009). Os probióticos, devido à sua capacidade de aderir e fortalecer a barreira intestinal e de competir com patógenos, podem ser uma terapia viável para o controle dos danos provocados pelo etanol e seus metabólitos na microbiota e na parede intestinal, evitando ou aliviando o agravamento da DHA.

## 7- REVISÃO DA LITERATURA

### 7.1 ESTEATOSE HEPÁTICA ALCOÓLICA

O etanol ingerido é absorvido a partir do trato gastrointestinal e metabolizado prioritariamente no fígado, por meio de três sistemas enzimáticos: 1) a via da álcool desidrogenase (ADH); 2) o sistema microsomal hepático de oxidação do etanol ou MEOS (*microsomal ethanol oxidizing system*), que envolve o citocromo P450 2E1 (CYP2E1), principal componente do sistema; 3) a via da catalase, uma via menor, localizada nos peroxissomas dos hepatócitos (LIEBER, 2005; LIU, 2014). Múltiplos fatores associados com o metabolismo do etanol contribuem para o desenvolvimento e agravamento da DHA: diminuição da taxa redox de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ; a formação excessiva de acetaldeído, metabólito extremamente hepatotóxico; aumento do estresse oxidativo; distúrbios no funcionamento mitocondrial e estresse do retículo endoplasmático; e diminuição da oxidação dos lipídios. O aumento de gordura no fígado, causado pelo metabolismo do etanol, é considerado o gatilho inicial da DHA (GAO & BATALLER, 2011; CEDERBAUM, 2012).

Do ponto de vista anatomopatológico, costuma-se classificar a doença hepática alcoólica (DHA) em estágios: esteatose, esteato-hepatite, fibrose e cirrose (O'SHEA *et al.*, 2010). Esta divisão é esquemática, uma vez que, às vezes, as lesões histológicas coexistem no mesmo paciente. Na primeira etapa, o aspecto histológico é a esteatose, na sequência predominam a necrose e a inflamação. A doença cursa com fibrose progressiva e com a formação de nódulos regenerativos, que nas fases mais avançadas, subvertem a arquitetura hepática, caracterizando o quadro de cirrose, cujas principais consequências são a hipertensão portal e a disfunção hepática. A esteato-hepatite é

considerada a fase intermediária da DHA, porém se admite a possibilidade de evolução para cirrose sem passar pelo estágio de esteato-hepatite. Nestes casos, ainda na fase da esteatose, haveria formação de fibrose perivenular que poderia evoluir para fibrose septal e cirrose (GONÇALVES *et al.*, 2006).

A primeira entidade a ser considerada no processo de lesão alcoólica no fígado é a esteatose. Embora haja uma considerável variabilidade entre os indivíduos no que concerne à dose tóxica de etanol para o fígado, comumente a esteatose desenvolve-se em 90-95% dos homens que consomem doses de etanol entre 40-80 g/dia e mulheres que ingerem 20-40 g/dia, porém também pode ocorrer em indivíduos com um consumo menor (O'SHEA *et al.*; 2010; CECCARELLI *et al.*, 2014).

A esteatose hepática é usualmente assintomática e pode desaparecer após 4-6 semanas de abstinência, no entanto, em 5-15% dos indivíduos ocorre progressão para fibrose (O'SHEA *et al.*; 2010). Após o surgimento da esteatose, um conjunto de fatores contribuiria para a progressão da DHA: produção de citocinas, fatores genéticos, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, comorbidades, metabolismo energético, nutrição e mecanismos imunológicos (TSUKAMOTO *et al.*, 2009).

Nesta breve revisão abordaremos os aspectos principais da metabolização hepática do etanol e o papel de alguns genes envolvidos com a proteção e com processos inflamatórios hepáticos: a *adiponectina*, seus receptores (*ADIPOR1* e *ADIPOR2*), a *Sirtuína-1* (*SIRT1*), o *Fator de Necrose Tumoral* (*TNF- $\alpha$* ) e as *Interleucinas 10* e *1-b* (*IL-10* e *IL-1b*).

A esteatose caracteriza-se pelo acúmulo de gordura, principalmente triglicerídeos, em  $\geq 5\%$  dos hepatócitos (YEH & BRUNT, 2014). A exposição ao etanol ativa fatores de transcrição do metabolismo lipídico que estimulam a lipogênese e inibem a oxidação de ácidos graxos (GAO & BATALLER, 2011). Por uma via, ocorre a

ativação do fator de transcrição *SREBP1c* (*sterol regulatory element binding protein-1-c*), que induz genes envolvidos na síntese hepática de triglicerídeos (DONOHUE, 2007, LIU, 2014); por outra via, o etanol inibe reguladores de transcrição cruciais para a oxidação dos lipídios hepáticos, como a adiponectina, a *SIRT1*, *PPAR-α* (*peroxisome proliferator-activated receptor-alpha*) e *PPAR-γ* (*peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*), e a *AMPK* (*AMP-activated kinase*) (YOU & ROGERS, 2009).

A adiponectina é uma adipocina, primariamente expressa e secretada a partir do tecido adiposo, com propriedade de reduzir a deposição lipídica em diversos órgãos, possui ação anti-inflamatória e melhora a resistência insulínica (SHEN *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014). Além de favorecer a oxidação dos ácidos graxos, a adiponectina antagoniza o *TNF-α* (YOU & ROGERS, 2009). Embora seja sabido que o consumo crônico de etanol leva ao aumento das concentrações de *TNF-α*, ainda não está claro se o aumento do *TNF-α* provoca a redução de adiponectina ou se a supressão da produção de adiponectina pelo etanol conduz ao aumento dos níveis séricos e hepáticos do *TNF-α* (KASER *et al.*, 2005; YOU & ROGERS, 2009; RASINENI & CASEY, 2012). Os principais receptores da adiponectina são o *ADIPOR1* (receptor 1 da adiponectina), que se expressa de forma mais ampla nos tecidos, e o *ADIPOR2* (receptor 2 da adiponectina) que se expressa predominantemente no fígado (YOU & ROGERS, 2009).

Parece haver sinergismo entre o *ADIPOR2* e a *SIRT1*. A *SIRT1* está envolvida na regulação de adipocinas, como a adiponectina, e na regulação dos seus receptores. Foi observado que o aumento na expressão de *SIRT1* promove a elevação dos níveis de mRNA do *ADIPOR2* no fígado (BANKS *et al.*, 2008; FEIGE *et al.*, 2008). A *SIRT1*, assim como a adiponectina e o *ADIPOR2*, parece ter um efeito protetor frente à esteatose hepática, tanto alcoólica como não alcoólica (FEIGE *et al.*, 2008; PFLUGER

*et al.*, 2008; LI *et al.*, 2014). Os benefícios do aumento de expressão da *SIRT1* também incluem a melhora do estado inflamatório e melhor tolerância à glicose (LI *et al.*, 2014).

Além do distúrbio das rotas lipogênicas, a exposição crônica ao etanol afeta o sistema imunológico, ativando reações da imunidade inata e modulando a expressão de genes relacionados com a inflamação (GAO *et al.*, 2011; GAO, 2012). As reações imunológicas desencadeadas pelo consumo abusivo do etanol se devem a diversos fatores: efeitos tóxicos do etanol e de seus metabólitos no tecido hepático, principalmente o acetaldeído; formação de adutos de proteínas; aumento do estresse oxidativo; disbiose e aumento da permeabilidade intestinal; translocação de lipopolissacarídeos (LPS) intestinais pela circulação portal para o fígado (MANDREKAR & SZABO, 2009; BEIER, 2011).

O receptor tipo *Toll-4* (TLR-4) pode reconhecer especificamente os LPS e induzir a ativação de genes inflamatórios (GAO *et al.*, 2011), como o *TNF- $\alpha$* , a *IL-1b* e outras citocinas pró-inflamatórias (KAWARATANI *et al.*, 2013). No fígado, o aumento de expressão do *TNF- $\alpha$*  está relacionado em diversos processos fisiológicos: inflamação, proliferação celular e apoptose (KAWARATANI *et al.*, 2013). A ativação do *TNF- $\alpha$*  está associada com piora da DHA (KAWARATANI *et al.*, 2013).

A ativação da imunidade inata também está relacionada ao aumento da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (GAO, 2012). A elevação dos níveis de IL-10 e IL-6, durante a exposição ao etanol, parece ser uma estratégia de defesa do organismo para controlar a inflamação e reparar o fígado danificado (GAO, 2012).

A IL-1b é uma potente citocina pró-inflamatória. Dados recentes têm fornecido evidências para o papel da IL-1b na esteato-hepatite não alcoólica (MIURA *et al.*, 2010). Foi observado recentemente, em modelos animais e em seres humanos com DHA, que os níveis de IL-1b se apresentam aumentados de forma significativa no



figado e no soro (PETRASEK *et al.*, 2012; BERTOLA *et al.*, 2013). A IL-1b é ativada via PRRs (*Pattern-Recognition Receptors*) e sintetizada em resposta a estímulos de PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*) e DAMPS (*Danger-associated molecular patterns*) (KAWARATANI *et al.*, 2013). Petrasek e colaboradores mostraram que a ativação da sinalização de IL-1b é necessária para o desenvolvimento da esteatose, inflamação e lesão hepáticas induzidas pelo etanol. (PETRASEK *et al.*, 2012).

A inflamação é um dos principais fatores da progressão da DHA e um alvo atrativo para intervenção terapêutica. Novas terapias que visem inibir a esteatose e a inflamação serão benéficas para retardar ou evitar a progressão da doença (MATHEWS & GAO, 2013).

#### *7.1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O TRATAMENTO PARA A DOENÇA HEPÁTICA ALCOÓLICA*

A patogênese de DHA é um processo dinâmico, caracterizado por interações envolvendo aspectos genéticos, ambientais, nutricionais e imunológicos. Estudos realizados em seres humanos revelaram que a esteatose hepática ocorre em praticamente todos que consomem etanol em excesso, a esteato-hepatite em cerca de um terço dos casos, podendo evoluir para cirrose em cerca de 8-20% dos usuários crônicos (O'SHEA *et al.*, 2010; GAO & BATALLER, 2011). Fatores genéticos podem, talvez, explicar por que apenas uma minoria dos alcoolistas crônicos desenvolve DHA. Por outro lado, a identificação criteriosa dos indivíduos com alto risco poderá contribuir para a aplicação de estratégias terapêuticas preventivas, inovadoras e eficazes.

As opções farmacológicas para o tratamento da DHA são limitadas e dependem de adequada caracterização da fase da doença. Ainda não estão bem definidos os fatores

que promovem o desenvolvimento da esteatose, a evolução para hepatite alcoólica e a progressão para a cirrose (GAO & BATALLER, 2011).

Novos alvos terapêuticos estão sendo identificados para o tratamento da doença hepática alcoólica, entre eles, a microbiota intestinal (GAO & BATALLER, 2011). Assim, recentemente, alguns autores vêm preconizando o uso de antibióticos, prebióticos, probióticos e simbióticos na DHA (DHIMAN *et al.*, 2014, MALAGUARNERA *et al.*, 2014). O racional da utilização destas substâncias é a constatação dos elevados níveis plasmáticos de endotoxinas nos indivíduos com ingestão acentuada de álcool. Sabe-se que nos alcoolistas crônicos ocorrem mudanças quantitativas e qualitativas na composição da microbiota intestinal, a endotoxemia é comum e ocorre devido a diversos fatores: crescimento aumentado de bactérias intestinais, aumento da permeabilidade intestinal e uma reduzida depuração das endotoxinas pelas células de Kupffer (HARTMANN *et al.*, 2015; SZABO, 2015). O conhecimento recente de que a microbiota ocupa um papel central na patogênese da DHA, estimulou a busca de estratégias terapêuticas focadas no microbioma intestinal. A finalidade é impedir a endotoxemia, através da inibição do crescimento excessivo das bactérias intestinais patogênicas, prevenindo a translocação para outros órgãos.

Em resumo, a grande variação individual na susceptibilidade e na evolução da DHA dificulta o tratamento eficaz da doença. Atualmente os principais focos da terapia são a inibição da inflamação e da fibrogênese. Embora a situação clínica dos pacientes deva orientar o tratamento, deve-se enfatizar que a abstinência do álcool e a nutrição adequada continuam a ser pilares importantes no manejo dos pacientes. A abstinência não reverte a DHA avançada, mas melhora aspectos histológicos e, de acordo com Diehl, aumenta a sobrevida dos pacientes (DIEHL, 2002).

### 7.1.2 EFEITOS DO ETANOL NO EIXO ENTERO-HEPÁTICO

Loguercio e colaboradores (LOGUERCIO *et al.*, 2002) cunharam o termo "eixo entero-hepático", ao sugerir que a microbiota intestinal pode afetar a homeostase do fígado. Como o fígado recebe continuamente sangue a partir do intestino, através do sistema portal, há um relacionamento próximo e constante entre ambos. Em condições normais, a integridade da barreira epitelial intestinal, a composição equilibrada de sua microbiota, a vigilância constante do sistema imunológico, minimizam a ação dos produtos bacterianos que chegam ao fígado através do sistema portal (HARTMANN *et al.*, 2015). No fígado, os hepatócitos e as células de Kupffer eliminam os produtos bacterianos, mantendo assim o estado imunotolerante e a ausência de inflamação ativa (HENAO-MEJIA *et al.*, 2013; SZABO, 2015). A microbiota intestinal normal pode ser definida como todas as espécies do ecossistema envolvidas numa relação simbiótica com o hospedeiro (IANNITTI & PALMIERI, 2010). O termo disbiose refere-se ao desequilíbrio destas comunidades microbianas e tem sido relacionado com diversas enfermidades, embora não esteja claro se o desequilíbrio da microbiota seja a causa ou consequência das doenças (IANNITTI & PALMIERI, 2010).

O consumo crônico de bebidas alcoólicas pode acarretar o aumento da permeabilidade intestinal, a disbiose, a translocação de endotoxinas para o fígado e sangue, ativar a produção de citocinas e de espécies reativas de oxigênio, e iniciar a cascata inflamatória (SZABO & BALA, 2010). Adachi e colaboradores mostraram, em estudo experimental com ratos, que o uso de antibióticos atenuou a endotoxemia e a lesão hepática após um longo período de exposição ao etanol, evidenciando o papel relevante da endotoxemia na DHA (ADACHI *et al.*, 1995).

Henao-Mejia e colaboradores recentemente relataram que a composição da microbiota intestinal está associada com a exacerbação do processo inflamatório e com a esteatose hepática (HENAO-MEJIA *et al.*, 2013). O TLR-4 tem a função de reconhecer componentes bacterianos que chegam ao fígado e enviar sinais para outras células que participam da reação inflamatória. Isto leva a um aumento da expressão do *TNF- $\alpha$*  e à progressão do dano hepático (HENAO-MEJIA *et al.*, 2013). É interessante notar que a ativação dos componentes da imunidade inata, além de iniciar a lesão hepática, pode também desencadear mecanismos de hepatoproteção, de regeneração e de respostas anti-inflamatórias, que desempenham um papel compensatório contra a lesão hepática e a inflamação (GAO, 2012).

### 7.1.3 EFEITOS DO ETANOL NO EIXO ENTEROCEREBRAL

O eixo enterocerebral é a comunicação bidirecional entre o intestino e o cérebro, e ocorre através de múltiplas vias: hormonais, neurais e mediadores imunitários (CRYAN & DINAN, 2012). Os sinais ao longo deste eixo podem ter origem no intestino, no cérebro ou em ambos e a perturbação deste sistema, além de afetar os processos digestivos, resulta em alterações na resposta ao estresse e no comportamento (CRYAN & O' MAHONY, 2011; DE PALMA *et al.*, 2014). O cérebro pode influenciar os micro-organismos comensais (microbiota entérica) indiretamente - via alterações na motilidade, nas secreções e na permeabilidade intestinal, ou diretamente - via a sinalização de moléculas liberadas no lúmen intestinal por células da lâmina própria (RHEE *et al.*, 2009). O interesse no papel da microbiota no eixo enterocerebral é relativamente novo. Observou-se que é essencial na determinação das funções normais do intestino, na imunidade e, mais recentemente, investiga-se o seu papel como

modulador do comportamento do hospedeiro (RHEE *et al* 2009; BERCIK *et al.*, 2011; COLLINS *et al.*, 2012; LYTE, 2013; MATSUMOTO *et al.*, 2013), levando à criação do termo "eixo microbiota-intestino-cérebro". Discute-se atualmente a associação da disbiose intestinal com distúrbios intestinais funcionais e sua relação com o estresse psicológico.

Sabe-se que o etanol exerce variados efeitos em diversos órgãos do corpo, especialmente no trato gastrointestinal e no sistema nervoso central (SPANAGEL, 2008). As perturbações neuroquímicas causadas pela presença do etanol em sítios cerebrais específicos geram efeitos indiretos em uma variedade de neurotransmissores / neuropeptídeos, determinando alterações comportamentais típicas do abuso de consumo alcoólico: desinibição, sedação, e até, hipnose, conforme as concentrações crescentes de etanol (SPANAGEL, 2008).

Diversas bactérias comensais têm a capacidade de gerar neurotransmissores e neuromoduladores: *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. produzem GABA (ácido gama aminobutírico), *Escherichia* spp., *Bacillus* spp. e *Saccharomyces* spp., noradrenalina, *Candida* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia* spp. e *Enterococcus* spp., serotonina, *Bacillus* spp., dopamina e *Lactobacillus* spp., acetilcolina (CRYAN & DINAN, 2012). Há evidências de que a disbiose modula o sistema nervoso periférico e central, levando a alterações comportamentais (COLLINS & BERCIK, 2013). A redução da quantidade de micro-organismos secretores de substâncias neurotransmissoras e a ativação de um estado inflamatório, causados por um desequilíbrio da microbiota intestinal, devem ser consideradas como efeitos deletérios do consumo crônico de etanol no cérebro.

## **7.2 PROBIÓTICOS: *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG***

A microbiota desempenha funções vitais essenciais para a manutenção da saúde, incluindo o processamento de alimentos, digestão de polissacarídeos não digeríveis complexos e síntese de vitaminas (QUIGLEY, 2013). Além disso, produz uma série de compostos bioativos que inibem agentes patogênicos, metabolizam compostos tóxicos e modulam o metabolismo do hospedeiro. Distúrbios da microbiota residente têm sido implicados em uma lista cada vez maior de enfermidades (QUIGLEY *et al.*, 2012).

A importância da manutenção de uma microbiota intestinal saudável tem sido reconhecida de maneira empírica há bastante tempo, porém recentemente tem se dado uma atenção específica ao potencial dos probióticos como agentes preventivos e terapêuticos. O termo probiótico refere-se a micro-organismos vivos (bactérias ou leveduras), não patógenos, que administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2002). De acordo com a legislação brasileira, os probióticos são definidos como suplementos alimentares microbianos vivos que afetam benéficamente o organismo pela melhora do seu balanço microbiano (ANVISA – resolução RDC nº 323, 10/11/2003). Na tabela 1 estão apresentados os benefícios que os probióticos conferem ao hospedeiro.

As comunidades residentes que compõem a microbiota são conhecidas como autóctones, porém, também existem comunidades transitórias, que se estabelecem apenas durante um determinado período. Entre estes micro-organismos transitórios, estão os probióticos, a maioria dos quais não coloniza permanentemente o trato digestivo (GUARNER & MALAGELADA, 2003; NAVA & STAPPENBECK, 2011).

**Tabela 1:** Mecanismos de Ação dos Probióticos

---

**Atividade Antimicrobiana**

↓ ph luminal

Secreção de peptídeos antimicrobianos

Inibição de invasão bacteriana

Bloqueio da adesão de bactérias às células epiteliais

**Proteção da Barreira Intestinal**

Aumento da produção de muco

Contribuição para a integridade da barreira

**Imunomodulação**

Efeitos nas células epiteliais

Efeitos nas células dendríticas

Efeitos nos monócitos/macrófagos

Efeitos nos linfócitos

---

Fonte: NG *et al.*, 2009.

As propriedades das bactérias probióticas estão relacionadas não somente com o gênero da bactéria, mas também com sua cepa. Uma cepa específica produz benefícios específicos, assim o efeito de uma cepa bacteriana não pode ser extrapolado para outras do mesmo gênero (GUARNER & MALAGELADA, 2003). As cepas probióticas são catalogadas pelo gênero, espécie e recebem uma identificação alfanumérica, por exemplo, *Lactobacillus casei* DN-114 001 ou *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103). Um bom probiótico deve possuir as seguintes características: 1) aderir ao tecido epitelial do trato intestinal; 2) excluir ou diminuir a aderência de patógenos; 3) permanecer, multiplicar-se, produzir ácidos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas antagonistas ao crescimento de patógenos; 4) ser seguro, não invasivo, não carcinogênico e não patogênico; 5) ser capaz de viabilizar a formação de uma microbiota intestinal saudável no hospedeiro (IANNITTI & PALMIERI, 2010; SEGERS & LEBEER, 2014).

Os probióticos estão disponíveis como suplementos alimentares, na forma de pó, cápsulas e tabletes, ou em alimentos, como iogurtes, queijos, leites fermentados e não

fermentados, em sumos e bebidas de soja, ou ainda em produtos terapêuticos, onde são adicionados liofilizados (BOSSCHER *et al.*, 2009). A concentração viável de probiótico no produto deve ser de aproximadamente  $10^7$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL (POCHART *et al.*, 1989).

A manipulação da microbiota, seja por uso de antibióticos, prebióticos ou probióticos, tem mostrado resultados promissores na regressão da DHA. A tabela 2 apresenta estudos que avaliaram os efeitos de diferentes probióticos na doença hepática alcoólica em seres humanos, em animais e *in vitro*. Os resultados sugerem que a administração oral de probióticos pode impedir a progressão da esteatose e melhorar os níveis séricos da aspartato transaminase (AST) e da alanina transaminase (ALT), evitar o agravamento da permeabilidade intestinal provocada pelo etanol, melhorar a endotoxemia, impedir o supercrescimento de bactérias patogênicas no intestino e a translocação intestinal para o fígado.

**Tabela 2:** Estudos que envolvem o uso de probióticos na DHA

Probiótico	Modelo Experimental	Resultado	Autores
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. helveticus</i> <i>B. bifidum</i>	Murino	Proteção contra endotoxemia e translocação bacteriana.	Marotta <i>et al.</i> , 2008
<i>L. brevis</i>	Murino	Melhora da AST, ALT e da esteatose hepática.	Segawa <i>et al.</i> , 2008
<i>B. bifidum</i> e <i>L. plantarum</i>	Seres humanos (n=90)	Melhora dos testes laboratoriais hepáticos.	Kirpich, <i>et al.</i> , 2008
<i>L. rhamnosus</i>	Murino	Diminuição da hiperpermeabilidade intestinal e do estresse oxidativo.	Forsyth <i>et al.</i> , 2009
<i>L. casei</i> MYL01	<i>In vitro</i>	Supressão de citocinas pró-inflamatórias e indução de Il-10.	Chiu <i>et al.</i> , 2013



VSL#3	Murino	Suspensão da translocação bacteriana e diminuição na expressão de TNF- $\alpha$ .	Chang <i>et al.</i> , 2013
<i>L. rhamnosus</i> GG	Murino	Abrandamento da endotoxemia, da esteatose hepática e da expressão de proteínas relacionadas ao aumento da permeabilidade intestinal.	Bull-Otterson <i>et al.</i> , 2013
<i>Escherichia Coli</i> Nissle 1917	Murino	Redução do estresse oxidativo e da hiperlipidemia.	Singh <i>et al.</i> , 2014
<i>B. bifidum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>S. thermophilus</i>	Seres humanos (n=53)	Redução do supercrescimento bacteriano, sem melhora da permeabilidade intestinal.	Kwak <i>et al.</i> , 2014

O *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), ATCC 53103, foi originalmente isolado a partir de amostras fecais humanas por Sherwood Gorbach e Barry Goldwin, por isso as letras GG em seu nome. Bactéria Gram-positiva e anaeróbia, o *Lactobacillus rhamnosus* GG foi identificado como uma potencial estirpe probiótica, inicialmente devido à sua excelente resistência ao ácido biliar e boa capacidade de adesão à camada epitelial intestinal (KANKAINEN *et al.*, 2009). A aderência à parede intestinal é um aspecto crucial para ação do probiótico, e pode ser estudada por diferentes métodos, tais como cultura obtida de biópsia, análises moleculares e microscopia ultraestrutural (KANKAINEN *et al.*, 2009). O *Lactobacillus rhamnosus* GG adere ao muco e às células epiteliais intestinais cerca de 10 vezes mais eficientemente do que outros probióticos (KANKAINEN *et al.*, 2009).

O genoma do LGG já foi totalmente mapeado (MORITA *et al.*, 2009) e seus efeitos têm sido extensivamente estudados em ensaios clínicos e experimentais (VANDENPLAS *et al.*, 2014). Diversas ações terapêuticas do probiótico LGG estão bem documentadas, incluindo o tratamento de infecções gastrointestinais, atuação como

imunomodulador (SINDHU *et al.*, 2014, LIEVIN-LE MOAL & SERVIN, 2014), prevenção de alergias e modulação do perfil lipídico (KEKKONEN *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2013).

### 7.3 ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL

O *Danio rerio* (Hamilton, 1822) conhecido popularmente como *zebrafish* ou peixe zebra ou ainda, no Brasil, como paulistinha, pertence à família *Cyprinidae* e é um pequeno peixe teleósteo (3 - 4 cm) de água-doce, originário da Índia (Figura 2). O seu genoma foi totalmente mapeado (CHEN & EKKER, 2004) e tornou-se um modelo de experimentação para o estudo de mecanismos genéticos e biológicos de numerosas doenças humanas (BRIGGS, 2002).



**Figura 2:** Aspectos do *zebrafish* fêmea e macho: a fêmea e o macho adultos podem ser distinguidos pelo formato do corpo. O macho possui forma mais delgada, *torpedo shape* (direita) e a fêmea possui forma mais arredondada, com abdômen claro e protuberante (esquerda). Foto: zfin.org.

O manejo, a facilidade de reprodução e de manutenção e os métodos laboratoriais para cultura do *zebrafish* já foram bem estabelecidos por Westerfield (WESTERFIELD, 2007). Em geral, os peixes utilizados em pesquisa laboratorial são de pequeno porte, de forma que se pode montar um laboratório em espaços reduzidos. Sua manutenção é de baixo custo quando comparada com a exigida por animais experimentais mais tradicionais, como roedores, por exemplo. Além disso, o *zebrafish* é

um modelo promissor por apresentar características moleculares, bioquímicas, celulares e fisiológicas muito semelhantes aos mamíferos (LIESCHKE & CURRIE, 2007). Apresenta elevada taxa de fecundidade, transparência de embriões e larvas, rápido desenvolvimento, tornando-se ideal para investigação da organogênese e de aspectos do desenvolvimento embrionário.

Estudos toxicológicos (HAMMES *et al.*, 2012, DRIESSEN *et al.*, 2015), investigação de mecanismos de carcinogênese química (REKHA *et al.*, 2008) e *screening* de novas drogas (GIBERTI *et al.*, 2013, MUSSULINI *et al.*, 2013) comprovam a versatilidade do *zebrafish*. Algumas características, como o seu pequeno tamanho, a sensibilidade às drogas e o rápido metabolismo trazem uma significativa economia e vantagens experimentais que o qualificam como modelo para observação de efeitos diretos de agentes químicos e fármacos.

Como pode ser observado na tabela 3, este peixe apresenta diversas reações ao etanol, tanto em exposição aguda como crônica, de modo semelhante aos mamíferos. Os resultados mostraram a relevância do *zebrafish* como um modelo promissor para desvendar os mecanismos da doença alcoólica e possíveis alvos para o tratamento do alcoolismo. Outros modelos (murinos) de alcoolismo crônico, demonstraram a eficácia do probiótico LGG na redução da inflamação hepática (WANG *et al.*, 2013), melhora da disbiose e da permeabilidade intestinais (WANG *et al.*, 2011; BULL-OTTERSON *et al.*, 2013; BAJAJ *et al.*, 2014), atenuação da endotoxemia (WANG *et al.*, 2012), e fortalecimento da barreira intestinal (FORSYTH *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2012). A utilização do *zebrafish* para investigação da ação do probiótico LGG em modelo de exposição alcoólica, até o momento, não tem relatos encontrados na literatura.

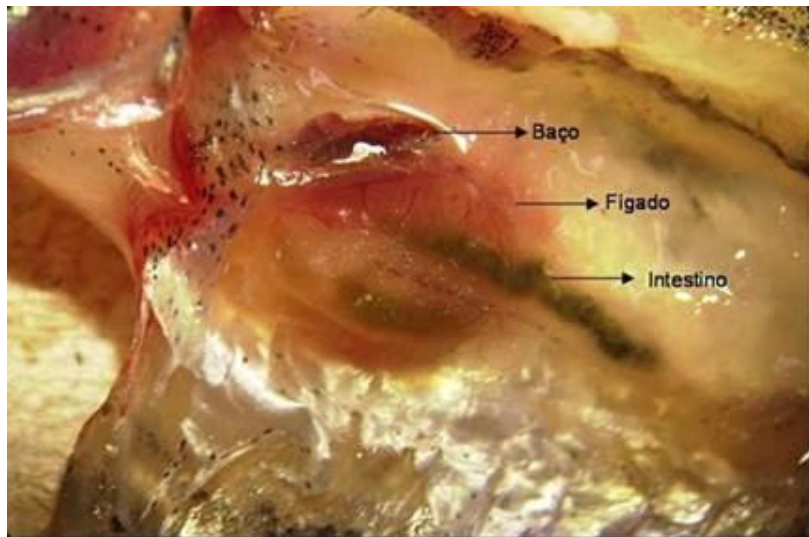
**Tabela 3:** Estudos sobre os efeitos da exposição ao etanol em *Zebrafish*

Tipo de estudo	Características do animal	Achados	Autor /Ano
Farmacológico	Adultos	A taurina diminuiu os níveis de etanol no cérebro	Rosemberg <i>et al.</i> , 2012
Comportamental	Adultos	O etanol diminuiu a percepção de risco	Oliveira <i>et al.</i> , 2013
Toxicológico	Adultos	Toxicidade do etanol no sistema glutamatérgico	Zenki <i>et al.</i> , 2014
Síndrome alcoólica fetal	Embriões	Problemas nas funções cognitivas em animais adultos	Fernandes <i>et al.</i> , 2014
Neuroquímico	Adultos	Alterações nos níveis de neurotransmissores	Chatterjee <i>et al.</i> , 2014
Hepático	Larvas	Esteatose hepática e sobre-expressão de Atf6 associada à lipogênese	Howarth <i>et al.</i> , 2014
Desenvolvimento	Embriões	Retardo do Crescimento	Lantz-McPeak <i>et al.</i> , 2014
Morfológico	Embriões	Deformidades e alterações na morfologia neuronal	Shan <i>et al.</i> , 2015

### 7.3.1 ASPECTOS DO APARELHO DIGESTÓRIO DO ZEBRAFISH

O trato digestivo do zebrafish adulto é composto de boca, faringe, esôfago, intestino e ânus, não apresentando estômago. O esôfago se diferencia em intestino, que consiste em um tubo longo inicialmente largo e progressivamente mais estreito no sentido rostral-caudal. O intestino preenche a cavidade abdominal e possui três divisões funcionais: anterior, média e posterior. A porção anterior, também conhecida como bulbo intestinal, é maior e é o principal local de digestão de proteínas e lipídeos. O bulbo, a porção média e o terço anterior caudal do intestino do *zebrafish* correspondem ao intestino delgado dos mamíferos, e a porção posterior corresponde ao intestino grosso, terminando no ânus (WANG *et al.*, 2010). Em comparação com o intestino dos mamíferos, o intestino do *zebrafish* tem uma arquitetura simples, porém a região das vilosidades e criptas intestinais é homóloga em estrutura e função (DI GIULIO & HINTON, 2008). O segmento intestinal posterior possui uma quantidade maior de

bactérias do que o seguimento anterior, como nos mamíferos (RAWLS *et al.*, 2004). A figura 3 mostra o fígado, baço e intestino do *zebrafish*.



2009.

O fígado do *zebrafish* é responsável pelas mesmas funções metabólicas do fígado dos mamíferos, incluindo o processamento e armazenamento de nutrientes, síntese de enzimas e cofatores, excreção de metabólitos e de compostos xenobióticos (WOLF & WOLFE, 2005). Do ponto de vista anatômico o fígado do *zebrafish* adulto possui dois lobos posicionados no eixo dorso-ventral, levemente lateral ao intestino e a outros órgãos do sistema gastrointestinal (SADLER *et al.*, 2007). Os hepatócitos estão arranjados como cordões que apresentam um padrão de organização mais ou menos cilíndrico, onde se encontram pequenos ductos biliares. Estes ductos intra-hepáticos são derivados de canaliculos biliares e formam uma rede de canais onde a bile é coletada e transportada para a vesícula biliar e intestinos através de ductos maiores do sistema biliar extra-hepático (LORENT *et al.*, 2004; TAO & PENG, 2009). Este sistema de coleta e transporte da bile se dá de maneira semelhante em mamíferos (LORENT *et al.*, 2004; TAO & PENG, 2009).

A diferença mais significativa entre o fígado dos mamíferos e dos peixes teleósteos é a inexistência do clássico lóbulo hepático, com os respectivos espaços-porta. O peixe possui veia porta, artérias hepáticas e ductos biliares distribuídos aleatoriamente no parênquima hepático (TAO & PENG, 2009). No *zebrafish* não foram ainda identificadas células de Kupffer. Na figura 4 é apresentado um esquema das diferenças morfológicas entre o fígado de mamíferos e dos teleósteos.

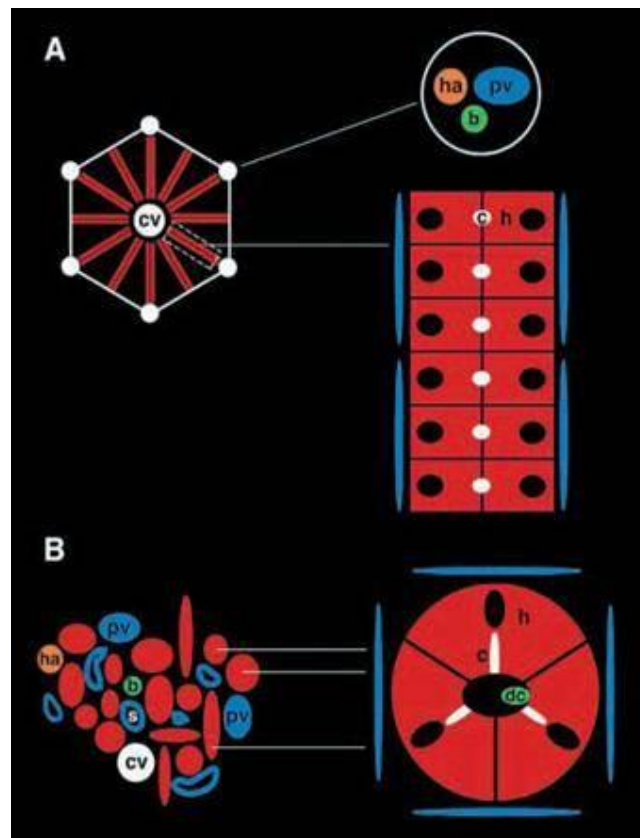


Figura 4: Comparação da arquitetura hepática de mamíferos e teleósteos. **(A) Representação esquemática do lóbulo hepático dos mamíferos:** o espaço porta (círculos brancos); placas com duas camadas de hepatócitos dispostos ao redor dos lóbulos hepáticos (h). Cada espaço porta contém um ramo da artéria hepática (ha), um ramo da veia porta (pv) e 1 a 2 ductos biliares interlobulares (b). Os canalículos apicais estão localizados adjacentes aos hepatócitos (c). As placas possuem capilares, chamados de sinusóides (em azul), que se caracterizam pelas suas dilatações irregulares. As células endoteliais desses capilares estão separadas dos hepatócitos apenas por uma lâmina basal. O sangue passa pelos capilares, e os seus metabólitos atravessam rapidamente as células endoteliais, chegando aos hepatócitos. Esta rápida troca metabólica se dá não somente para a absorção de nutrientes e oxigênio, mas também para a secreção de metabólitos sintetizados nos hepatócitos. O sangue entra no lóbulo

hepático através dos ramos da veia porta (pv) e da artéria hepática (ha) e flui através dos sinusóides em direção à veia central (cv). **(B) Representação esquemática do fígado tubular do teleósteo:** os ramos da veia porta (pv), da artéria hepática (ha) e ductos biliares (b) não estão agrupados no espaço porta. Os hepatócitos estão arranjados em túbulos ao invés de placas e os túbulos rodeados pelos sinusóides. Pequenos ductos biliares se encontram dentro dos túbulos.

Fonte: Adaptado de LORENT *et al.*, 2004.

Apesar destas singularidades, o *zebrafish* tem se mostrado um modelo viável para estudos hepáticos. Já foram observados que o etanol em exposição aguda (PASSERI *et al.*, 2009), alterações no metabolismo da metionina (MATTHEWS *et al.*, 2009), estresse do retículo endoplasmático (THAKUR *et al.*, 2011), drogas hepatotóxicas (HAMMES *et al.*, 2011) e obesidade (FORN-CUNÍ *et al.*, 2015) podem desencadear esteatose hepática no *zebrafish*. Em estudo recente, Sapp e colaboradores observaram que a frutose induziu um fenótipo similar ao da esteato-hepatite não alcoólica, caracterizado por presença de esteatose, estresse oxidativo e inflamação (SAPP *et al.*, 2014). Tomados em conjunto, estes estudos indicam que o *zebrafish* desenvolve esteatose hepática em resposta a insultos semelhantes aos dos mamíferos.

## 8- JUSTIFICATIVA

O alcoolismo e as doenças relacionadas ao consumo crônico de etanol são verdadeiros desafios para o sistema de saúde no mundo ocidental. A doença hepática alcoólica (DHA) é uma das principais causas de hepatopatia crônica.

A utilização do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG, como agente terapêutico nas etapas iniciais da DHA, pode justificar-se por sua atividade imunomoduladora e protetora da barreira intestinal. Além disso, apresenta a vantagem de ser um produto seguro, de fácil obtenção e custo acessível.

Esta tese busca elucidar aspectos da DHA e a ação do probiótico LGG, em um modelo de alcoolismo crônico, utilizando o zebrafish como animal de experimentação.



## 9- QUESTÕES DE PESQUISA

1. A exposição crônica ao etanol pode causar alterações patológicas no fígado do *zebrafish*?
2. O *Lactobacillus rhamnosus* GG, bactéria não autóctone do *zebrafish*, pode colonizar o intestino deste animal na presença do etanol?
3. O *Lactobacillus rhamnosus* GG pode ser uma terapia viável para o tratamento da esteatose hepática alcoólica?
4. O probiótico LGG pode atenuar os efeitos do etanol no comportamento neste modelo de exposição alcoólica crônica?

## 10- HIPÓTESES

- 1) A exposição crônica ao etanol causa esteatose e provoca distúrbios inflamatórios e estruturais no fígado do *zebrafish*.
- 2) A intervenção com o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG pode prevenir ou atenuar a esteatose hepática causada pela exposição crônica ao etanol.
- 3) Considerando-se a atividade dos probióticos no eixo enterocerebral, o LGG poderia minimizar os efeitos do etanol no comportamento do *zebrafish*.

## 11-OBJETIVOS

### 11.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as alterações hepáticas por exposição crônica ao etanol e o efeito do tratamento com o *Lactobacillus rhamnosus* GG, utilizando o *zebrafish* (*Danio rerio*) *wild type*, adulto.

### 11.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito do etanol no fígado do *zebrafish* por análises histológicas;
2. Analisar no tecido hepático a expressão dos genes – *Adiponectina*, *Receptor 2 de adiponectina*, *Sirtuína-1*, *Fator de necrose tumoral -  $\alpha$* , *Interleucina 1b* e *Interleucina 10*;
3. Avaliar a colonização intestinal do *zebrafish* pelo probiótico LGG;
4. Investigar os efeitos do etanol e do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG no soro e no tecido hepático do *zebrafish*;
5. Avaliar o comportamento dos animais submetidos ao etanol e tratados com o probiótico LGG.

Chronic Exposure to Ethanol Causes Steatosis,  
Inflammation and Ultrastructural Abnormalities in  
Zebrafish Liver

**Title:** CHRONIC EXPOSURE TO ETHANOL CAUSES STEATOSIS, INFLAMMATION AND ULTRASTRUCTURAL ABNORMALITIES IN ZEBRAFISH LIVER

**Short title:** ALCOHOL DAMAGES IN ZEBRAFISH LIVER

**Authors:** Ana Claudia Reis Schneider<sup>1</sup>, Cleandra Gregório<sup>2</sup>, Carolina Uribe Cruz<sup>3</sup>, Ranieli Guizzo<sup>3</sup>, Tais Malysz<sup>4</sup>, Maria Cristina Faccioni-Heuser<sup>4</sup>, Themis Reverbel da Silveira<sup>1</sup>.

**Institutions where work was carried out:**

Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

Centro de Microscopia Eletrônica (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

**Intitutions of authors:**

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Gastroenterologia e Hepatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (UFRGS), Porto Alegre, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UFRGS), Porto Alegre, Brasil

<sup>4</sup> Instituto de Ciências Básicas da Saúde (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

**Corresponding author:** Ana Claudia Reis Schneider

Address: Rua Ramiro Barcellos, 2350 - Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental - HCPA. Porto Alegre, RS, CEP: 90.035-903, Brazil.

Phone: 55 51 3359 8847; fax: 55 51 3359 8760

Mail: [schneiderac@gmail.com](mailto:schneiderac@gmail.com)

## CHRONIC EXPOSURE TO ETHANOL CAUSES STEATOSIS, INFLAMMATION AND ULTRASTRUCTURAL ABNORMALITIES IN ZEBRAFISH LIVER

**Aims:** Alcohol remains one of the most important causes of liver disease worldwide. Steatosis is a common consequence of alcohol abuse and may predispose to more severe hepatic disease. Knowledge of alcohol injury mechanisms will contribute to the development of novel therapies in the treatment of alcoholic liver disease. Our goal is to evaluate the effects of ethanol in liver and to analyze the expression of genes linked to hepatic inflammation in adult zebrafish chronically exposed to ethanol. **Methods:** Zebrafish (n=104), wild type, adult, male and female, were divided into two groups: Control and Ethanol (0.05 v/v). After two and four weeks of trial, livers were dissected, histological analysis (hematoxylin-eosin and Oil Red staining) and gene expression assessment of *adiponectin*, *adipor2*, *sirt1*, *tnf-a*, *il-1b* and *il-10* were performed. Ultrastructural evaluations were conducted at fourth week. **Results:** Exposing zebrafish to 0.5% ethanol developed intense liver steatosis after four weeks, as demonstrated by oil red staining. In ethanol-treated animals, the main ultrastructural changes were related to cytoplasmic lipid particles and droplets, increased number of RER cisterns and glycogen particles. Between two and four weeks, hepatic mRNA expression of *il-1b*, *sirt1* and *adipor2* were upregulated, indicating that ethanol triggered signaling molecules which are key elements in both hepatic inflammatory and protective responses. *Adiponectin* was not detected in the liver of animals exposed or not exposed to ethanol, and *il-10* did not show significant difference. **Conclusions:** Data suggest that inflammatory signaling and ultrastructural alterations play a significant role during hepatic steatosis.

**Key-words:** Alcoholic fatty liver; Ethanol; Hepatic steatosis; Inflammation; Zebrafish.

## INTRODUCTION

Alcoholic liver disease (ALD) encompasses a wide spectrum of injury, ranging from simple steatosis, leading to steatohepatitis, fibrosis and finally to cirrhosis.<sup>1,2</sup> Hepatic steatosis is the first and most common consequence of alcohol abuse, develops in about 90 – 95% of individuals who drink heavily, is usually asymptomatic and self limited; but may also occur in individuals who drink moderately.<sup>2</sup> Several studies have suggested that progression to more severe liver disease occurs in about 5%-20% of alcohol consumers.<sup>1</sup> As a consequence, it is important to better understand the pathogenesis of hepatic steatosis and the relationship between steatosis and liver injury.

Excessive accumulation of triglycerides in hepatocytes is the hallmark of hepatic steatosis. The source of triglyceride in the liver of ethanol consumers may be originated from disturbances of fatty acid oxidation mechanisms, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, alterations in lipogenic and lipolytic pathways and immune responses to ethanol.<sup>3,4,5,6,7</sup> A number of molecular mediator pathways regulating the synthesis, export, and oxidation of lipids have been discovered to be altered by ethanol: sterol regulatory element-binding proteins, peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma, adiponectin, sirtuins, and others.<sup>8</sup>

Zebrafish is increasingly used as an *in vivo* model system for translational research, since zebrafish have a high degree of genetic conservation and their morphological and molecular basis of tissue and organ development is either identical or similar to other vertebrates including humans.<sup>9,10</sup> In previous studies regarding to hepatic diseases related to ethanol, zebrafish proved to be a valuable strategy for identifying lipogenic mechanisms, genes and pathways that influence hepatic steatosis.

<sup>11, 12, 13, 14</sup> Studies focused in inflammatory pathways in steatosis are scarce and are not completely elucidated. Chronic ethanol consumption results in the activation of innate immunity and an inflammatory state, which contributes to the pathogenesis of ethanol-induced liver injury. The expression of *tumoral necrosis factor-alpha (tnf-a)*, *interleukins 1b* and *10 (il-1b* and *il-10)*, *adiponectin*, *adiponectin receptor 2 (adipor2)* and *sirtuin-1 (sirt1)* were evaluated and histological and ultrastructural evaluations were performed in liver of adult zebrafish after chronic ethanol exposure.

## METHODS

### Animals

Wild-type, adult zebrafish (*Danio rerio*), male and female, were purchased from a commercial distributor (Fish Flower, Porto Alegre, RS). The animals were of heterogeneous wild type stock from the standard short-fin phenotype and were housed for 2 weeks before the experiments in order to acclimate to the laboratory facility. Fish were maintained in aerated water at  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , 6.8 – 7 pH, on a 12/12 light/dark photoperiod cycle (lights on at 7:00 am). The animals were fed twice a day with fish food. Experiments were performed using a total of 104 animals. All fish used in this study were healthy and free of any signs of disease.

After acclimation period, the fish were randomly allocated into experimental tanks, density of 1 fish per liter of water. The following groups were performed (n=52/each group): Control (C) and Ethanol (E). E group received 0.5% (v/v) of ethanol (Merck KGaA, Germany) directly added into water; tank water was changed every two days and the ethanol replaced.<sup>15</sup> The tank water of C group was also changed in same



days of E group. At 2 and 4 weeks, fish were euthanized by hypothermal shock<sup>16</sup> and livers were completely removed for molecular and histological analysis.

The protocols were approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil (number 10.0327), and conducted in accordance with international guidelines for the care and use of laboratory animals.

## HISTOLOGICAL ANALYSIS

Livers of zebrafish dissected at 2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> weeks were stained with hematoxylin and eosin (n=5/group) or Oil Red (n=5/group). Livers were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin wax, sectioned (5 µm), and slices were stained with hematoxylin and eosin. Livers embedded in Tissue-Tek OCT Compound (Sakura Finetek, USA) were cryosectioned (8µm thick) and stained with Oil Red (Sigma-Aldrich, USA) to assess fatty droplet accumulation.

For ultrastructural evaluation, 2 fish (male) livers of C and E groups were fixed in 2.5% glutaraldehyde diluted by 0.12 M phosphate buffer (pH 7.2 - 7.4) for 3 h at 4°C. The material was washed three times in the same buffer at 30-min intervals and then post-fixed for 30 min in 1% buffered osmium tetroxide followed by a phosphate buffer (0.1 M) wash three times at 15-min intervals. Livers were dehydrated using ascending grades of alcohols and embedded in an epon-araldite mixture. Ultrathin sections (90 nm) were stained with 2% uranyl acetate and 1% lead citrate.<sup>17</sup> Ultrathin sections were examined under JEM 1200 FX II transmission electron microscope.

## GENE EXPRESSION ASSESSMENT

The liver samples (pool = 3 livers; n = 5/group/period) were immediately immersed in liquid nitrogen and stored in ultrafreezer (- 80°C). Total RNA was extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's protocol and the concentrations were quantified by Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, USA) at 260 nm. RNA purity was verified by a 260/280 nm ratio of 1.8 or greater. First-strand cDNA was synthesized from 3 µg of total RNA using the Superscript™ II RT system (Invitrogen, USA). Gene expression analysis of *adiponectin*, *adipor2*, *sirt1*, *tnf-α*, *il-1b* and *il-10* were performed from 5 µl of cDNA and run in duplicate using TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies, USA) (Table 1).

PCR amplifications were run on a Step One™ Real time PCR System (Applied Biosystems, USA) and performed starting with a 2 min denaturation step at 50°C, 10 min at 95°C followed by 40 cycles with 15 s at 95°C and 1 min at 60°C.

Gene expression was quantified using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (threshold cycle) method and normalization was done using the *elongation factor-α gene (ef-1α)*.

Table 1: Primers and probes identification assays

Gene	Assay ID
<i>adiponectin</i>	F: 5'- AGG CTT AGA CTG TGA ACG GTG GGA C-3' R: 5'- AGC AGG TGT GTC CAG ATG TTT CCA G-3'
<i>adipor2</i>	dr0342657
<i>sirt1</i>	ENSDART00000098209
<i>tnf - α</i>	dr03126848

<i>il -1b</i>	dr03114368
<i>il -10</i>	dr03103209
<i>ef - 1<math>\alpha</math></i>	dr03432748

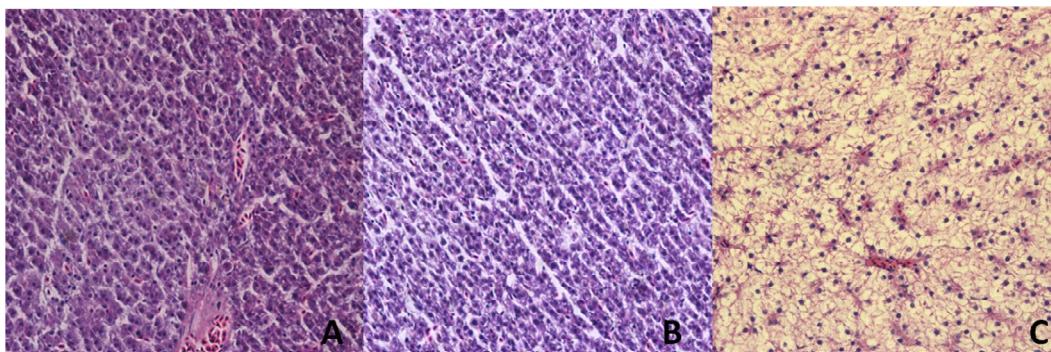
## STATISTICAL ANALYSIS

Log-transformed data was tested with Kruskal-Wallis test and Dunn as *post hoc* test for multiple comparisons. Results with  $p < 0.05$  were considered statistically significant. All analyzes were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 18.0) software.

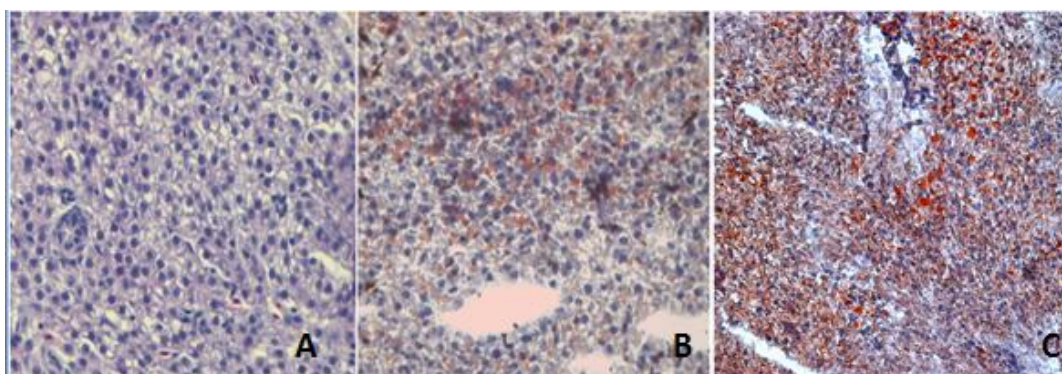
## RESULTS

### Ethanol Effects on Zebrafish Liver Histology

Liver sections of control animals stained with hematoxylin-eosin showed well-preserved liver cells without signs of fat deposits (Fig. 1A). After 2 weeks of ethanol exposure, the liver appearance of animals from E group were similar to the C group (Fig. 1B), however at 4 weeks, the hepatocytes of animals from E group showed an expressive enlargement and presented nuclei displaced to the periphery of the cytoplasm due to fatty infiltration (Fig. 1C). Liver sections of control animals stained with Oil Red did not present any lipid droplets (Fig. 2A). However, ethanol-treated animals presented a light steatosis at 2<sup>nd</sup> week (Fig. 2B) which increased severely in the 4<sup>th</sup> week (Fig. 2C).



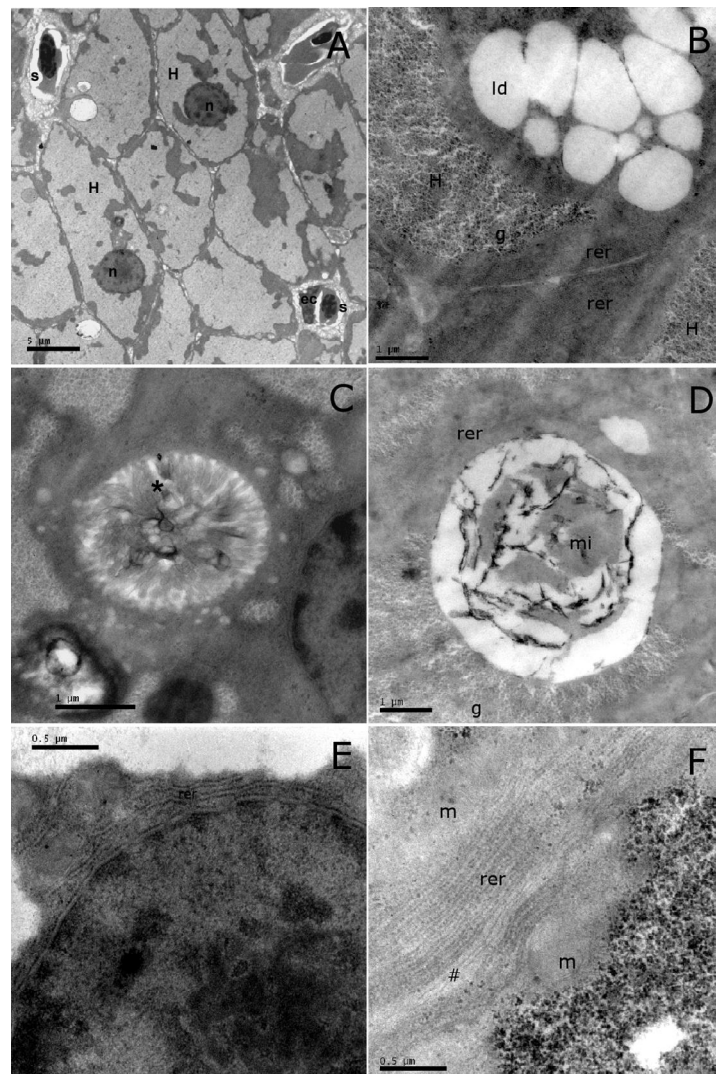
**Fig 1** Hematoxylin-eosin stained sections of zebrafish liver: A) C group (2 weeks), the hepatocytes are aligned in cords, absence of fat droplets; B) E group (2 weeks), without apparent changes compared with the C group; C) E group (4 weeks), enlarged hepatocytes due to fatty infiltration. Magnification: 400x.



**Fig 2** Oil red stained sections of zebrafish liver: a) C group (4 weeks), absence of lipid droplets; b) E group (2 weeks), mild presence of lipid droplets; c) E group (4 weeks), intense lipid accumulation induced by ethanol in hepatocytes. Magnification: 400x.

The ultrastructural evaluation of the control group showed hepatocytes with hexagonal shape, evident nucleoli of moderate size and located in the centre of the spherically shaped nuclei (Fig. 3A), intracellular duct with microvilli (Fig. 3C), rough endoplasmic reticulum, contained few cisternae and were closely associated with mitochondria (Fig. 3E). Compared to control group, hepatocytes of ethanol-treated fish

showed a large amount of glycogen associated with numerous lipid droplets (Fig. 3B); the intracellular canaliculi often showed signs of degeneration with aspects of myelin figures therein (Fig. 3D); and augmented number of rough endoplasmic reticulum (RER) cisterns (Fig. 3F).



**Fig 3** Electron micrographs of liver sections from Control (left side, A, C and E) and Ethanol exposed groups (right side, B, D and F). A: Polygonal hepatocytes (H), spherical nucleus (n) sinusoid (s), endothelial cell (EC); C: Intracellular canaliculus with large number of microvilli (\*) within; E: It is noted the parallel arrangement of rough

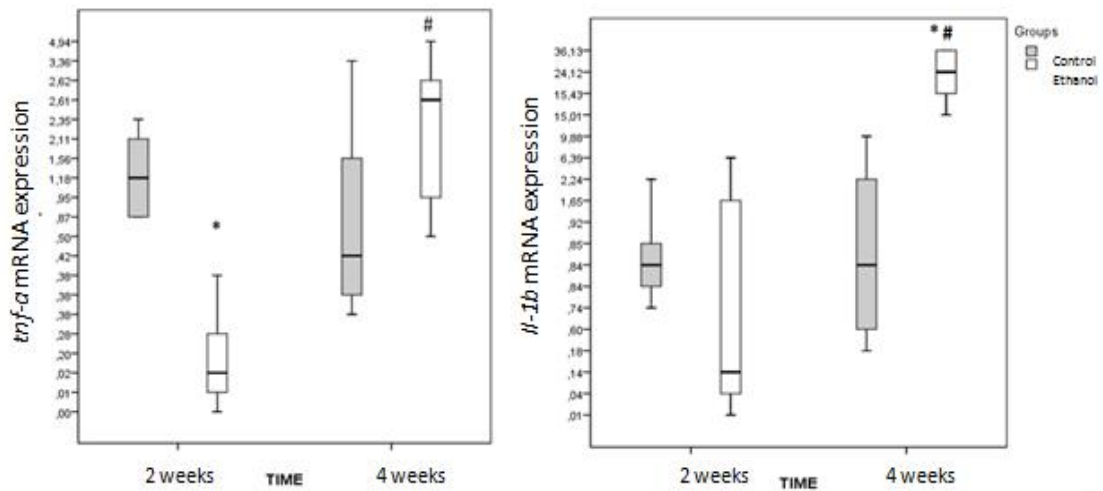
endoplasmic reticulum (rer) around the core; B: Presence of large amount of glycogen (g) and lipid droplets (ld) in the hepatocytes cytoplasm; D: myelin figure (mi) inside an intracellular canaliculus; F: Rough endoplasmic reticulum (rer) composed by 8-12 parallel cisterns. H=hepatocytes; ec=endothelial cell; m=mitochondria; mi = myelin figures; n=nucleus; s=sinusoid. Scale bars: A= 5  $\mu\text{m}$ ; B,C, D = 1  $\mu\text{m}$ ; E,F = 0,5  $\mu\text{m}$ .

#### Gene Expression Assessment

At 2<sup>nd</sup> week the genes evaluated did not present statistical difference in mRNA expression between E and C groups, except for *tnf- $\alpha$* , which was decreased. An increase of expression of *tnf- $\alpha$* , *il-1b*, *adipo-r2* and *sirt1* was observed between two and four weeks in E group, demonstrating that time to ethanol exposure had influence on expression of these genes. The *il-10* expression did not reach significant statistical difference between groups at any period (data not shown). *Adiponectin* mRNA was not detected in liver of animals from C and E groups.

#### The Effect of Ethanol on the Expression of Cytokines mRNA

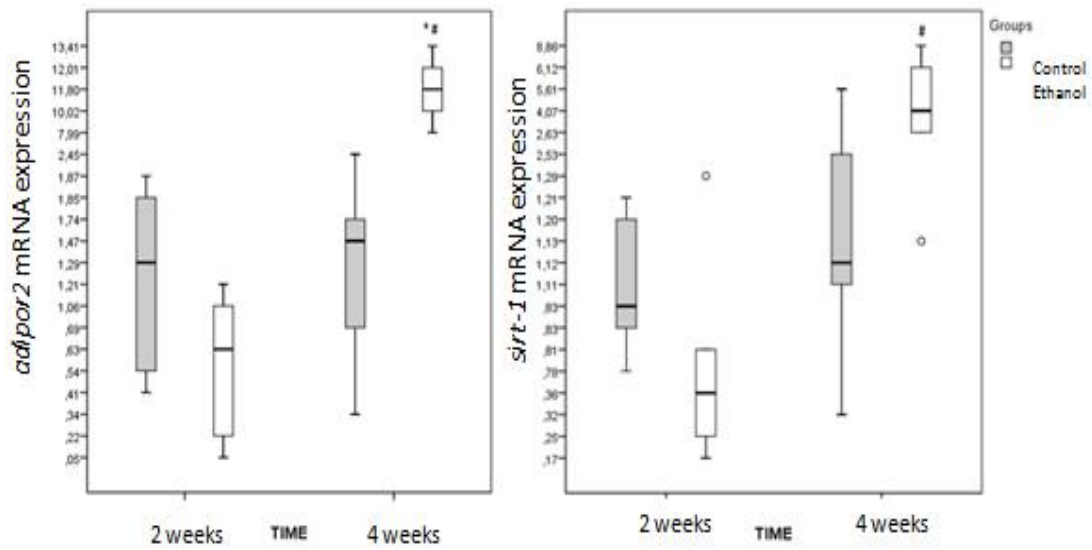
The hepatic *tnf- $\alpha$*  expression in E was lower than in C group at 2 weeks ( $p=0.018$ ) and increased significantly between the 2<sup>nd</sup> and the 4<sup>th</sup> ( $p<0.001$ ). The *il1-b* expression was significantly increased between C and E groups at 4<sup>th</sup> week ( $p=0.024$ ) (Fig. 4).



**Fig 4** Effect of ethanol on mRNA liver expression of *tnf- $\alpha$*  and *il-1 $\beta$* : *tnf- $\alpha$*  was decreased significantly in E group compared to C at 2<sup>nd</sup> week (p=0.018) and increased along time until 4<sup>th</sup> week (p<0.001), reaching C group levels. *Il-1 $\beta$*  expression increased between 2 and 4 weeks (p=0.001) and at 4<sup>th</sup> week there was a significant difference between C and E groups (p=0.024). Statistical data were determined by the Kruskal-Wallis test and Dunn as *post hoc* test. Values significantly different where indicated: # significant statistical difference between 2 and 4 weeks; \* significant statistical difference between C and E groups. P<0.05 was considered.

#### Ethanol Effects on mRNA Expression of *adipor2* and *sirt1*

The expression of *adipor2* increased in E group between 2 and 4 weeks (p<0.0001) and was higher in E compared to C group (p=0.006) at 4<sup>th</sup> week (Fig. 4). *Sirt1* showed an increased expression in E group along time until the 4<sup>th</sup> week (p=0.001) (Fig. 5).



**Fig 5** Effect of ethanol on mRNA liver expression of *adipor2* and *sirt1* of zebrafish: *adipor2* and *sirt1* expression increased in E group between 2 and 4 weeks;  $p < 0.0001$  and  $p = 0.001$ , respectively. At 4<sup>th</sup> week *adipor2* of E group was increased compared to C,  $p = 0.006$ . # significant statistical difference between 2 and 4 weeks. \* significant statistical difference between C and E groups.  $P < 0.05$  was considered significant.

## DISCUSSION

Hepatic metabolic derangements are key components in the development of steatosis, considered the first hit for development of ALD. Until recently, the role of inflammation was linked to the presence of steatohepatitis, and scarce evidence has shown the precocity of inflammatory signaling during steatosis.<sup>18</sup>

Important histological and ultrastructural abnormalities in liver of chronic ethanol-exposed zebrafish were seen at 4<sup>th</sup> week in this study. A light steatosis was detected by oil red staining at 2<sup>nd</sup> week, which increased severely at 4<sup>th</sup> week. Electron transmission microscopy revealed concurrent marked accumulation of glycogen and lipid droplets in



cytoplasm, committed intracellular canaliculi, and increased RER cisterns. Our findings were similar to those described in alcoholic humans: increased glycogen and fat deposits in the cytoplasm, abnormalities in endoplasmic reticulum.<sup>19</sup> Howarth and colleagues observed abnormalities of endoplasmic reticulum and biliary canaliculi in acutely ethanol treated zebrafish larvae.<sup>13</sup> Mitochondrial and ER abnormalities were seen in a model of non-alcoholic fat liver disease (NAFLD) induced by fructose in zebrafish.<sup>20</sup>

In accordance to histological findings, there were changes in hepatic mRNA expression of *il-1b*, *tnf- $\alpha$* , *sirt1* and *adipor2*. At fourth week, in the presence of more advanced steatosis, *il-1b* showed an expressive increase. Growing evidence indicates that increased pro-inflammatory cytokines are involved in the progression of alcohol-induced liver injury.<sup>21, 22</sup> The activation of innate immunity also stimulates the release of hepatoprotective and anti-inflammatory cytokines, which play a compensatory role against liver damage and inflammation.<sup>22</sup> In our study the *il-10* expression was not different between C and E groups. *The il-10* is produced by macrophages, lymphocytes, and Kupffer cells, and the liver is considered to be the main source of *il-10* production in response to lipopolysaccharides (LPS) stimulation.<sup>23</sup> Sepulcre and colleagues demonstrated that zebrafish responds to LPS with much lower sensitivity than mammals, what can explain the absence of difference in hepatic expression of *il-10*, between C and E groups.<sup>24</sup>

Elevated circulating levels of *TNF- $\alpha$*  and *IL-1b* have been observed in human patients and animal models of ethanol-induced liver injury.<sup>25, 26</sup> The expression levels of these cytokines correlate well with the progression of the disease. In our study the *tnf- $\alpha$*  liver expression was initially decreased in E group compared to C at 2<sup>nd</sup> week and increased significantly along 2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> weeks, reaching the C expression levels at 4<sup>th</sup>

week. The initial down regulation of *tnf-α* expression is difficult to explain. Liu and colleagues demonstrated that only zebrafish with previous intestinal inflammation presented elevated *tnf-α* expression in liver compared to healthy animals after LPS exposure.<sup>27</sup> Zebrafish are indeed able to respond to LPS, however with much lower sensitivity than mammals and via a *tlr4/myd88*-independent signaling pathway.<sup>24, 28</sup> Among the few studies that evaluated *tnf-α* expression in the liver of zebrafish, Sapp observed an elevation of *tnf-α* in fructose-treated larvae and Hammes in thiocetamide-treated fish.<sup>20, 29</sup> Although there was no direct evidence in our study, these cited findings conducted us to conclude that *tnf-α* is not promptly induced by LPS in zebrafish exposed to ethanol as occurring in mammals and its activation mechanism seems to be associated to more aggressive hepatotoxicants.

Differently, the hepatic expression of *il-1β* increased significantly over the period considered and at 4<sup>th</sup> week it was significantly higher in E group compared to C. *Interleukin-1 (IL-1)*, the ‘gatekeeper’ of inflammation, is the apical cytokine in a signaling cascade that drives the early responses to injury or infection.<sup>30</sup> *Il-1β* production requires caspase-1 activation by inflammasomes-multiprotein complexes that are assembled in response to danger signals. Vojtech and colleagues have described the cleavage of zebrafish *il-1β* by the caspase-1 homologues caspase-A and caspase-B, implying that the basic facets of the inflammasome platform of immune activation are conserved in zebrafish.<sup>31</sup> The induction of *il-1β* demonstrated an early response to inflammatory stimuli in the present study. The up regulation of *il-1β* did not occur synergistically with *tnf-α* expression, as seen in mammals with ALD.<sup>26</sup> This result may indicate that *il-1β* is up regulated during chronic alcohol induced steatosis in this model in a LPS independent pathway.

Adiponectin is a hormone that is secreted exclusively by adipocytes and has anti-inflammatory and hepatoprotective activities.<sup>32</sup> Circulating adiponectin is decreased in mammals with alcoholic disease.<sup>32, 33</sup> In our study, *adiponectin* mRNA did not amplify in the livers of animals of both groups. Amali and collaborators observed elevated expression of *adiponectin* in liver of zebrafish treated with thioacetamide, but not in control animals.<sup>34</sup>

In our study, the *adipor2*, a receptor of adiponectin, was over expressed in liver of animals exposed to ethanol, during the period that hepatic steatosis became more severe. To date, very few data are available regarding the effect of chronic ethanol exposure on hepatic *adipor2*. Hammes and colleagues observed decreased mRNA expression of hepatic *adipor2* and *sirt1* and increased *tnf- $\alpha$*  in a model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) induced by thioacetamide in zebrafish.<sup>29</sup> Possibly, thioacetamide, a more aggressive liver toxicant, contributed to down regulate *adipor2*. In humans, it was observed by Kaser that in presence of NASH, *ADIPOR2* expression was decreased compared to simple steatosis.<sup>35</sup> Neumeier and collaborators showed that animals (rodents) with liver steatosis presented elevated liver expression of *Adipor2*.<sup>36</sup> The increased expression of *adipor2* possibly is related to hepatic protection during steatosis.

*SIRT1* is a NAD<sup>+</sup>-dependent class III protein deacetylase that regulates lipid metabolism by deacetylation of modified lysine residues on histones, and targets a number of transcription factors involved in the regulation of gluconeogenesis, mitochondrial biogenesis, resistance to oxidative stress, adipogenesis and lipolysis, glycolysis, inflammation, apoptosis, cell differentiation, and angiogenesis.<sup>37</sup> To date, little is known about the function of *SIRT1* in innate immunity and host defense.

Studies in mammals have indicated that *SIRT1* suppresses innate inflammatory responses.<sup>38</sup> Other authors have shown an expressive increase of *sirt1* in liver of zebrafish chronically exposed to ethanol (0,5% vv).<sup>39, 40</sup> In our study occurred a significant increase of *sirt1* between second and fourth weeks in fish treated with ethanol. We can speculate that the *sirt1* hepatoprotective role might be involved in this process.

## CONCLUSION

Ethanol effectively induced hepatic lipid accumulation and ultrastructural abnormalities in liver of adult zebrafish. Augmented expression of *il-1b* suggests that inflammatory signaling plays a significant role in hepatic steatosis and *adipor2* and *sirt1* increased expression appears to represent compensatory efforts to alleviate consequences of ethanol liver injury, probably, indicating a hepatoprotective reaction. Hepatic steatosis is considered the first hit of chronic progressive ALD. The investigation of earliest events linked to ALD requires multiple strategies to reverse the damage effects of ethanol to the liver and to contribute to development of new therapies.

**ACKNOWLEDGMENTS:** We thank FIPE – HCPA (Research Incentive Fund – Hospital de Clínicas de Porto Alegre) and CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development) for financial support.

## REFERENCES

1 O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ; Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver Diseases; Practice Parameters Committee

- of the American College of Gastroenterology. Alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2010; 51(1):307-28.
- 2 Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*. 2011; 141(5):1572-85.
- 3 Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol*. 2004; 34(1):9-19.
- 4 Donohue TM Jr. Alcohol-induced steatosis in liver cells. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(37):4974-8.
- 5 Sozio M, Crabb DW. Alcohol and lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 295(1):E10-6.
- 6 Tilg H, Moschen AR, Kaneider NC. Pathways of liver injury in alcoholic liver disease. *J Hepatol*. 2011; 55(5):1159-61.
- 7 Park BJ, Lee YJ, Lee HR. Chronic liver inflammation: clinical implications beyond alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20(9): 2168-75.
- 8 Rasineni K, Casey CA. Molecular mechanism of alcoholic fatty liver. *Indian J Pharmacol*. 2012; 44(3):299-303.
- 9 Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*. 2007; 8(5):353-67.
- 10 Goldsmith JR, Jobin C. Think small: zebrafish as a model system of human pathology. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012:817341.
- 11 Passeri MJ, Cinaroglu A, Gao C, Sadler KC. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. *Hepatology* 2009; 49 (2):443-52.
- 12 Howarth DL, Passeri M, Sadler KC. Drinks like a fish: using zebrafish to understand alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011; 35(5):826-9.

- 13 Howarth DL, Vacaru AM, Tsedensodnom O, *et al.* Alcohol disrupts endoplasmic reticulum function and protein secretion in hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res.* 2012; 36(1):14-23.
- 14 Tsedensodnom O, Vacaru AM, Howarth DL, Yin C, Sadler KC. Ethanol metabolism and oxidative stress are required for unfolded protein response activation and steatosis in zebrafish with alcoholic liver disease. *Dis Model Mech.* 2013; 6(5):1213-26.
- 15 Schneider AC, Machado AB, de Assis AM, *et al.* Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on hepatic and serum lipid profiles in zebrafish exposed to ethanol. *Zebrafish* 2014; 11(4): 371-8.
- 16 Wilson JM, Bunte RM, Carty AJ. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2009; 48(6):785-9.
- 17 Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963; 17: 208-12.
- 18 Wang Z, Su B, Fan S, Fei H, Zhao W. Protective effect of oligomeric proanthocyanidins against alcohol-induced liver steatosis and injury in mice. *Biochem Biophys. Res Commun.* 2015; 458(4):757-62.
- 19 Lane BP, Lieber CS. Ultrastructural alterations in human hepatocytes following ingestion of ethanol with adequate diets. *Am J Pathol.* 1966; 49(4):593-603.
- 20 Sapp V, Gaffney L, Eau Claire SF, Matthews RP. Fructose leads to hepatic steatosis in zebrafish that is reversed by mechanistic target of rapamycin (mTOR) inhibition. *Hepatology.* 2014;60(5):1581-92.
- 21 Mandrekar P, Szabo G. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol.* 2009; 50(6): 1258–1266.

- 22 Gao B. Hepatoprotective and anti-inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012; 27 (Suppl 2):89-93.
- 23 Kawaratani H, Tsujimoto T, Douhara A, *et al.* The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013:495156.
- 24 Sepulcre MP, Alcaraz-Pérez F, López-Muñoz A, Roca FJ, Meseguer J, Cayuela ML. Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-kappaB activation. *J Immunol.* 2009; 182 (4): 1836-45.
- 25 Mandrekar P, Ambade A, Lim A, Szabo G, Catalano D. An essential role for monocyte chemoattractant protein-1 in alcoholic liver injury: regulation of proinflammatory cytokines and hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 2011; 54(6): 2185-97.
- 26 Bertola A, Park O, Gao B. Chronic plus binge ethanol feeding synergistically induces neutrophil infiltration and liver injury in mice: a critical role for E-selectin. *Hepatology* 2013; 58(5):1814-23.
- 27 Liu X, Chang X, Wu H, Xiao J, Gao Y, Zhang Y. Role of intestinal inflammation in predisposition of *Edwardsiella tarda* infection in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.* 2014; 41(2):271-8.
- 28 Meng Z, Zhang XY, Guo J, Xiang LX, Shao JZ. Scavenger receptor in fish is a lipopolysaccharide recognition molecule involved in negative regulation of NF- $\kappa$ B activation by competing with TNF receptor-associated factor 2 recruitment into the TNF- $\alpha$  signaling pathway. *J Immunol.* 2012; 189(8):4024-39.
- 29 Hammes TO, Pedroso GL, Hartmann CR, *et al.* The effect of taurine on hepatic steatosis induced by thioacetamide in zebrafish (*Danio rerio*). *Dig Dis Sci.* 2012; 57(3):675-82.

- 30 Ogryzko NV, Hoggett EE, Solaymani-Kohal S, *et al.* Zebrafish tissue injury causes upregulation of interleukin-1 and caspase dependent amplification of the inflammatory response. *Dis Model Mech.* 2014; 7: 259-264.
- 31 Vojtech LN, Scharping N, Woodson JC, Hansen JD. Roles of inflammatory caspases during processing of zebrafish interleukin-1b in *Francisella noatunensis* infection. *Infect Immun.* 2012, 80(8):2878 – 85.
- 32 You M, Rogers CQ. Adiponectin: a key adipokine in alcoholic fatty liver. *Exp Biol Med (Maywood).* 2009; 234(8):850-9.
- 33 Thakur V, Pritchard MT, McMullen MR, Nagy LE. Adiponectin normalizes LPS-stimulated TNF-production by rat Kupffer cells after chronic ethanol feeding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G998 –G1007.
- 34 Amali AA, Rekha RD, Lin CJ, *et al.* Thioacetamide induced liver damage in zebrafish embryo as a disease model for steatohepatitis. *J Biomed Sci.* 2006; 13(2):225-32.
- 35 Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54(1):117-21.
- 36 Neumeier M, Hellerbrand C, Gäbele E, *et al.* Adiponectin and its receptors in rodent models of fatty liver disease and liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(34): 5490-4.
- 37 Feige JN, Auwerx J. Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology. *Curr Opin Cell Biol.* 2008; 20(3):303-9.
- 38 Yoshizaki T, Schenk S, Imamura T, *et al.* SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 298(3): E419-28.



39 Oliveira GMT, Schimer H, Pereira TCB, *et al.* Análise do padrão transcricional de SIRT1, PGC1 $\alpha$  e PPAR- $\gamma$  influenciado por etanol em fígado de zebrafish. [http://www.pucrs.br/edipucrs/XSalaoIC/Ciencias\\_Biologicas/Bioquimica/70777-GIOVANNA\\_MEDEIROS\\_TAVARES\\_DE\\_OLIVEIRA.pdf](http://www.pucrs.br/edipucrs/XSalaoIC/Ciencias_Biologicas/Bioquimica/70777-GIOVANNA_MEDEIROS_TAVARES_DE_OLIVEIRA.pdf)

40 Pereira TC, Rico EP, Rosemberg DB, *et al.* Zebrafish as a model organism to evaluate drugs potentially able to modulate sirtuin expression. *Zebrafish*. 2011; 8 (1):9-16.

**13- CAPITULO II - ARTIGO II**

Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on Hepatic  
and Serum Lipid Profiles in Zebrafish Exposed to  
Ethanol

Status: publicado

Zebrafish

Volume 11, Number 4, 2014

Mary Ann Liebert, Inc.

DOI: 10.1089/zeb.2013.0968

## **Effects of Lactobacillus Rhamnosus GG on Hepatic and Serum Lipid Profiles in Zebrafish Exposed to Ethanol**

Ana Claudia Reis Schneider, Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado, Adriano Martimbianco de Assis, Djuli Milene Hermes, Pedro Guilherme Schaefer, Ranieli Guizzo, Laísa Beduschi Fracasso, Fernanda de-Paris, Fábio Meurer, Afonso Luis Barth, and Themis Reverbel da Silveira.

### **ABSTRACT**

Zebrafish is a powerful tool in pharmacological research and useful to identify new therapies. Probiotics can offer therapeutic options in alcoholic liver disease. This study was done in two independent experiments: first, we confirmed the intestinal colonization of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) after ethanol exposure. Second, four groups were performed: control (C), probiotic (P), ethanol (E), and probiotic+ethanol (P+E). Liver histology, hepatocytes morphometry, hepatic and serum lipid quantifications were conducted in second experiment. During 4 weeks, P and P+E groups were fed with LGG supplemented feed; E and C unsupplemented. E and P+E groups received 0.5% of ethanol added into tank water. Zebrafish exposed to ethanol (E group) presented intense liver steatosis after 28 days in contrast to the almost normalized liver histology of P+E group at the same period. Liver morphometry showed a significant enlargement of hepatocytes of E group after 4 weeks ( $p < 0.0001$ ). Serum triglycerides decreased in P+E group compared with C, P ( $p < 0.001$ ), and E ( $p = 0.004$ ), after 14 and 28 days similarly. Serum cholesterol was also decreased by LGG; P group decreased compared with C and E after 14 days ( $p = 0.002$  and  $p = 0.007$ , respectively) and P+E group decreased significantly compared with E and C groups ( $p < 0.0001$ ) after 28 days. Hepatic triglycerides were reduced in P+E group after 28 days compared to E ( $p = 0.006$ ). The persistence of LGG in zebrafish intestines was demonstrated. LGG decreased serum levels of triglycerides and cholesterol and improved hepatic steatosis.

### **INTRODUCTION**

Alcoholic liver disease is a major cause of chronic liver disease worldwide.<sup>1</sup> The most effective therapy for alcoholism is alcohol abstinence. However, targeted therapies are urgently needed to treat people who do not reach abstinence. Experimental

studies can identify new potential therapeutic avenues for treatment of the deleterious effects of alcohol intake.

The zebrafish (*Danio rerio*) has been utilized successfully as an experimental model for investigation of several human diseases, including alcoholism. Similarly to mammals, these fish exhibit behavioral and neurochemical changes,<sup>2,3</sup> congenital malformations<sup>4</sup> and hepatic disturbances<sup>5</sup> after acute or chronic exposure to alcohol, as occurs in human beings. The normal microbiota can be altered by abusive alcohol intake<sup>6,7</sup> causing dysbiosis and endotoxemia which are related to inflammatory processes in the gut and liver.<sup>6</sup> The zebrafish microbiota interacts with the host in a manner resembling that of mammals and the intestinal structure and organization are also very similar.<sup>8</sup> There are no significant differences between male and female and the posterior intestinal segment possesses a higher degree of culturable bacteria than anterior segment.<sup>9</sup>

*Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) is a Gram-positive rod or coccobacillus well recognized for the beneficial effects conferred on its host and may lead to changes in the lipidomic profile<sup>10</sup> and immunity.<sup>11,12</sup> There are limited studies regarding to the effects of probiotics in zebrafish and the available data concerned mainly to reproductive issues.<sup>13,14</sup>

Zebrafish is emerging as a powerful tool in pharmacological research. The therapeutic properties of LGG and the possibility of zebrafish intestine colonization by this bacteria, led us to hypothesize that LGG could prevent or mitigate liver disease in this model.

In order to test our hypothesis two independent experiments were performed. The objective of the first experiment was to evaluate intestinal colonization by LGG in zebrafish during a period of chronic ethanol exposure. The second experiment was designed to examine whether the LGG treatment could modify serum and hepatic lipid levels and improve liver steatosis.

## MATERIALS AND METHODS

### *Fish and experimental conditions*

Adult, wild-type zebrafish were obtained from a commercial dealer in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Zebrafish were housed in static system tanks, constantly aerated, in a water temperature of  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ , a 12h light/dark cycle and fed twice daily during acclimation to their new environment. Temperature, pH, and ammonia, nitrate and nitrite levels were periodically monitored.

The experimental design was divided into two stages: first, detection of zebrafish intestinal colonization by LGG during ethanol exposure; second, evaluation of hepatic steatosis related to ethanol exposure, triglycerides and total cholesterol concentrations in serum and liver after probiotic treatment. Fish were euthanized by hypothermal shock<sup>15</sup> before dissection.

This study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil, and conducted in accordance with international guidelines for the care and use of laboratory animals.

### ***First experimental design***

The following groups were performed: C (Control), which received unsupplemented feed during the trial period; P (Probiotic) and P+E (Probiotic + Ethanol) which received LGG-supplemented feed. P+E group received 0.5% (v/v) of ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) directly added into water. Water of P+E group tank was changed every two days and the ethanol replaced. C and P groups also had tank water changed. The ethanol dose was chosen on the basis of a previous zebrafish study<sup>16</sup> that demonstrated behavioral changes in the exposed fish similar to those observed in human beings.

Feeds were formulated by the Aquatic Organisms Nutrition Laboratory, Universidade Federal do Paraná. Commercially available freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG (Culturelle®, Amerifit, Cromwell, CT),  $1\times 10^{10}$  CFU/100g, was added to the diets of P and P+E groups. The nutritional composition of the formulated diets, both probiotic-supplemented and unsupplemented, was the same (Table 1).<sup>17</sup> The viability of freeze-dried LGG in the supplemented diet was determined by plate counting on MRS Agar (Difco™, Sparks, MD), a selective medium for lactic acid bacteria. The number of colony forming units of LGG per gram of feed (CFU/g) was quantified by mixing 1 g of

feed in 9 ml of sterile saline solution and streaking appropriate dilutions, from  $10^{-1}$  to  $10^{-10}$ , on MRS plates. The plates were then incubated in a microaerophilic environment at 37°C for 48 hours. LGG was quantified by counting of the incubated plates. The unsupplemented feed was also evaluated in order to verify the absence of lactobacilli. Fish were fed twice daily during two weeks. All feeds were stored at 4°C until use.

Table 1. Nutritional composition of the formulated diet.

Ingredients	Content (%)
Fish meal	5.0
Soybean meal	59.4
Corn	31.1
Soy oil	0.4
Dicalcium phosphate	2.6
Limestone	0.3
Mineral and vitamin mix. <sup>1</sup>	0.5
Salt	0.5
Antioxidant (BHT)	0.02

<sup>1</sup> Vit. A, 1.200.000 UI; Vit. D3, 200.000 UI; Vit. E, 12.000 mg; Vit. K3, 2.400 mg; Vit. B1, 4.800 mg; Vit. B2, 4.800 mg; Vit. B6, 4.000 mg; Vit. B12, 4.800 mg; Folic acid, 1.200 mg; Calcium pantothenate, 12.000 mg; Vit. C, 48.000 mg; Biotin, 48mg; Choline, 65.000 mg; Niacin, 24.000 mg; Iron, 10.000 mg; Copper, 6.000 mg; Manganese, 4.000 mg; Zinc, 6.000 mg; Iodine, 20mg; Cobalt, 2mg; Selenium, 20mg.

### ***Detection of LGG colonization in the zebrafish intestine***

After two weeks of treatment, fish were euthanized, opened aseptically and the intestines removed en bloc. Samples were collected for microbial analysis, strain confirmation by polymerase chain reaction (PCR) and Gram staining. Bacterial identification of samples from the P+E group was performed on a matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer (VITEK® MS, France), according to manufacturer instructions, in three independent runs. The method of identification included the mass-to-charge ratio (m/z) from 2 to 9.5 kDa. For each

spectrum, a maximum of 100 peaks were taken into account; these peaks were compared with the VITEK database.

The intestines of ten animals in each group were entirely removed and aseptically transferred to sterile microtubes containing 0.5 ml of PBS. This material was homogenized by vortexing and 20µl were inoculated in MRS plates and 10µl were used for Gram staining. One plate per animal per group was inoculated, and plates were incubated at 37°C for 2 days in a microaerophilic environment.

### ***Molecular assays***

PCR (polymerase chain reaction) was performed to confirm identification of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. Colony isolates of *Lactobacillus* from the cultures incubated in MRS agar were picked up with swabs and resuspended. A bacterial suspension equivalent to 1.0 McFarland standard was prepared in 500 µl TE (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). The suspension was homogenized by vortexing, heated at 100°C for 10 min, and frozen at –80°C for 2 hours. From this suspension, nucleic acid extraction was performed by using the QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen Corporation, Madison, WI) according to manufacturer specifications. Group C was used as the negative control.

The freeze-dried LGG culture was used as the positive control. We used the complementary species-specific primers to the *L. rhamnosus* 16S ribosomal DNA sequence (TGCATCTTGATTTAATTTTG, forward; CCGTCAATTCCTTTGAGTTT, reverse, GenBank accession no. M58815). PCR amplifications were performed under the following optimized conditions in a final volume of 50 µl, containing 5 µL of DNA, 67 mM Tris-HCl, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% (w/w) Tween-20 (pH 8.8 at 25°C), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM dNTP (EasyPath®, Epsom, UK), 1 pmol of each primer (Invitrogen, Grand Island, NE), and 2.5 U of Super-Therm enzyme (JMR Holdings, London, UK). PCR amplification was run on a Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). The amplification profile consisted of an initial denaturation, carried out at 94°C for 5 min, followed by a touchdown protocol with 30 cycles: 40 s of denaturation at 94°C; 30 s for annealing (62°C for the first 10 cycles, 60°C for the next 10 cycles, and 58°C for the remaining 10 cycles), 60 s for synthesis at 72°C, and a final extension

step of 10 min at 72°C. The PCR products were run on a 2% agarose gel in 0.5% Tris-borate-EDTA buffer.

### ***Second Experiment Design***

At this stage, four groups were performed (n = 220 for each group): C (Control) and E (Ethanol) groups received unsupplemented feed during the trial period (2 and 4 weeks); P (Probiotic) and P+E (Probiotic + Ethanol) groups received LGG-supplemented feed. E and P+E were exposed to ethanol as earlier described.

Histological analyses were performed with the liver taken from 80 fish (10 fish/4 groups/2 periods). For evaluation of hepatic and serum lipid concentrations, 800 fish were distributed into 40 pools (20 pools – 14 days period; 20 pools – 28 days period) for performing all analysis. Immediately after blood collection we dissected the livers for evaluation of lipids content.

### ***Histological Analysis and Cellular Morphometry***

Livers from the zebrafish (n=5/group/period) were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin wax, sectioned (5 µm), and slices were stained with hematoxylin and eosin or picosirius red staining. Picosirius stained samples were evaluated to detect fibrosis.

Frozen livers (n=5/group/period) were embedded in Tissue-Tek OCT Compound (Sakura Finetek, Torrance, CA), cryosectioned (8µm thick) and stained with Oil Red O to assess fatty droplet accumulation.<sup>18</sup>

Morphometric analysis were performed in C and E groups and consisted in consecutive measurements of internuclear distance between hepatocytes as described by Sadler et al.<sup>19</sup> Our aim was to observe enlargement in hepatic cells due to lipid accumulation. Hematoxylin and eosin stained slides of 30 consecutive non-overlapping fields of each liver sample were photographed (Olympus BX51). Cells separated by sinusoids or large extracellular gaps and areas with processing artifacts were excluded. Images at 1000 × magnification were stored as TIFF (1280 × 960 pixels). The digital images were analyzed with IMAGE PRO PLUS 4.5 software (Media Cybernetics, Silver Springs, MD).

### ***Biochemical and Hepatic Lipid Analysis***



To evaluate serum triglycerides and total cholesterol, four pools of 6-8 animals of each group were cryo-anesthetized and their blood collected at each period as previously described.<sup>20</sup> Briefly, a transverse incision was made just before the tail, and the blood was immediately collected with an automatic pipette pre-washed with 5 M EDTA. The blood of each pool was centrifuged for 10 min at 3.200 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415D, Eppendorf, Germany). Triglycerides and total cholesterol serum concentrations were analyzed with small-scaled colorimetric assay (Labtest Diagnostica S.A., Brazil).

In order to quantify the hepatic lipid content, we performed 40 pools containing 15-20 livers each (about 50 mg of liver tissue/pool). Each pool corresponded to one sample, 20 samples for quantification of hepatic triglycerides and cholesterol of all groups at each period. The livers were entirely removed and weighed. Frozen liver samples were thawed on ice and homogenized in deionized water. Extraction and isolation of lipids to yield dried lipid extracts were performed using the technique described by Folch et al.<sup>21</sup> The hepatic cholesterol and triglycerides content of the lipid extracts were assayed enzymatically by colorimetry (Labtest Diagnostica S.A., Brazil).<sup>22</sup>

## STATISTICS

The Mann–Whitney *U* test was used to determine whether ethanol exposure affected intestinal colonization by LGG in animals from groups P and P+E. Morphometry data were analyzed by random effects model and hepatic and serum lipids data by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple test range as post hoc. Results with  $P < 0.05$  were considered statistically significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 21.0) software.

## RESULTS

### *First experiments*

#### **LGG successfully colonized gut of zebrafish exposed to ethanol**

Quantification of LGG content in the supplemented feed confirmed the viability of the freeze-dried probiotic, which was present at a concentration of  $3.5 \times 10^7$  CFU/g.

Phenotypic characterization of the cultured colonies was consistent with the colonies obtained from the positive control: white, large, and creamy. Microbial analysis of unsupplemented feed revealed any growth of lactobacillus.

Microbial analysis of the intestinal contents of control animals (group C) did not show any lactobacillus growth. The incubated plates of intestinal samples from groups P and P+E showed significant growth of LGG colonies in all three experiments, indicating that exposure to ethanol did not prevent gut colonization of zebrafish at the utilized concentration. There was no significant difference in the colony counts between groups P and P+E ( $P = 0.44$ ). Median colony counts were log 4.30 CFU/g (interquartile range, 4.30 – 4.39) in the P group and log 4.17 CFU/g (interquartile range, 4.13 – 4.30) in the P+E group.

Gram staining detected the presence of numerous Gram-positive rods in the intestinal samples from groups P and P+E. The colonies isolated from the MRS plates of each animal in groups P and P+E were confirmed by PCR with species-specific primers to be of the LGG strain (FIG.1). Identification of an isolated colony from the P+E group by MALDI-TOF MS was consistent with the PCR result.

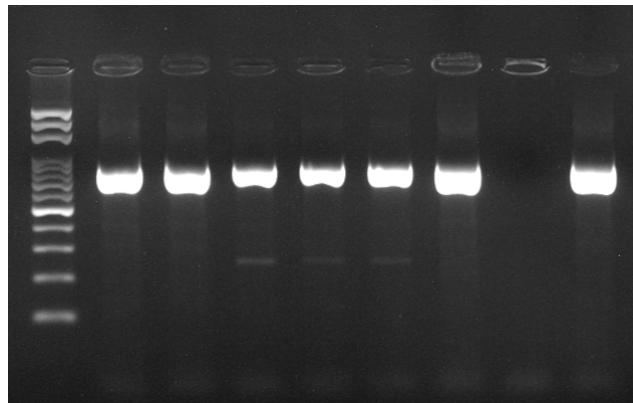


Figure 1: Detection of *L. rhamnosus* GG (LGG) by polymerase chain reaction assay. Lanes: 1, molecular weight marker; 2 through 4, strain GG findings of colonies from group P; 5 through 7, samples from group P+E; 8, negative control from group C (unsupplemented fish); 9, positive control from freeze-dried LGG colonies.

## Histology and cellular morphometry

Figure 2 shows histological appearance of liver sections stained with Oil Red O from C, E, P, and P +E experimental groups after 28th day. Oil Red O staining of E group livers confirmed the presence of neutral lipids within the cytoplasm of hepatocytes after 28 days (Fig. 2B), although initial changes were manifested at 14 days. Steatosis was not present in livers of fish from C and P groups (Fig. 2A, C). In addition, the P +E group clearly showed an almost normalized liver histology in contrast with liver of E group after 28 days (Fig. 2D). There were no differences between male and female related to the presence of hepatic steatosis. Picrosirius red staining did not detect any fibrosis in the livers of animals exposed to ethanol.

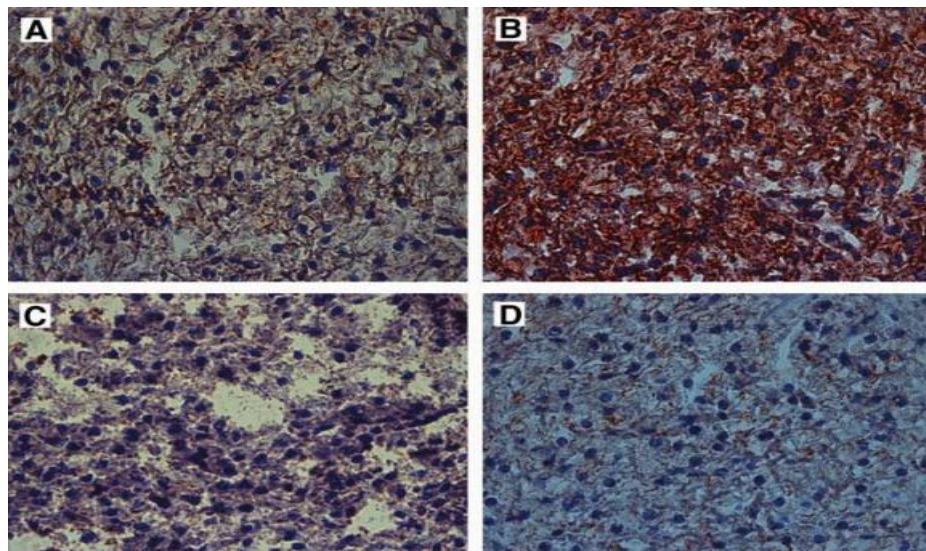


Figure 2: Effects of ethanol and LGG supplementation on zebrafish hepatic tissue. Histological appearance of liver sections stained with Oil Red O stain after 28 days trial (magnification 1000x): (A) control(C); (B) ethanol (E); (C) probiotic (P); (D) probiotic +ethanol (P +E). C and P groups did not present fatty droplets in liver tissue; however, ethanol group showed intense fatty infiltration and P +E group presented an almost normalized liver.

Morphometric measures showed augmented internuclear distance (Fig. 3) between hepatocytes of C and E groups after 28 days, E group presented a 14.8-fold cellular enlargement compared with C ( $C = 58.89 - 12.75 \mu\text{m}$  and  $E = 123.4 - 41.4 \mu\text{m}$ ;

$p < 0.0001$ ). Microscopically, the hepatocytes of E group at 28th day were enlarged, due to the excessive presence of lipid within the cytoplasm; the cell nuclei were displaced and the blood capillaries compressed.

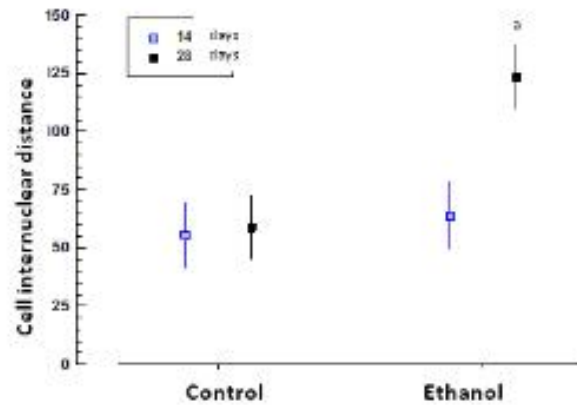


Figure 3: Effects of ethanol in zebrafish liver: morphometric measures showed augmented internuclear distance between hepatocytes of C and E groups after 28 days ( $p < 0.0001$ ). There was no significant difference after 14 days. Data are shown as the mean – SD,  $n = 5$  livers for each group.

### **Ethanol and LGG affected serum lipids**

Serum triglycerides concentrations after 14 days significantly decreased in P+E group compared to C, P and E groups ( $P < 0.001$ ). Similar variations occurred after 28 days: P+E group triglycerides levels were lower than C and P groups ( $P < 0.001$ ). Anova test showed that there was no evidence of a significant interaction effect ( $F(3; 26) = 0.278$ ;  $P = 0.84$ ) among means of groups and time (14 and 28 days). Total cholesterol was decreased by LGG after 14 and 28 days. P group had a significant reduction in serum total cholesterol compared to C and E groups after 14 days ( $P = 0.002$  and  $P = 0.007$ , respectively) and P+E group decreased significantly compared to E and C groups ( $P < 0.0001$ ) after 28 days. The statistical test showed that cholesterol levels presented a significant interaction between means of groups related to time ( $F(3; 28) = 11.75$ ;  $P < 0.001$ ). We can conclude that LGG effects on cholesterol, but not on

triglycerides serum levels, increased along time by LGG. These results are demonstrated in table 2.

Table 2: Serum levels of triglyceride and cholesterol in control (C), probiotic (P), ethanol (E) and probiotic+ethanol (P+E) groups after 14 and 28 days:

	C	P	E	P+E
Triglyceride (mg/dL)				
14 days	427.4±70.8 <sup>a</sup>	448.3±47.8 <sup>a</sup>	355.2±24.7 <sup>b</sup>	215.1±25.8 <sup>c</sup>
28 days	446.9±62.1 <sup>a</sup>	436.4±20.2 <sup>a</sup>	341.4±11.47 <sup>b</sup>	217.3±29.3 <sup>c</sup>
Cholesterol (mg/dL)				
14 days	296.9±45.0 <sup>a,A</sup>	203.1±21.1 <sup>b,A</sup>	278.7±33.2 <sup>a,A</sup>	240.9±13.3 <sup>a,b,A</sup>
<b>28 days</b>	<b>306.1±26.9<sup>a,A</sup></b>	<b>133.7±20.7<sup>b,B</sup></b>	<b>284.0±6.3<sup>a,A</sup></b>	<b>121.9±23.7<sup>b,B</sup></b>

Data are presented as mean ± SD; all groups were analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test;  $p < 0.05$  were considered significant,  $n = 4$  for each group. Different lower case letters (row) represent a significant difference between groups. Different capital letters (column) indicate a significant difference observed in the means of groups between 14th and 28th day. ANOVA, analysis of variance.

### LGG decreased hepatic triglycerides

After 28 days, hepatic triglycerides decreased significantly in group P+E compared to E, demonstrating an improvement in steatosis of animals treated with LGG. Hepatic triglycerides had no alteration after 14 days but decreased significantly in groups P+E and P compared to E after 28 days ( $P = 0.006$  and  $P = 0.004$ , respectively). We did not find a significant difference in hepatic cholesterol between groups in any period. ANOVA test showed that there was no evidence of statistically significant interaction effects between means of groups and time (Triglycerides  $F(3;32) = 2.719$ ;  $P = 0,061$  and Cholesterol  $F(3;37) = 0.327$ ;  $P = 0.8$ ). Data showed in Table 3.

Table 3: Hepatic triglycerides and cholesterol in control (C), probiotic (P), ethanol (E) and probiotic+ethanol (P+E) groups after 14 and 28 days:

	C	P	E	P+E
Triglyceride (mg/%)				
14 days	2.82±1.20 <sup>a</sup>	1.99±0.14 <sup>a</sup>	2.80±1.23 <sup>a</sup>	2.84±0.51 <sup>a</sup>
28 days	2.04±0.8 <sup>a</sup>	1.35±0.76 <sup>b</sup>	3.75±0.19 <sup>c</sup>	1.52±1.23 <sup>b</sup>
Cholesterol (mg/%)				
14 days	0.40±0.02 <sup>a</sup>	0.38±0.14 <sup>a</sup>	0.39±0.06 <sup>a</sup>	0.39±0.09 <sup>a</sup>
28 days	0.67±0.21 <sup>a</sup>	0.60±0.17 <sup>a</sup>	0.58±0.12 <sup>a</sup>	0.55±0.11 <sup>a</sup>

Concentrations of hepatic triglycerides and cholesterol are expressed in mg/100 mg of tissue and are represented as the mean ± SD;  $p < 0.05$  were considered significant,  $n = 5-8$  for each group. Different lower case letters represent a significant difference between means of groups.

## DISCUSSION

The use of animal models has helped to elucidate the mechanisms of several metabolic events triggered by ethanol intake, identify new therapeutic targets, and develop and test therapies, which may be able to cure or mitigate the deleterious effects of alcohol. Chronic alcohol abuse significantly increases morbidity and causes a wide clinical spectrum of disorders, such as hepatic steatosis, the earliest stage of ALD, which can progress to steatohepatitis, fibrosis, and cirrhosis.<sup>1</sup> Multiple factors can cause steatosis including decreased triglyceride metabolism, increased lipid import or synthesis, disorders of fatty acid oxidation, inhibition or activation of expression of several regulatory genes, oxidative stress, and innate immune responses.<sup>1,23</sup> The mechanisms by which these factors lead to steatosis or inflammation are just beginning to be understood. Ethanol can promote the growth of Gram-negative bacteria in the intestine, causing enteric dysbiosis, increased intestinal permeability, and endotoxemia, which play an essential role in the pathogenesis of ALD.<sup>24</sup>

The probiotic LGG is known to enhance immune system and intestinal barrier function and to provide an environment beneficial to the friendly microbiota in human beings.<sup>25-27</sup> In this study, the addition of freeze-dried *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) at a dose of  $3.5 \times 10^7$  CFU/g to formulated feed was suitable for colonization of the zebrafish intestine. Adhesion of the probiotic bacteria to the intestinal epithelium is an essential prerequisite for colonization. The colonization of these non-autochthonous bacteria in the intestinal mucosa of the zebrafish and, mainly,

its persistence during ethanol exposure showed no significant differences between the groups exposed and not exposed to ethanol. PCR of samples from animals in groups P and P +E confirmed the presence of the GG strain in all experiments. A representative sample of the P +E group was also analyzed with the MALDITOF method, which identified *L. rhamnosus* with 99.9% confidence according to VITEK microbial identification database.

Our results demonstrate that in this zebrafish model of ALD, chronic ethanol leads to hepatic steatosis after 2 weeks. Morphometric measurements showed an important cellular enlargement of liver cells after 4 weeks (Fig. 3) due to an increase of fatty droplets spread in the liver tissue. In humans, the localization of fat droplets is most prominent near the central vein and results from decreased energy stores caused by relative hypoxia and alterations in lipid metabolism, along with preferential oxidation of alcohol in the central zone.<sup>1</sup> The zebrafish liver does not present portal vein radicles, hepatic artery radicles, and bile ducts grouped together in portal tracts<sup>28</sup> and possibly this is the explanation for a ubiquitous distribution of the fatty droplets along the liver parenchyma without a specific area of localization.

Ethanol is known to be an important factor influencing lipid metabolism.<sup>29,30</sup> Studies have reported strong positive relationships between ethanol and high density lipoprotein cholesterol, and to a lesser extent with serum triglycerides.<sup>30</sup> The association with total cholesterol has been less consistent. Some studies have reported positive associations between ethanol and serum total cholesterol<sup>29,31</sup> while others have found no association.<sup>32</sup> The development of alcoholic fatty liver is often associated with hyperlipemia.<sup>29</sup> In this study, we found that ethanol significantly increased hepatic triglycerides after 28 days, data corroborated by enlargement of hepatic cells. The LGG showed extensive alterations on serum lipids, mainly related to lowering total cholesterol levels. Interestingly, the effects yielded by LGG in this model were related to animals that did not undergo a hypercholesterolemic diet. Results from animal and human studies suggest a moderate cholesterol lowering action of LGG.<sup>33</sup> Mechanistically, probiotic bacteria ferment food-derived indigestible carbohydrate to produce short-chain fatty acids in the gut, which can then cause a decrease in the systemic levels of blood lipids by inhibiting hepatic cholesterol synthesis and/ or redistributing cholesterol from plasma to the liver. Other features are as follows:

consumption or assimilation of cholesterol by intestinal bacteria, thus reducing the amount of cholesterol available for absorption; the activity of the bile salt hydrolase, an enzyme responsible for bile salt deconjugation in the enterohepatic circulation leading to increased bile excretion in feces.<sup>34-36</sup> Regarding the triglycerides serum levels, we observed an apparent synergism between LGG and ethanol. The probiotic group did not show any significant statistical difference compared to control group after 14 and 28 days, but ethanol per se significantly decreased triglycerides serum levels after 28 days compared with control and probiotic groups. However, the probiotic +ethanol group dramatically decreased triglycerides compared with control, probiotic, and ethanol groups after 28th day.

Data of murine studies demonstrated that the effects of LGG on ethanol-induced augmented intestinal permeability, endotoxemia, and liver injury occur through multiple mechanisms, including prevention of pathogenic bacterial overgrowth, stimulation of the trophic effects on the intestinal epithelial cells, and maintenance of intestinal barrier integrity.<sup>7,24,37</sup> Ritze et al. studying a murine model of nonalcoholic liver disease, observed that LGG modulated gene expression of inflammatory markers in the liver tissue, normalizing increased tumor necrosis factor-alpha (TNF-  $\alpha$ ), interleukin (IL)-1  $\beta$  and IL-8 levels.<sup>38</sup>

Studies on fish showed that determined probiotic strains could enhance the immunological system, modulate intestinal morphology, and stimulate the piscine gut immune system to produce Ig + cells and acidophilic granulocytes, enhance gut mucosal lysozyme and phagocytic activity.<sup>39-41</sup> Gioacchini et al. recently observed that adult zebrafish treated with *L. rhamnosus* strain IMC 501 presented decreased hepatic oxidative stress levels, decreased DNA damage, and increased lipid saturation levels.<sup>42</sup>

We observed that after 28 days the livers of fish exposed to ethanol alone presented an intense increase of fat (Fig. 2B); however, the ethanol +LGG fed group presented a decrease of liver steatosis (Fig. 2D). Acetaldehyde, the first metabolite of ethanol metabolism, has been suggested to play a pivotal role in the toxicity of ethanol to human tissues and create adverse immunological responses. LGG demonstrated a high capacity to metabolize acetaldehyde to acetate, a nontoxic compound.<sup>43</sup> Nosova et al. suggested a beneficial impact of LGG on acetaldehyde levels after ethanol ingestion.<sup>43</sup>



Multiple and complex mechanisms are involved in the pathogenesis of ALD: inflammation caused by ethanol metabolites and endotoxins, increase of oxidative stress, disruption of molecular signaling pathways, and disturbances of the immune and complement systems in responses to alcohol. Administration of health-promoting microbial strains may help ameliorate these harmful interactions. The zebrafish may be an interesting model to help solve these yet-unanswered questions, and LGG resistance to ethanol exposure may encourage the use of this animal model in the screening of other probiotic bacteria for therapeutic use in human alcohol related diseases.

## CONCLUSION

This study showed, for the first time, the persistence of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the zebrafish intestine after a period of ethanol exposure. Furthermore, the findings reported herein may help elucidate the pathways through which microbial signals operate and pave the way for research of therapies including LGG as a treatment in diseases caused by ethanol consumption utilizing this novel model. Zebrafish exposed to ethanol at this concentration (0.5% v/v) presented substantial steatosis after 28 days in contrast to the almost normalized liver histology of the Probiotic+Ethanol (P+E) group. Representative histochemical staining showed that liver fat accumulation was strongly reduced by LGG in the Probiotic+Ethanol (P+E) group. In addition, liver morphometry of the Ethanol (E) group clearly showed hepatocellular ballooning cells known for a higher degree in steatosis. Serum and lipids were also affected by ethanol and LGG in this model.

Steatosis decreased significantly with LGG therapy, but further studies are needed to understand the mechanisms by which ethanol and LGG alter the lipid metabolism of zebrafish.

## Acknowledgments

FIPE–HCPA (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos – Hospital de Clínicas de Porto Alegre) and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development).

## Disclosure Statement

The authors have nothing to declare.

## REFERENCES

1. Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 2011; 141(5):1572-1585.
2. Tran S, Gerlai R. Time-course of behavioral changes induced by ethanol in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res* 2013; 252:204-213.
3. Rico EP, Rosemberg DB, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicol Lett* 2007; 174(1-3):25-30.
4. Arenzana FJ, Carvan MJ, Aijón J, Sánchez-González R, Arévalo R, Porteros A. Teratogenic effects of ethanol exposure on zebrafish visual system development. *Neurotoxicol Teratol* 2006; 28(3):342-348.
5. Howarth DL, Passeri M, Sadler KC. Drinks Like a Fish: Using Zebrafish to Understand Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2011; 35(5):1-4.
6. Purohit V, Bode JC, Bode C, Brenner DA, Choudhry MA, Hamilton F. Alcohol, intestinal bacterial growth, intestinal permeability to endotoxin, and medical consequences: summary of a symposium. *Alcohol* 2008; 42(5):349-361.
7. Mutlu E, Keshavarzian A, Engen P, Forsyth CB, Sikaroodi M, Gillevet P. Intestinal dysbiosis: a possible mechanism of alcohol-induced endotoxemia and alcoholic steatohepatitis in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2009; 33(10):1836-1846.
8. Rawls JF, Samuel BS, Gordon JI. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(13):4596-4601.
9. Cantas L, Roger J, Sørby J, Alestrom P, Sørum H. Culturable gut microbiota diversity in zebrafish. *Zebrafish* 2012; 9(1):26-37.
10. Kekkonen RA, Sysi-Aho M, Seppänen-Laakso T, Julkunen I, Vapaatalo H, Oresic M et al. Effect of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG intervention on global serum lipidomic profiles in healthy adults. *World J Gastroenterol* 2008; 14(20):3188-3194.

11. Elmadfa I, Klein P, Meyer AL. Immune-stimulating effects of lactic acid bacteria in vivo and in vitro. *Proc Nutr Soc* 2010; 69(3):416-420.
12. Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J Nutr* 2005; 135(7):1752-1756.
13. Carnevali O, Avella MA, Gioacchini G. Effects of probiotic administration on zebrafish development and reproduction. *Gen Comp Endocrinol* 2013; 188:297-302.
14. Avella MA, Place A, Du SJ, Williams E, Silvi S, Zohar Y, Carnevali O. *Lactobacillus rhamnosus* accelerates zebrafish backbone calcification and gonadal differentiation through effects on the GnRH and IGF systems. *PLoS One* 2012; 7(9):e45572.
15. Wilson JM, Bunte RM, Carty AJ. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2009; 48(6):785-789.
16. Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 67(4):773-782.
17. Meurer F, Hayashi C, Boscolo WR. Apparent Digestibility of Some Protein Sources for Nile Tilapia. *Rev Bras Zootec* 2003; 32(6):1801-1809.
18. Her GM, Hsu CC, Hong JR, Lai CY, Hsu MC, Pang HW, Chan SK, Pai WY. Overexpression of gankyrin induces liver steatosis in zebrafish (*Danio rerio*). *Biochim Biophys Acta* 2011(9):536-48.
19. Sadler KC, Amsterdam A, Soroka C, Boyer J, Hopkins N. Genetic screen in zebrafish identifies the mutants *vps18*, *nf2* and *foie gras* as models of liver disease. *Development* 2005; 132:3561-3572.
20. Pedroso GL, Hammes TO, Escobar TD, Fracasso LB, Forgiarini LF, da Silveira TR. *J Vis Exp* 2012; (63): e3865.

21. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226(1):497–509.
22. de Assis AM, Rech A, Longoni A, Rotta LN, Denardin CC, Pasquali MA, Souza DO, Perry ML, Moreira JC.  $\Omega$ 3-Polyunsaturated fatty acids prevent lipoperoxidation, modulate antioxidant enzymes, and reduce lipid content but do not alter glycogen metabolism in the livers of diabetic rats fed on a high fat thermolyzed diet. *Mol Cell Biochem* 2012; 361(1-2):151-60.
23. Sozio M, Crabb DW. Alcohol and lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295(1):E10-6.
24. Bull-Otterson L, Feng W, Kirpich I, Wang Y, Qin X, Liu Y, Gobejishvili L, Joshi-Barve S, Ayvaz T, Petrosino J, Kong M, Barker D, McClain C, Barve S. Metagenomic analyses of alcohol induced pathogenic alterations in the intestinal microbiome and the effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment. *PLoS One* 2013; 8(1): e53028.
25. Gorbach SL. Probiotics and gastrointestinal health. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(1):2-4.
26. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361(9356):512-519.
27. Iannitti T, Palmieri B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clin Nutr* 2010; 29(6):701-725.
28. Lorent K, Yeo SY, Oda T, Chandrasekharappa S, Chitnis A, Matthews RP, Pack M. Inhibition of Jagged-mediated Notch signaling disrupts zebrafish biliary development and generates multi-organ defects compatible with an Alagille syndrome phenocopy. *Development* 2004; 131(22):5753-66.
29. Baraona E, Lieber CS. Effects of ethanol on liver metabolism. *J Lip Res* 1979; 20:289-315.

30. Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfe MJ. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ* 1999; 319 (7224):1523-8.
31. Aung LH, Yin RX, Wu DF, Cao XL, Hu XJ, Miao L. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 gene E670G polymorphism interacts with alcohol consumption to modulate serum lipid levels. *Int J Med Sci* 2013; 10(2):124-32.
32. Wakabayashi I. Associations of alcohol drinking and cigarette smoking with serum lipid levels in healthy middle-aged men. *Alcohol & Alcoholism* 2008; 43 (3): 274–280.
33. Kumar M, Rakesh S, Nagpal R, Hemalatha R, Ramakrishna A, Sudarshan V, Ramagoni R, Shujauddin M, Verma V, Kumar A, Tiwari A, Singh B, Kumar R. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and Aloe vera gel improve lipid profiles in hypercholesterolemic rats. *Nutrition* 2013; 29(3):574-9.
34. Pavlović N, Stankov K, Mikov M. Probiotics-Interactions with Bile Acids and Impact on Cholesterol Metabolism. *Appl Biochem Biotechnol* 2012; 168:1880–1895.
35. Ooi LG, Liong MT. Cholesterol-Lowering Effects of Probiotics and Prebiotics: A Review of in Vivo and in Vitro Findings. *Int J Mol Sci* 2010; 11:2499-2522.
36. Pereira DI, Gibson GR. Effects of Consumption of Probiotics and Prebiotics on Serum Lipid Levels in Humans. *Crit Rev Biochem and Mol Biol* 2002; 37(4):259–281.
37. Wang Y, Kirpich I, Liu Y, Ma Z, Barve S, McClain CJ, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment potentiates intestinal hypoxia-inducible factor, promotes intestinal integrity and ameliorates alcohol-induced liver injury. *Am J Pathol* 2011;179:2866–2875.
38. Ritze Y, Bardos G, Claus A, Ehrmann V, Bergheim I, Schwiertz A, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice. *PLoS One* 2014;9:e80169.

39. Nikoskelainen S, Ouwehand AC, Bylund G, Salminen S, Lilius E. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol* 2003; 15: 443–452.
40. Panigrahi A, Kiron V, Satoh S, Hirono I, Kobayashi T, Sugita H, et al. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Dev Comp Immunol* 2007; 31:372–382.
41. Pirarat N, Pinpimai K, Endo M, Katagiri T, Ponpornpisit A, Chansue N, et al. Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Res Vet Sci* 2011;91: e92–e97.
42. Gioacchini G, Giorgini E, Olivotto I, Maradonna F, Merrifield DL, Carnevali O. The influence of probiotics on zebrafish *Danio rerio* innate immunity and hepatic stress. *Zebrafish* 2014;11:98–106.
43. Nosova T, Jousimies-Somer H, Jokelainen K, Heine R, Salaspuro M. Acetaldehyde production and metabolism by human indigenous and probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Alcohol Alcohol* 2000;35:561–568

**14-CAPITULO III - ARTIGO III**

Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on the  
Behaviour of Zebrafish with Chronic Ethanol Exposure

TITLE: *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* GG EFFECT ON BEHAVIOUR OF ZEBRAFISH DURING CHRONIC ETHANOL EXPOSURE.

RUNNING TITLE: LGG DURING CHRONIC ETHANOL EXPOSURE

Authors:

**Ana Claudia Reis Schneider, MSc (Corresponding author)**

Affiliation: Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Mail: schneiderac@gmail.com

Address: Rua Ramiro Barcellos, 2350 - Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental - HCPA. Porto Alegre, RS, CEP: 90.035-903, Brazil.

Phone: 55 51 3359 8847; fax: 55 51 3359 8760

**Eduardo Pacheco Rico, PhD**

Affiliation: Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC

Mail: eduprico@gmail.com

Address: Av. Universitária, 1105, Bairro Universitário, Criciúma, SC, CEP: 88806-000, Brazil.

Phone: 55 48 3431 2539

**Diogo Losch de Oliveira, PhD**

Affiliation: Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS.

Mail: diogolosch@gmail.com

Address: Rua Ramiro Barcellos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, CEP: 90035-003, Brazil.

Phone: 55 51 3316 5557; fax: 55 51 3316 5540

**Denis Broock Rosemberg, PhD**

Affiliation: Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - Universidade Federal de Santa Maria.

Mail: dbrosemberg@gmail.com



Address: Avenida Roraima, 1000, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brazil.

**Ranieli Guizzo**

Affiliation: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Mail: [ranielig@hotmail.com](mailto:ranielig@hotmail.com)

Address: Rua Sarmento Leite, 245 - Porto Alegre, RS - CEP 90050-170, Brazil.

**Fábio Meurer, Sc.D.**

Affiliation: Curso Superior de Tecnologia em Aquicultura – Universidade Federal do Paraná (UFPR), Campus Jandaia do Sul.

Mail: [fabioimeurer@ufpr.br](mailto:fabioimeurer@ufpr.br)

Address: R. Dr. João Maximiano 426, Jandaia do Sul, Paraná, CEP: 86900-000, Brazil

Phone: 41 32086192.

**Themis Reverbel da Silveira , PhD**

Affiliation: Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Mail: [themis.silveira@gmail.com](mailto:themis.silveira@gmail.com)

Address: Rua Ramiro Barcellos, 2350 - Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental - HCPA. Porto Alegre, RS, CEP: 90035-903, Brazil.

Phone: 55 51 3359 8847; fax: 55 51 3359 8760

## ABSTRACT

Ethanol is a widely consumed drug which acts on the central nervous system (CNS) to induce behavioural alterations ranging from disinhibition to sedation. Recent studies have produced accumulating evidence for the therapeutic role of probiotic bacteria in behaviour. We aimed to investigate the effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) on the behaviour of adult zebrafish chronically exposed to ethanol. Adult, wild-type zebrafish were randomly divided into four groups, each containing 15 fish. The following groups were formed: Control (C), received unsupplemented feed during the trial period; Probiotic (P), fed with feed supplemented with LGG; Ethanol (E), received unsupplemented feed and 0.5% of ethanol directly added to the tank water; Probiotic + Ethanol (P+E), group under ethanol exposure (0.5%) and fed with LGG supplemented feed. After 2 weeks of exposure, the novel tank test was used to evaluate fish behaviour, which was analysed using computer-aided video-tracking. LGG alone did not alter swimming behaviour of the fish. Ethanol exposure led to robust behavioural effects in the form of reduced anxiety levels, as indicated by increased vertical exploration and more time spent in the upper region of the novel tank. The group exposed to ethanol and treated with LGG behaved similarly to animals exposed to ethanol alone. Taken together, these results show that zebrafish behaviour was not altered by LGG *per se*, as seen in murine models.

Key-words: Behaviour; Ethanol; *Lactobacillus rhamnosus* GG; Zebrafish; Probiotic; Novel Tank test

## INTRODUCTION

Alcohol dependence is a chronic and progressive disorder which affects thousands of people around the world and may cause several physical, mental and social impairments.<sup>1,2</sup> Currently, we have a clear understanding of the effects of ethanol on the brain, and consequently, on behaviour. The neurochemical alterations caused by the presence of ethanol in specific brain regions may also have indirect effects on several neurotransmitter/neuropeptide systems, leading to the behavioural alterations typically seen in ethanol dependence, which range from disinhibition to sedation and hypnosis, depending on the amount of ethanol consumed.<sup>3</sup>

Recent studies have reported that intestinal microorganisms may have significant effects on the central nervous system and on behaviour.<sup>4,5</sup> The brain-gut axis consists of a bidirectional communication system which transmits information regarding homeostasis through neural, hormonal and immunological pathways. Dysfunctions in this system can have severe physiopathological consequences.<sup>6</sup> Studies regarding to the role of microbiology in behavioural responses to stress, anxiety and depression have shown the importance of probiotic products for these processes.<sup>7,8,9</sup> Several types of bacteria have been known to synthesize neurotransmitters and neuromodulators. Examples include *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp., which produce gamma-aminobutyric acid (GABA), *Escherichia* spp., *Bacillus* spp. and *Saccharomyces* spp., which synthesize noradrenaline, *Candida* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia* spp. and *Enterococcus* spp., which produce serotonin, *Bacillus* spp. which has been found to produce dopamine, and *Lactobacillus* spp., which secretes acetylcholine.<sup>5</sup> Chronic alcohol consumption has been known to alter the equilibrium of intestinal microbiota, leading to an increase in pathogenic bacteria and intestinal permeability and, consequently, to dysbiosis and endotoxemia.<sup>10</sup>

Much of our knowledge regarding the bidirectional communication between the nervous system and intestinal microorganisms has been produced by studies of

pathogenic organisms. However, a growing number of investigations have also suggested that there may be communication between the nervous system and commensal enteric microorganisms including, probiotic bacteria.<sup>9-11</sup>

No previous studies in the literature have evaluated the behavioural effects of LGG on animals exposed to ethanol. Zebrafish have been successfully used in several studies of behavioural alterations induced by acute and chronic exposure to ethanol, serving as a promising model for translational research into ethanol use.<sup>12,13,14,15,16</sup> The goal of the present study was to evaluate the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) on the behaviour of zebrafish chronically exposed to ethanol.

## MATERIALS AND METHODS

### **Animals and diet**

Sixty adult wild-type (short-fin) zebrafish (*Danio rerio*) of both genders were purchased in a pet shop (Delphis, RS, Brazil). Animals were kept in a light:dark cycle of 14:10 h and maintained at a temperature of 28±2°C. All fish were disease-free. After acclimation period, animals were randomly assigned to one of four groups: Control (C, n=15), Probiotic (P, n=15), Ethanol (E, n=15) and Probiotic+Ethanol (P+E, n=15). Fish were fed one of the following diets: a) Probiotic-free diet - Control (C) and ethanol (E) groups; b) Feed supplemented with *Lactobacillus rhamnosus* GG (CULTURELLE® Amerifit, Cromwell, USA) - Probiotic (P) and Probiotic+Ethanol (P+E) groups. Both diets had a similar nutritional composition (Table 1). The viability of the LGG in the supplemented diet was determined by the standard plate-counting method in MRS (Difco, Sparks, USA), a selective medium for lactic acid bacteria. The phenotypic characterization of these colonies was consistent with that of positive controls consisting of pure LGG. The microbiological analysis of the non-supplemented feed showed that it was free of Lactobacilli. Fish were fed twice a day (morning and afternoon) until satiety.

Table 1: Nutritional composition of the feed:

Ingredients	Contents (%)
Soybean meal	59.4
Corn	31.1
Fish meal	5.0
Dicalcium phosphate	2.6
Soy oil	0.4
Limestone	0.3
Mineral and vitamin mix <sup>1</sup>	0.5
Salt	0.5

<sup>1</sup> Vit. A, 1,200,000 IU; Vit. D3, 200,000 UI; Vit. E, 12,000 mg; Vit. K3, 2,400 mg; Vit. B1, 4,800 mg; Vit. B2, 4,800 mg; Vit. B6, 4,000 mg; Vit. B12, 4,800 mg; Folic acid, 1,200 mg; Calcium pantothenate, 12,000 mg; Vit. C, 48,000 mg; Biotin, 48 mg; Choline, 65,000 mg; Niacin, 24,000 mg; Iron, 10,000 mg; Copper, 6,000 mg; Manganese, 4,000 mg; Zinc, 6,000 mg; Iodine, 20 mg; Cobalt, 2 mg; Selenium, 20 mg.

Animals in the E and P+E groups were exposed to ethanol at a concentration of 0.5% (vol/vol) (MERCK® P.A, Darmstadt, Germany), added directly into the tank water of the fish. To ensure the stability of the ethanol concentration, the water of the tanks were changed every two days.<sup>17</sup> Same procedures were performed to C and P groups, save for the addition of ethanol to the water. Each tank (C, E, P and P+E) contained 2 litres of water and five animals each, for a total of 15 animals per group. Behavioural tests were performed after the 14th day of treatment.

Microbiological tests were performed to assess colonization by LGG in fish exposed and non-exposed to ethanol. After the tests, the fish were euthanized by hypothermal shock and the intestines of 5 animals per group were entirely removed and aseptically transferred to sterile micro tubes with 0.5 ml of PBS, where they were macerated in order to prevent contact with the environment. The homogenates (20 $\mu$ l) were inoculated in plates with Lactobacilli MRS Agar (Difco™, USA) and incubated at 37°C for two days in microaerophilic atmosphere. Samples of the tank water (20 $\mu$ l) were also collected at three different points of the tanks for microbial analyses eighteen hours after the last feeding.

All procedures were performed according to Brazilian legislation (Law 11.794, issued on October 8th, 2008) on animal experimentation, and to resolution n°. 04/97 of

the present institution, which also concerns animal research. The present study was approved by the Research Ethics Committee of the Clinical Hospital of Porto Alegre (10.0327).

### **Behavioural tests**

The effects of diet on fish behaviour were measured using a protocol adapted from Rosemberg and colleagues.<sup>14</sup> Tests were performed in the novel tank, in a noise- and disturbance-free environment. After the trial period, each fish was individually removed from home tank and carefully placed in the novel tank. The water in the *latter* was kept at the same temperature of the home tank ( $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), however, without addition of the ethanol. The behaviour of each animal was assessed in a 6-minute session.<sup>14</sup> The behavioural apparatus consisted of a trapezoidal tank (23.9cm depth, 28.9cm width and 15.1cm height) containing 1.5 litres of water and divided into three horizontal portions (lower, middle and upper), and a camera (Microsoft Life Cam 1.1, with autofocus) connected to a computer running the software used to record animal locations and movements (ANY-maze, Stoelting Company, USA).

All precautions were taken to ensure representative results and prevent stress to the fish. Experimental procedures were similar for all animals and behavioural tests were always performed in the same room, to ensure similar environment and lighting across all trials. After each test, the water in the novel tank was changed. Fish behaviour was examined by measuring the following variables: total distance travelled (m), mean speed (m/s) and time mobile (s). The number of transitions between areas and the time spent in each location (lower, middle and upper thirds) were also recorded.

### **STATISTICAL ANALYSIS**

Behavioural data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. The number of transitions between areas in the tank and the total swimming time (time mobile) were analysed using a two-way ANOVA. Analyses were performed using the GraphPad Prism software, version 6.0 for Windows, (GraphPad Software, California, USA). Results were considered significant at  $p \leq 0.05$ .

## RESULTS

### **Microbiological analyses**

The incubated plates of the intestinal samples from the groups P and P+E showed growth of LGG colonies, indicating that the ethanol did not avoid the colonization of the zebrafish intestines exposed to 0.5% of ethanol concentration. The phenotypic characterization of the colonies cultured in plates of both groups was compatible with the colonies obtained from the positive control: white, creamy and large colonies. The analyses of the tank water from P and PE groups showed the presence of LGG colonies in the water.

### **Total distance travelled, mean velocity and total swimming time**

The variables - total distance travelled (A) mean speed (B) and time mobile (Figure 1) - showed no interactions between the ethanol exposure and the LGG treatment ( $F(1,56) = 0.1605$ ;  $p = 0.69$ ;  $F(1,56) = 1.550$ ;  $p = 0.69$ , and  $F(1,56) = 0.7317$ ;  $p = 0.39$ , respectively). Time mobile test was influenced by ethanol exposure ( $F(1,56) = 4.949$ ;  $p = 0.03$ ). Neither ethanol nor probiotic exposure led to sedation or toxicity.

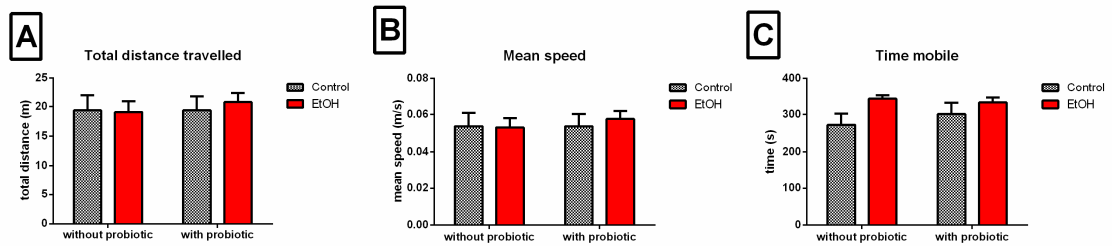


Fig. 1: Evaluation of the locomotor activity parameters in the novel tank test: total distance travelled (A) and mean speed (B) and time mobile did not significantly differ between experimental groups. Statistical analysis was performed by Two-way ANOVA followed by Tukey as *post hoc* test;  $n=15$  animals/group. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM, and  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

### Effects of Ethanol Exposure

The swimming patterns of fish exposed to ethanol were significantly different from those observed in the remaining groups. In most tests, the exploratory behaviour observed in animals exposed to ethanol was distinct from that recorded in the control and probiotic group. No interactions were observed between ethanol and probiotic exposure.

Animals of E group spent less time in the bottom portion of the tank than control fish (Figure 2, B;  $F(1, 56) = 12.33$ ;  $p=0.009$ ). Ethanol exposure was found to have a main effect on this variable, although it had no impact on the distance travelled in the bottom of the tank (Figure 2, C). E group differed from group C in all variables used to describe behaviour in the middle portion of the tank (transitions:  $F(1,56) = 11.0$ ;  $p = 0.001$ ; time spent in area:  $F(1,56) = 10.87$ ;  $p = 0.001$ ; distance travelled:  $F(1,56) = 8.54$ ;  $p < 0.005$ ). These results are presented in Figure 2 (D,E,F).



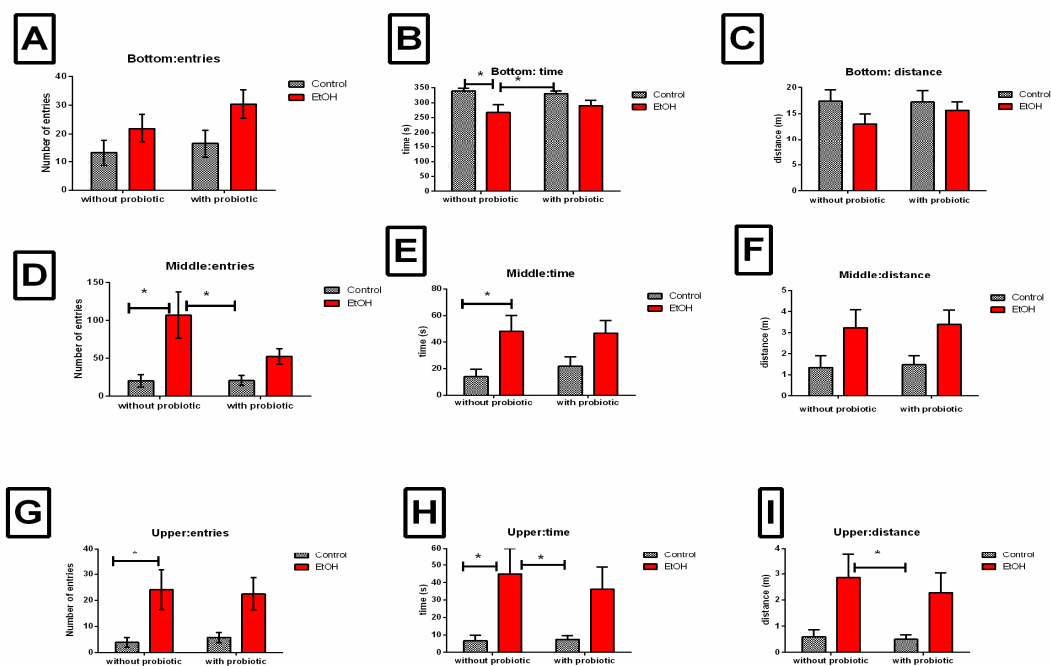


Fig. 2: Exploratory activity of zebrafish in the novel tank test: Ethanol caused the main effect in fish behaviour related to the number of entries in each area (A, D, G); time spent in each area (B, E, H) and distance travelled (F, I). Animals exposed to ethanol explored the upper level of the tank significantly more than the non-exposed groups, and spent more time in this zone of the tank. No differences were observed for the treatment with probiotic. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM, and  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant. Asterisks indicate significance compared to control group. Statistical analysis was performed by Two-way ANOVA followed by Tukey as *post hoc* test;  $n=15$ /group.

The analysis of swimming behaviour in the upper portion of the tank revealed that animals exposed to ethanol spent more time in this location, and that ethanol exposure was the only influence on the number of transitions ( $F(1, 56) = 12.66$ ;  $p = 0.0008$ ), time spent ( $F(1, 56) = 11.23$ ;  $p = 0.001$ ), and distance travelled in the upper level of the tank ( $F(1, 56) = 11.09$ ;  $p = 0.001$ ). These results are presented in Figure 2 (G, H, I).

Group P+E behaved similarly to group E, save for the number of transitions to the bottom portion of the tank ( $p = 0.01$ ; Fig.2 A). The probiotic diet had no effect on animals in group P, who behaved similarly to control animals in all tests performed. No interactions were observed between the probiotic diet and ethanol exposure, and only

the latter appeared to have an impact on fish behaviour. During the study period, no death or disease were observed in animals treated with LGG.

## DISCUSSION

Fear and anxiety are both evident in the behavioural reactions of animals which are exposed to a new setting or situation which may have an impact on their well-being, physical integrity or survival. Although many different experimental protocols have been used to assess anxiety in fish, the novel tank test is one of the most popular methods to evaluate this variable.<sup>14-18,19,20</sup> In this procedure, anxiety is defined as reduced environmental exploration and fewer transitions between areas in the tank.<sup>18-20,21</sup> When animals are placed in new environments, they initially swim in a vertical direction, exploring the upper areas of the tank. This behaviour is associated with adaptation to the new setting. Greater vertical swimming, assessed by the time spent in the upper levels of the tank and the number of transitions to this location, are considered indicative of lower anxiety levels.<sup>18-22</sup>

Our results showed that ethanol exposure induces a significant change in behavioural indicators of anxiety in zebrafish. The statistically significant findings obtained (FIG 2 B,D,E,F,G,H, I) demonstrated that animals exposed to ethanol were less anxious when exploring a new environment than control animals. Similar results were related by Cachat, Wong and Egan, despite the differences in experimental time and concentrations of ethanol exposure (0.2% to 0.5%), indicating that even lower doses of ethanol may lead to behavioural alterations detectable by the novel tank test.<sup>19,20,21</sup>

We hypothesized that treatment with LGG could attenuate the behavioural effects of chronic alcohol exposure in zebrafish. Ethanol acted as an anxiolytic agent in group E, although no further behavioural alterations were observed in animals who

received the probiotic LGG in addition to ethanol (P+E). As can be observed in Figure 2 (B,C,D,E, F, J, H and I) the behaviour of animals of P+E group was similar to that exposed to E alone, although it did not differ significantly from that of the control group. This finding may be explained by the presence of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in lactobacilli.<sup>23</sup> Acetaldehyde is the first product of ethanol oxidation in the body and affects the activity of several neurotransmitters, consequently, can contribute to the behavioural alterations associated with ethanol intake.<sup>24,25</sup> Two different studies have shown that lactobacilli upregulate the activity of alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH), increasing ethanol oxidation by bacterial dehydrogenases.<sup>26,27</sup> The resulting acetaldehyde is oxidized by ALDH into acetate, decreasing ethanol concentrations in the blood. The absence of behavioural differences between animals in groups P+E and C maybe could be explained by a decrease of blood concentration of ethanol.

## CONCLUSIONS

In the present study, fish fed with a probiotic diet did not show any behavioural alterations. The anxiolytic effects of ethanol were not significantly altered by LGG intake.

**ACKNOWLEDGMENTS:** FIPE – HCPA (Research Incentive Fund – Hospital de Clínicas de Porto Alegre) and CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development).

**Financial Disclosures:** The authors have nothing to declare.

## References

- 1 Gramenzi A, Caputo F, Biselli M, et al. Review article: alcoholic liver disease - pathophysiological aspects and risk factors. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24(8):1151- 1161.

2 Gunzerath L, Faden V, Zakhari S, et al. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism report on moderate drinking. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28(6):829-847.

3 Spanagel R. Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev* 2009; 89: 649 –705.

4 Cryan JF, O'Mahony SM. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motil* 2011; 23(3):187-192.

5 Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13(10):701-712.

6 Rhee SA, Pothoulakis C, Mayer EA . Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6(5): 306-314.

7 Arseneault-Bréard J, Rondeau I, Gilbert K, et al. Combination of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model. *Br J Nutr* 2012; 107(12):1793-1799.

8 Bravo JA, Julio-Pieper M, Forsythe P, et al. Communication between gastrointestinal bacteria and the nervous system. *Curr Opin Pharmacol.* 2012; 12(6):667-72.

9 Messaoudi M, Lalonde R, Violle N, et al. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R 0052 and *Bifidobacterium longum* R 0175) in rats and human subjects. *Br J Nutri* 2011; 105:755–764.

10 Keshavarzian A, Fahradi A, Forsyth CB, et al. Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *J Hepatol* 2009; 50(3): 538–547.

11 Rao AV, Basted AC, Beaulne TM, Katzman et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. *Gut Pathog* 2009; 1(1):6.

12 Gerlai R, Lahav M, Guo S, et al. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 67(4), 773-782.

13 Gerlai R, Lee V, Blaser R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 85(4):752-761.

14 Rosemberg DB, Braga MM, Rico EP, et al. Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol. *Neuropharmacology* 2012; 63(4), 613-623.

15 Rico EP, Rosemberg DB, Dias RD, et al. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicol Lett* 2007; 174:25-30.

16 Rico EP, Rosemberg DB, Langoni ADS, et al. Chronic ethanol treatment alters purine nucleotide hydrolysis and nucleotidase gene expression pattern in zebrafish brain. *Neurotoxicology* 2011; 32(6): 871-878.

- 17 Schneider ACR, Machado ABMP, de Assis AM, et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on Hepatic and Serum Lipid Profiles in Zebrafish Exposed to Ethanol. *Zebrafish* 2014; 11(4):371-378.
- 18 Stewart A, Gaikwad S, Kyzar E, et al. Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. *Neuropharmacology* 2012; 62(1): 135-143.
- 19 Cachat J, Stewart A, Grossman L, et al. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat Protoc* 2010; 5(11): 1786-1799.
- 20 Wong K, Elegante M, Bartels B, et al. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res* 2010; 208(2): 450-457.
- 21 Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res* 2009; 205(1): 38-44.
- 22 Mathur P, Guo S. Differences of acute versus chronic ethanol exposure on anxiety-like behavioral responses in zebrafish. *Behav Brain Res* 2011; 219(2): 234-239.
- 23 Nosova T, Jousimies-Somer H, Jokelainen K, et al. Acetaldehyde production and metabolism by indigenous and probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Alcohol Alcohol* 2000; 35:561–568.
- 24 Zenki KC, Mussulini BH, Rico EP, et al. Effects of ethanol and acetaldehyde in zebrafish brain structures: An in vitro approach on glutamate uptake and on toxicity-related parameters. *Toxicol in Vitro* 2014; 28(5):822-828.

25 Rico EP, Rosemberg DB, Senger MR, et al. Ethanol and acetaldehyde alter NTPDase and 5'-nucleotidase from zebrafish brain membranes. *Neurochem Int* 2008; 52(1-2):290-296.

26 Park JH, Kim Y, Kim SH. Green tea extract (*Camellia sinensis*) fermented by *Lactobacillus fermentum* attenuates alcohol-induced liver damage. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; 76(12):2294-2300.

27 Qing L, Wang T. Lactic acid bacteria prevent alcohol-induced steatohepatitis in rats by acting on the pathways of alcohol metabolism. *Clin Exp Med* 2008; 8(4):187-191.

## 15- CONCLUSÕES

Os objetivos desta tese foram estudar os efeitos do etanol no fígado do *zebrafish*, assim como avaliar um possível tratamento com o probiótico LGG. Verificamos que o etanol causou efeitos danosos ao fígado e o LGG pode reverter quase completamente a esteatose hepática.

1. As análises histológicas mostraram a presença de esteatose e importantes alterações ultraestruturais no fígado do *zebrafish*, após quatro semanas de exposição ao etanol. A coloração *Oil Red* revelou a presença de intensa esteatose e as análises ultraestruturais revelaram o aparente desaparecimento da compartimentalização citoplasmática, aumento no número de cisternas do RER, presença de grande quantidade de glicogênio associado a inúmeras gotículas lipídicas, sinais de degeneração dos ductos biliares, figuras de mielina presentes no interior dos canaliculos biliares e nucléolos proeminentes. O estudo morfométrico revelou o aumento de 14,8 vezes entre a distância internuclear das células hepáticas dos animais expostos ao etanol comparado ao resultado verificado nos animais controle. Este aumento volumétrico da célula hepática ocorreu após a quarta semana de exposição ao etanol, coincidindo com o agravamento da esteatose.

2. Ao avaliarmos o efeito do etanol na expressão dos genes relacionados com inflamação, na quarta semana foi observado um aumento significativo da *il-1b*, indicando um processo inflamatório durante a intensificação da esteatose. O *tnf-α* estava significativamente diminuído na segunda semana, no entanto houve elevação de sua expressão entre a segunda e a quarta semana, porém sem alcançar significância estatística com o grupo controle. A diminuição inicial do *tnf-α* pode



estar relacionada com a resistência do zebrafish aos LPS. Foi observado um aumento significativo da expressão de *sirt1* entre a segunda e a quarta semana. Não foi detectada expressão hepática da *adiponectina*, mas sim do seu receptor (*adipor2*). A *adipor2* está relacionada com proteção hepática e parece apresentar sinergismo com a *sirt1*. A *il-10* não apresentou diferença significativa entre os grupos.

3. A colonização pelo LGG no intestino do *zebrafish*, em animais expostos e não expostos ao etanol, foi confirmada por meio de testes microbiológicos, moleculares e pelo método MALDI-TOF.

4. Em relação ao efeito do etanol nos níveis de triglicerídeos séricos, na quarta semana, houve uma redução significativa nos animais expostos ao etanol (E) e nos expostos ao etanol e tratados com o probiótico (P+E). Neste caso pareceu haver uma ação exclusiva do etanol na redução dos níveis de triglicerídeos séricos. Os níveis séricos de colesterol não foram afetados pelo etanol em nenhum dos períodos avaliados. Em relação ao LGG, houve uma importante redução nos níveis de colesterol sérico nos animais tratados (P e P+E), tanto na segunda como na quarta semana. As dosagens de colesterol e triglicerídeos no tecido hepático mostraram que na quarta semana houve um aumento importante de triglicerídeos nos animais expostos ao etanol (E). Os animais do grupo exposto ao etanol e tratado com o LGG (P+E) apresentaram uma diminuição significativa dos triglicerídeos hepáticos quando comparados aos animais do grupo E. Não foi verificado qualquer efeito do etanol ou do LGG em relação ao colesterol hepático. Em resumo, o etanol causou redução dos níveis de triglicerídeos séricos e aumento da concentração de triglicerídeos hepáticos, causando esteatose. Por sua vez, o tratamento com o LGG

reduziu os níveis de colesterol sérico e a concentração de triglicérides hepáticos, reduzindo de maneira considerável a esteatose nos animais expostos ao etanol.

5. Os testes comportamentais não evidenciaram um efeito significativo do tratamento com o LGG nos animais. O etanol *per se* determinou a diminuição da ansiedade nos animais, manifestada nos testes por maior exploração das áreas superiores do tanque.

## 16 - CONSIDERAÇÕES GERAIS/PESPECTIVAS

O objetivo principal desta tese foi estudar os efeitos do etanol no fígado do *zebrafish* adulto e avaliar o uso terapêutico do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG na DHA. Após a construção do modelo de esteatose, investigamos genes ligados à inflamação no tecido hepático e, a seguir, avaliamos o efeito do LGG no fígado dos animais submetidos ao etanol. Em um terceiro estágio verificamos o efeito do LGG no comportamento dos animais submetidos cronicamente ao etanol.

No primeiro estudo, intitulado – *Chronic exposure to ethanol causes steatosis, inflammation and ultrastructural abnormalities in zebrafish liver* – foi verificado que após duas semanas de exposição ao etanol, o fígado do *zebrafish* apresentou uma leve esteatose, que se intensificou em quatro semanas, porém sem sinais de infiltrados inflamatórios e de fibrose hepática à microscopia ótica. Os mecanismos relacionados com o desenvolvimento da esteatose hepática têm sido investigados em larvas de *zebrafish*, através da exposição contínua (32 horas), na concentração de 2% de etanol. Os animais, em estado larval, apresentaram hepatomegalia, esteatose e mudanças na expressão de genes hepáticos associados à lipogênese (PASSERI *et al.*, 2009; HOWARTH *et al.*, 2012; TSEDENSODNOM *et al.*, 2013; HOWARTH *et al.*, 2014). No presente estudo os efeitos do etanol foram avaliados em exposição crônica (quatro semanas), em animais adultos, numa concentração de 0,5% de etanol. A presença de esteatose foi verificada em 100% dos animais expostos ao etanol, independentemente do sexo.

Alterações ultraestruturais hepáticas foram observadas em larvas de *zebrafish* após exposição aguda ao etanol, destacando-se o alargamento do retículo

endoplasmático liso (HOWARTH *et al.*, 2012) e anormalidades nos canaliculos biliares (HOWARTH *et al.*, 2013). No presente estudo, com exposição crônica ao etanol, as análises ultraestruturais revelaram diversas alterações, destacando-se: aumento do número de cisternas do retículo endoplasmático rugoso; presença de grande quantidade de glicogênio associado a inúmeras gotículas lipídicas; desaparecimento da compartimentalização citoplasmática; presença de células de Ito com sinais de ativação, demonstrada por alterações visíveis do citoesqueleto; e degeneração de canaliculos biliares, com presença de figuras de mielina no seu interior. Os achados obtidos são semelhantes aos vistos em camundongos expostos cronicamente ao etanol e em seres humanos alcoolistas (LANE & LIEBER, 1966; DE CRAEMER *et al.*, 1995; SANTOS & ROCHA, 2012). Em nosso estudo, células de Ito, com sugestivos sinais de ativação, foram observadas nos animais expostos ao etanol (Anexo II). Estas células foram recentemente identificadas no *zebrafish* por Yin e colaboradores que demonstraram que, tal como nos seres humanos, a exposição ao etanol ativa células estreladas no *zebrafish* (YIN *et al.*, 2012). A presença exarcebada de lipídios e de glicogênio observada no citoplasma está relacionada com desregulações do metabolismo celular energético devido ao excesso de etanol (BECHMANN *et al.*, 2012). No retículo endoplasmático, organela responsável pela síntese, modificação e dobramento de proteínas, sinalização de cálcio e síntese de lipídios, o etanol produz alterações morfológicas e estresse, causando danos citotóxicos, inflamação e diminuição da síntese de DNA (TONG *et al.*, 2014). A presença de figuras de mielina indica um processo de degeneração celular, possivelmente, relacionado à citotoxicidade do etanol. Portanto, todas as anormalidades vistas em nosso estudo mostram o resultado de um processo crônico de dano celular. Apesar de citadas na literatura, anomalias mitocondriais não foram observadas neste estudo.

Acompanhando as alterações histológicas, houve modificações na expressão dos genes *il-1b*, *tnf- $\alpha$* , *sirt1* e *adipor2*. Em mamíferos, a exposição crônica ao etanol ativa a imunidade inata e a produção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a patogênese da lesão hepática (GAO, 2012). A ativação da imunidade inata também estimula a produção de citocinas hepatoprotetoras e anti-inflamatórias, que desempenham um papel compensatório contra a lesão hepática e a inflamação (GAO, 2012). Neste estudo, no grupo etanol, houve aumento significativo da expressão hepática de *il-1b*, *sirt1* e do *adipor2*, indicando o desencadeamento tanto de respostas inflamatórias como de proteção hepática. Foi avaliada também a expressão hepática de *il-10* e de *adiponectina*. A *il-10* não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados e a adiponectina não foi detectada no tecido hepático.

Surpreendentemente, na segunda semana, a expressão de *tnf- $\alpha$*  estava diminuída no grupo etanol em comparação ao controle, porém ocorreu um aumento expressivo entre a segunda e a quarta semana, período em que o *tnf- $\alpha$*  alcançou os níveis do controle. Em modelos de esteatose hepática não alcoólica no *zebrafish* foram observados o aumento da expressão hepática de *tnf- $\alpha$*  (HAMMES *et al.*, 2012; SAPP *et al.*, 2014). Esperava-se encontrar o mesmo resultado em relação ao etanol, e como não foram encontrados na literatura estudos sobre o efeito do etanol na expressão hepática do *tnf- $\alpha$*  no *zebrafish*, a diminuição inicial de *tnf- $\alpha$*  é difícil de explicar. Estudos com o modelo murino mostraram que a endotoxemia desempenha um papel importante no agravamento da DHA devido à indução de citocinas pró-inflamatórias (WANG *et al.*, 2015), no entanto, Sepulcre e colaboradores observaram que a sensibilidade do *zebrafish* às endotoxinas é mais baixa do que em mamíferos (SEPULCRE *et al.*, 2010). Mais recentemente, Meng e colaboradores demonstraram que receptores *scavenger*

desempenham um papel inibidor na inflamação provocada por LPS no *zebrafish*, por inibição da via inflamatória do *tnf- $\alpha$*  (MENG *et al.*, 2012). Talvez a diminuição inicial do *tnf- $\alpha$*  neste modelo, tenha ocorrido a fim de evitar ou aliviar a inflamação.

Foi observado em nosso estudo, o aumento significativo de expressão da *il-1b* na quarta semana, coincidindo com o agravamento da esteatose. Ogryzko e colaboradores relataram que a expressão de *il-1b* pode aumentar rapidamente no *zebrafish* em resposta a uma lesão (OGRYZKO *et al.*, 2014). Petrasek e colaboradores mostraram que a ativação da *IL-1b* durante a esteatose, está associada com a sinalização do inflamassoma e desempenha um papel crítico no desenvolvimento da DHA (PETRASEK *et al.*, 2012).

Sapp e colaboradores, a despeito de não observarem aumento na expressão de genes fibrogênicos, em seu modelo de esteatose induzida por frutose, consideraram que a presença de gotículas lipídicas associadas ao aumento de estresse oxidativo, ativação de vias inflamatórias e alterações do retículo endoplasmático, caracterizariam um modelo de esteato-hepatite (SAPP *et al.*; 2014). Apesar de, em nosso estudo, termos observado a presença importante de infiltrados lipídicos, aumento da expressão de citocinas inflamatórias e anormalidades ultraestruturais nos hepatócitos, podemos afirmar que encontramos somente esteatose. Este conjunto de achados pode apontar para a evolução da esteatose para esteato-hepatite. Lin e colaboradores observaram o curso da DHA no *zebrafish* durante três meses de exposição ao etanol, na concentração de 1% (LIN *et al.*, 2015). A esteatose hepática evoluiu, após oito semanas de exposição alcoólica, para esteato-hepatite. Após doze semanas de exposição, foram observados hepatócitos anaplásicos com núcleos pleomórficos, arranjados em padrões trabeculares e nódulos hepáticos, porém este achado foi encontrado em apenas 1 animal da amostra (LIN *et al.*, 2015).

O interesse em avaliar a expressão hepática da *adiponectina* ocorreu por causa de suas atividades anti-inflamatórias e hepatoprotetoras (YOU & ROGERS, 2009). Amali e colaboradores observaram o aumento da expressão de *adiponectina* no fígado do *zebrafish* tratado com tioacetamida, mas não nos animais controle (AMALI *et al.*, 2006). Em nosso estudo, o mRNA da *adiponectina* não foi detectado nos fígados dos animais do grupo etanol e do grupo controle. Este resultado, talvez, esteja relacionado com uma menor hepatotoxicidade do etanol, na dose utilizada, frente à tioacetamida.

Apesar da ausência de expressão hepática da adiponectina, foi observado o aumento do *receptor 2 de adiponectina (adipor2)* no grupo etanol. Hammes e colaboradores observaram, no *zebrafish*, a diminuição da expressão de *adipor2* e de *sirtuína-1 (sirt1)* em modelo de esteatose hepática não alcoólica, induzida por tioacetamida (HAMMES *et al.*, 2012). Em seres humanos, Kaser observou que em presença de esteato-hepatite não alcoólica, a expressão da *ADIPOR2* estava diminuída em comparação com a esteatose simples (KASER *et al.*, 2005). Outro dado relevante é que parece haver um sinergismo entre o *ADIPOR2* e a *SIRT1* (FEIGE *et al.*, 2008). Em nosso estudo, entre duas e quatro semanas ocorreu um aumento significativo da expressão da *sirt1* nos peixes tratados com etanol. Oliveira e colaboradores também relataram um aumento expressivo de *sirt1* no fígado de *zebrafish* cronicamente exposto ao etanol (0,5%) (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Tanto a diminuição como o aumento de expressão da *SIRT1* já foram observados em animais tratados cronicamente com etanol (LIEBER *et al.*, 2008, OLIVA *et al.*, 2008). Podemos supor que a elevação da expressão de *sirt1* e de *adipor2*, neste modelo, esteja associada com sua atividade hepatoprotetora frente à esteatose.

Em resumo, os nossos dados sugerem que a inflamação desempenha um papel importante na esteatose hepática alcoólica no zebrafish. A exposição crônica ao etanol induziu o acúmulo de lipídios hepáticos, anormalidades ultraestruturais e elevação de expressão da *il-1b*. O aumento de expressão do *adipor2* e da *sirt1* provavelmente indica uma reação anti-inflamatória/hepatoprotetora.

O segundo estudo desta tese deu origem ao artigo "*Effects of Lactobacillus rhamnosus GG on hepatic and serum lipid profiles in zebrafish exposed to ethanol*" publicado na revista Zebrafish em julho de 2014. O efeito do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) foi avaliado durante a exposição crônica ao etanol. O LGG possui atividade imunomoduladora, hipolipemiante e auxilia no fortalecimento da barreira intestinal (BULL-OTTERSON *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2013). Diversos autores relataram, em murinos, a melhora de sintomas da doença hepática gordurosa, alcoólica e não alcoólica, com o uso de probióticos (FORSYTH *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 2013; RITZE *et al.*, 2014; FEROLLA *et al.*, 2015).

A adesão das bactérias probióticas no epitélio intestinal é um pré-requisito essencial para a sua colonização. Na literatura, não foram encontrados modelos de exposição alcoólica associada ao uso de probióticos no *zebrafish*, logo, o primeiro passo foi verificar se o intestino do peixe seria colonizado pelo probiótico em meio com etanol. A persistência do LGG na mucosa intestinal do *zebrafish*, exposto e não exposto e ao etanol, não apresentou diferenças significativas entre os grupos expostos e não expostos na dose utilizada de etanol (0,5% v/v).

Reproduzindo os resultados histológicos observados no primeiro estudo, uma leve esteatose surgiu após duas semanas e agravou-se até a quarta semana no grupo exposto ao etanol. Em contraste, os fígados dos animais expostos ao etanol e tratados



com o probiótico LGG mostraram-se praticamente livres de gordura na quarta semana. Este achado corrobora os achados de outros estudos que mostraram a diminuição da esteatose alcoólica em animais (murinos) tratados com o probiótico LGG (WANG *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015). Estes resultados foram observados em animais submetidos ao etanol de forma aguda ou crônica. As causas para a melhora da DHA nestes animais foram diversas: redução da inflamação (WANG *et al.*, 2013); diminuição da expressão de genes lipogênicos e ativação de genes lipolíticos (ZHANG *et al.*, 2015); e fortalecimento da barreira intestinal (ZHAO *et al.*, 2015). Considerando a resistência do zebrafish às endotoxinas, pode-se supor que o efeito observado deva-se à elevada capacidade do LGG em metabolizar o acetaldeído, composto hepatotóxico derivado do metabolismo do etanol. Em 2000, Nosova e colaboradores já mostraram que o LGG reduziu os níveis de acetaldeído e mitigou os efeitos adversos do etanol (NOSOVA *et al.*, 2000).

A localização das gotículas de gordura, na hepatotoxicidade relacionada ao etanol nos seres humanos, é mais proeminente na região perivenular (BARAONA *et al.*, 1983; GUZMAN & CASTRO, 1989). Foi observado em nosso estudo, que as gotas lipídicas estavam disseminadas no tecido hepático, possivelmente porque, no peixe, as veias, as artérias e os ductos biliares estão distribuídos de maneira aleatória. A morfometria mostrou que houve aumento volumétrico dos hepatócitos nos animais submetidos ao etanol na quarta semana.

Em nosso estudo, além de promover a esteatose hepática, o etanol diminuiu de maneira significativa a concentração dos triglicerídeos séricos, porém não afetou os níveis de colesterol. Níveis aumentados de triglicerídeos séricos, em seres humanos, com uso moderado ou abusivo de etanol, foram relatados em diversos estudos

(WAKABAYASHI, 2013; SLAGTER *et al.*, 2014). No modelo murino, animais com exposição crônica ao etanol, apresentaram resultados divergentes: Park e colaboradores observaram a elevação dos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol, entretanto, Fan e colaboradores não encontraram associação entre a exposição ao etanol e triglicerídeos séricos e observaram diminuição nos níveis de colesterol (PARK *et al.*, 2014; FAN *et al.*, 2014).

Por sua vez, o LGG causou uma importante redução nos níveis séricos de colesterol total. Os resultados de estudos em animais (murinos) e em humanos mostraram a ação redutora moderada do LGG nos lipídios séricos (KEKKONEN *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2013). A possível causa deste efeito é a produção de ácidos graxos de cadeia curta, oriundos da fermentação dos carboidratos não-digeríveis pelas bactérias probióticas e comensais. Os ácidos graxos de cadeia curta contribuem para a diminuição das concentrações de lipídios sanguíneos por inibição da síntese hepática de colesterol. Outras possibilidades a serem consideradas são: consumo ou a assimilação do colesterol por bactérias intestinais, reduzindo a quantidade de colesterol disponível para absorção; e a desconjugação de sais biliares na circulação entero-hepática pela ação da enzima sal biliar hidrolase, produzida por diversos probióticos, incluindo o LGG, que conduz a um aumento da excreção de colesterol pelas fezes (PAVLOVIC *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2013). Quanto a diminuição dos níveis de triglicéridios séricos, observou-se no presente estudo, uma aparente sinergia entre o LGG e etanol. O grupo tratado somente com o LGG não apresentou diferença nas concentrações de triglicerídeos séricos em relação ao grupo controle, porém o LGG quando associado ao etanol (grupo P+E) causou uma redução acentuada nos níveis de triglicerídeos. O LGG, portanto, parece ser uma terapia promissora para controlar a esteatose hepática durante o consumo de etanol.

No terceiro artigo - "*Effects of Lactobacillus rhamnosus GG on the behaviour of zebrafish with chronic ethanol exposure*", foi avaliada uma possível interação entre a microbiota e o cérebro durante a exposição alcoólica.

Muito do conhecimento da sinalização bidirecional entre o sistema nervoso e micro-organismos intestinais deriva de estudos da ação de organismos patogênicos, no entanto, um crescente número de evidências sugere que esta sinalização também pode ocorrer entre o sistema nervoso e a microbiota entérica comensal, incluindo bactérias probióticas (SAULNIER *et al.*, 2013). O acetaldeído, metabólito do etanol, afeta a atividade dos diferentes sistemas de neurotransmissores e, subsequentemente, influi nos efeitos comportamentais causados pelo abuso de álcool (ROSEMBERG *et al.*, 2010; RICO *et al.*, 2011; ZENKI *et al.*, 2014). Dois estudos diferentes mostraram que os lactobacilos elevam a atividade das enzimas álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH) (QING & WANG, 2008; PARK *et al.*, 2012), aumentando a metabolização do etanol, via oxidação pelas desidrogenases bacterianas. O acetaldeído formado é oxidado pela ALDH a acetato, diminuindo desta maneira a concentração de etanol no sangue. Portanto, a nossa hipótese teve como base a possibilidade do probiótico LGG atenuar o efeito do etanol nas alterações comportamentais do *zebrafish*.

Neste estudo, foram formados 4 grupos: controle (C), etanol (E), probiótico (P) e probiótico+etanol (P+E). Os animais dos grupos E e P+E foram expostos à concentração contínua de 0,05% de etanol. Os animais dos grupos P e P+E, receberam alimento com probiótico 2 vezes ao dia. Após 2 semanas de tratamento, os testes foram realizados no *novel tank test*. Entre os vários testes experimentais para avaliação comportamental de peixes, o *novel tank* tornou-se um dos mais populares (CACHAT *et al.*, 2010; WONG *et al.*, 2010; ROSEMBERG *et al.*, 2012; STEWART *et al.*, 2012).

Quando o *zebrafish* é submetido a um novo ambiente, começa gradualmente a nadar na direção vertical e a explorar as áreas superiores do tanque. Este comportamento reflete a sua adaptação ao ambiente. Os parâmetros que avaliam as atividades verticais, como por exemplo, o tempo gasto no topo e o número de entradas na zona superior, indicam os níveis de ansiedade do animal (EGAN *et al.*, 2009; MATHUR & GUO, 2011). Nossos resultados sugerem que o etanol causou redução da ansiedade no *zebrafish*. Os achados estatisticamente significativos dos testes - tempo no topo, tempo no fundo, entradas no topo e distância percorrida no topo – demonstraram que os animais do grupo etanol apresentaram menor ansiedade na exploração do novo ambiente, quando comparados aos animais controle. Estes resultados concordam com os achados de outros autores que investigaram o comportamento do *zebrafish* adulto em um modelo de alcoolismo crônico utilizando o *novel tank* (EGAN *et al.*, 2009; CACHAT *et al.*, 2010; WONG *et al.*, 2010). Os estudos de Egan e Cachat avaliaram o comportamento do *zebrafish* após uma semana de exposição ao etanol (0,3% v/v) (EGAN *et al.*, 2009; CACHAT *et al.*, 2010). O experimento de Wong durou duas semanas, tempo semelhante ao que foi utilizado neste estudo, porém com uma dose menor (0,2% v/v) (WONG *et al.*, 2010). Os resultados comportamentais destes três estudos mencionados foram semelhantes à pesquisa que se realizou, apesar das doses e tempos de administração de etanol haver sido diferentes. As doses variaram entre 0,2% e 0,5%, o que indica que mesmo com uma dose menor de etanol, ocorrem alterações comportamentais detectáveis pelo teste *novel tank*.

Verificamos que o etanol influenciou o comportamento dos animais e produziu o efeito ansiolítico/desinibidor esperado no grupo E. O probiótico não causou um efeito significativo no comportamento do grupo P+E em comparação com o grupo E. É de se notar, no entanto, que não houve diferença de significância estatística do grupo P+E

em relação ao grupo controle (C). A inexistência desta diferença é interessante. Parece refletir alguma ação do LGG, que talvez, possa ser explicada pela atividade das enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase, que atuam oxidando o etanol no intestino (SALASPURO *et al.*, 1997; NOSOVA *et al.*, 2000).

Ao longo dos últimos anos, progresso substancial foi feito na identificação das alterações moleculares e fisiológicas que causam a esteatose hepática. Os fatores de transcrição que controlam o metabolismo dos lipídios hepáticos foram identificados, porém a maior questão não resolvida é a natureza da relação entre a esteatose hepática e a esteato-hepatite. Os achados desta tese, entre eles a ativação de genes inflamatórios e as alterações de organelas celulares provocadas pelo etanol, parecem apontar para a transição da esteatose para esteato-hepatite neste modelo. A elucidação dos mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento da DHA poderá facilitar o desenvolvimento de intervenções específicas destinadas a prevenir a progressão da doença.

Evidências clínicas e experimentais atestam que a microbiota intestinal é um alvo potencial para o tratamento da DHA. A manipulação da microbiota, através da administração de probióticos e prebióticos, tem apresentado resultados encorajadores e é necessário aprofundar os conhecimentos sobre a eficácia desta terapia em longo prazo e entender os seus mecanismos de ação. Neste estudo, foi observado que o probiótico LGG, auxiliou na diminuição das concentrações séricas de colesterol e de triglicérides hepáticos, atenuando a esteatose. Considerando-se que o uso do probiótico se deu concomitantemente ao consumo do etanol, possivelmente o LGG possa auxiliar no manejo da lesão hepática causada pelo etanol.

As perguntas ainda a serem respondidas envolvem os mecanismos de ação do probiótico LGG na diminuição da esteatose. Terá sido um efeito da metabolização do acetaldeído pelo LGG, acarretando a sua diminuição no lúmen intestinal? Ação imunomoduladora? Diminuição do estresse oxidativo? Outra observação reside no fato do zebrafish possuir maior resistência às endotoxinas, podendo ser um modelo atraente para o estudo dos mecanismos subjacentes da evolução da inflamação.

Devido à alta prevalência da DHA, ao prognóstico reservado dos pacientes e aos enormes encargos financeiros que acarreta sobre o Sistema de Saúde do país, novas estratégias terapêuticas devem continuar sendo testadas. É neste contexto que o uso dos probióticos deve ser considerado.

## 17 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adachi Y, Moore LE, Bradford BU, Gao W, Thurman RG. Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology* 1995; 108(1):218-24.

Amali AA, Rekha RD, Lin CJ, Wang WL, Gong HY, Her GM, *et al.* Thioacetamide induced liver damage in zebrafish embryo as a disease model for steatohepatitis. *J Biomed Sci.* 2006; 13(2):225-32.

Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, Sanyal AJ, Puri P, Sterling RK, *et al.* Randomised clinical trial: Lactobacillus GG modulates gut microbiome, metabolome and endotoxemia in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014; 39(10):1113-25.

Banks AS, Kon N, Knight C, Matsumoto M, Gutiérrez-Juárez R, Rossetti L, *et al.* SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab.* 2008; 8(4):333-41.

Baraona E, Jauhonen P, Miyakawa H, Lieber CS. Zonal redox changes as a cause of selective perivenular hepatotoxicity of alcohol. *Pharmacol Biochem Behav.* 1983; 18 (Suppl 1):449-54.

Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol.* 2012; 56 (4):952-64.

Beier JI, Arteel GE, McClain CJ. Advances in Alcoholic Liver Disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2011; 13(1): 56–64.

Bertola A, Park O, Gao B. Chronic plus binge ethanol feeding synergistically induces neutrophil infiltration and liver injury in mice: a critical role for E-selectin. *Hepatology* 2013; 58(5):1814-23.

Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, *et al.* The intestinal microbiota affect central levels of brain derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* 2011; 141(2):599-609.

Bosscher D, Breynaert A, Pieters L, Hermans N. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. *J Physiol Pharmacol.* 2009; 60 (Suppl 6): 5-11.

Briggs JP. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 282 (1): R3-9.

Bull-Otterson L, Feng W, Kirpich I, Wang Y, Qin X, Liu Y, *et al.* Metagenomic analyses of alcohol induced pathogenic alterations in the intestinal microbiome and the effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment. *PLoS One* 2013; 8(1): e53028.

Cachat J, Stewart A, Grossman L, Gaikwad S, Kadri F, Chung KM, *et al.* Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nature protocols* 2010; 5(11): 1786-99.

Ceccarelli S, Nobili V, Alisi A. Toll-like receptor-mediated signaling cascade as a regulator of the inflammation network during alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(44):16443-51.

Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis.* 2012; 16(4):667-85.



Chang B, Sang L, Wang Y, Tong J, Zhang D, Wang B. The protective effect of VSL#3 on intestinal permeability in a rat model of alcoholic intestinal injury. *BMC Gastroenterol.* 2013; 13:151.

Chatterjee D, Shams S, Gerlai R. Chronic and acute alcohol administration induced neurochemical changes in the brain: comparison of distinct zebrafish populations. *Amino Acids* 2014; 46(4):921-30.

Chen E, Ekker SC. Zebrafish as a genomics research model. *Curr Pharm Biotechnol.* 2004; 5(5):409-13.

Chiu YH, Tsai JJ, Lin SL, Lin MY. Lactobacillus casei MYL01 modulates the proinflammatory state induced by ethanol in an in vitro model. *J Dairy Sci.* 2013; 97(4):2009-16.

Collins SM, Surette M, Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol.* 2012; 10(11):735-42.

Collins SM, Bercik P. Gut microbiota: Intestinal bacteria influence brain activity in healthy humans. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013; 10(6):326-7.

Cryan JF, O'Mahony SM. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motil.* 2011; 23 (3):187-92.

Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci.* 2012; 13(10):701-12.

da Silva SA, Santos LL, Passos AD, Sankarankutty AK, Martinelli Ade L, *et al.* Chronic liver disease prevention strategies and liver transplantation. *Acta Cir Bras.* 2006; 21 (1):79-84.

De Craemer D, Pauwels M, Van den Branden C. Alterations of peroxisomes in steatosis of the human liver: a quantitative study. *Hepatology* 1995; 22(3):744-52.

De Palma G, Collins SM, Bercik P, Verdu EF. The microbiota-gut-brain axis in gastrointestinal disorders: stressed bugs, stressed brain or both? *J Physiol.* 2014; 592(14):2989-97.

Diehl AM. Liver disease in alcohol abusers: clinical perspective. *Alcohol* 2002; 27(1):7-11.

Di Giulio RT; Hinton DE. *The Toxicology of Fishes*. 1<sup>st</sup> Ed. Boca Raton, USA: CRC Press, 2008.

Dhiman RK, Rana B, Agrawal S, Garg A, Chopra M, Thumburu K, *et al.* Probiotic VSL#3 Reduces Liver Disease Severity and Hospitalization in Patients With Cirrhosis: A Randomized, Controlled Trial. *Gastroenterology*. 2014; 147(6):1327-37.

Donohue TM. Alcohol-induced steatosis in liver cells. *World J Gastroenterol.* 2007; 13 (37): 4974-8.

Driessen M, Vitins AP, Pennings JL, Kienhuis AS, Water B, van der Ven LT. A transcriptomics-based hepatotoxicity comparison between the zebrafish embryo and established human and rodent in vitro and in vivo models using cyclosporine A, amiodarone and acetaminophen. *Toxicol Lett.* 2015; 232(2):403-12.

Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, *et al.* Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res.* 2009; 205(1): 38-44

Fan F, Cao Q, Wang C, Ma X, Shen C, Liu X, *et al.* Impact of chronic low to moderate alcohol consumption on blood lipid and heart energy profile in acetaldehyde dehydrogenase 2-deficient mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2014; 35(8):1015-22.

Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, *et al.* Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab.* 2008; 8 (5):347-58.

Fernandes Y, Tran S, Abraham E, Gerlai R. Embryonic alcohol exposure impairs associative learning performance in adult zebrafish. *Behav Brain Res.* 2014; 265:181-7.

Ferolla SM, Armiliato GN, Couto CA, Ferrari TC. Probiotics as a complementary therapeutic approach in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 2015; 7(3):559-65.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>2002.

Forn-Cuní G, Varela M, Fernández CM, Figueras A, Novoa B. Liver immune responses to inflammatory stimuli in a diet-obesity model of zebrafish. *J Endocrinol.* 2015; 224:159-70.

Forsyth CB, Farhadi A, Jakate SM, Tang Y, Shaikh M, Keshavarzian A. Lactobacillus GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 2009; 43(2):163-7.

Fujimoto M, Uemura M, Nakatani Y, Tsujita S, Hoppo K, Tamagawa T, *et al.* Plasma endotoxin and serum cytokine levels in patients with alcoholic hepatitis: relation to severity of liver disturbance. *Alcohol Clin Exp Res.* 2000; 24(4 Suppl):48S-54S.

Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 2011; 141(5):1572-85.

Gao B, Seki E, Brenner DA, Friedman S, Cohen JJ, Nagy L, *et al.* Innate immunity in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011; 300(4):G516-25.

Gao B. Hepatoprotective and anti-inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Gastroenterol Hepatol.* 2012; 27 (Suppl. 2): 89–93.

Gibert Y, Trengove MC, Ward AC. Zebrafish as a genetic model in pre-clinical drug testing and screening. *Curr Med Chem.* 2013; 20 (19): 2458-66.

Gonçalves CS, Gomes MPZ, Gonçalves PL, Gonçalves LL, Pereira FEL. Hepatite Alcoólica. *J Bras Gastroenterol.* 2006; 6 (2):59-68.

Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361(9356):512-19.

Guzman M, Castro J. Zonal heterogeneity of the effects of chronic ethanol feeding on hepatic fatty acid metabolism. *Hepatology* 1990; 12(5):1098-105.

Hammes TO, Pedroso GL, Hartmann CR, Escobar TD, Fracasso LB, da Rosa DP, *et al.* The effect of taurine on hepatic steatosis induced by thioacetamide in zebrafish (*Danio rerio*). *Dig Dis Sci.* 2012; 57(3):675-82.

Hartmann P, Seebauer CT, Schnabl B. Alcoholic liver disease: the gut microbiome and liver cross talk. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015; 39(5):763-75.

Howarth DL, Vacaru AM, Tsedensodnom O, Mormone E, Nieto N, Costantini LM, *et al*. Alcohol disrupts endoplasmic reticulum function and protein secretion in hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res*. 2012; 36(1):14-23.

Howarth DL, Yin C, Yeh K, Sadler KC. Defining hepatic dysfunction parameters in two models of fatty liver disease in zebrafish larvae. *Zebrafish*. 2013; 10(2):199-210.

Howarth DL, Lindtner C, Vacaru AM, Sachidanandam R, Tsedensodnom O, Vasilkova T, *et al*. Activating transcription factor 6 is necessary and sufficient for alcoholic fatty liver disease in zebrafish. *PLoS Genet*. 2014; 10(5):e1004335.

Henao-Mejia J, Elinav E, Thaiss CA, Licona-Limon P, Flavell RA. Role of the intestinal microbiome in liver disease. *J Autoimmun*. 2013; 46:66-73.

Iannitti T, Palmieri B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clin Nutr*. 2010; 29(6):701-25.

Kankainen M, Paulin L, Tynkkynen S, von Ossowski I, Reunanen J, Partanen P, *et al*. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(40):17193-8.

Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, *et al*. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2005; 54(1):117-21.

Kawaratani H, Tsujimoto T, Douhara A, Takaya H, Moriya K, Namisaki T, *et al.* The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013:495156.

Kekkonen RA, Sysi-Aho M, Seppänen-Laakso T, Julkunen I, Vapaatalo H, Oresic M, *et al.* Effect of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG intervention on global serum lipidomic profiles in healthy adults. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(20):3188-94.

Kirpich IA, Solovieva NV, Leikhter SN, Shidakova NA, Lebedeva OV, Sidorov PI, *et al.* Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol* 2008; 42(8): 675-82.

Kumar M, Rakesh S, Nagpal R, Hemalatha R, Ramakrishna A, Sudarshan V, *et al.* Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and Aloe vera gel improve lipid profiles in hypercholesterolemic rats. *Nutrition* 2013; 29(3):574-9.

Kwak DS, Jun DW, Seo JG, Chung WS, Park SE, Lee KN, *et al.* Short-term probiotic therapy alleviates small intestinal bacterial overgrowth, but does not improve intestinal permeability in chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2014; 26(12):1353-9.

Lane BP, Lieber CS. Ultrastructural alterations in human hepatocytes following ingestion of ethanol with adequate diets. *Am J Pathol.* 1966; 49(4):593-603.

Lantz-McPeak S, Guo X, Cuevas E, Dumas M, Newport GD, Ali SF, *et al.* Developmental toxicity assay using high content screening of zebrafish embryos. *J Appl Toxicol.* 2015; 35(3):261-72.

Li Y, Wong K, Giles A, Jiang J, Lee JW, Adams AC, *et al.* Hepatic SIRT1 attenuates hepatic steatosis and controls energy balance in mice by inducing fibroblast growth factor 21. *Gastroenterology*. 2014; 146(2):539-49.

Lieber CS. Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis*. 2005; 9(1):1-35.

Lieber CS, Leo M A, Wang X, Decarli LM. Effect of chronic alcohol consumption on Hepatic SIRT1 and PGC-1 $\alpha$  in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 370:44-48.

Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*. 2007; 8(5):353-67.

Lin JN, Chang LL, Lai CH, Lin KJ, Lin MF, Yang CH, *et al.* Development of an Animal Model for Alcoholic Liver Disease in Zebrafish. *Zebrafish* 2015; 12(4):271-80.

Lievin-Le Moal V, Servin AL. Anti-infective activities of lactobacillus strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clin Microbiol Rev*. 2014; 27(2):167-99.

Liu J. Ethanol and liver: recent insights into the mechanisms of ethanol induced fatty liver. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(40):14672-85.

Loguercio C, De Simone T, Federico A, Terracciano F, Tuccillo C, *et al.* Gut-liver axis: a new point of attack to treat chronic liver damage? *Am J Gastroenterol*. 2002, 97(8): 2144-6.

Lorent K, Yeo SY, Oda T, Chandrasekharappa S, Chitnis A, Matthews RP, *et al.* Inhibition of Jagged-mediated Notch signaling disrupts zebrafish biliary development

and generates multi-organ defects compatible with an Alagille syndrome phenocopy. *Development* 2004; 131(22):5753-66.

Lyte M. Microbial endocrinology in the microbiome-gut-brain axis: how bacterial production and utilization of neurochemicals influence behavior. *PLoS Pathog.* 2013; 9(11):e1003726.

Malaguarnera G, Giordano M, Nunnari G, Bertino G, Malaguarnera M. Gut microbiota in alcoholic liver disease: Pathogenetic role and therapeutic perspectives. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(44):16639-48.

Mandrekar P, Szabo G. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol.* 2009; 50(6):1258-66.

Marotta F, Barreto R, Wu CC, Naito Y, Gelosa F, Lorenzetti A, *et al.* Experimental acute alcohol pancreatitis-related liver damage and endotoxemia: synbiotics but not metronidazole have a protective effect. *Chin J Dig Dis* 2005; 6(4):193-7.

Mathews S, Gao B. Therapeutic potential of interleukin 1inhibitors in the treatment of alcoholic liver disease. *Hepatology* 2013; 57: 2078-80.

Mathur P, Guo S. Differences of acute versus chronic ethanol exposure on anxiety-like behavioral responses in zebrafish. *Behav Brain Res.* 2011; 219(2), 234-9.

Matthews RP, Lorent K, Mañoral-Mobias R, Huang Y, Gong W, Murray IV, *et al.* TNF alpha-dependent hepatic steatosis and liver degeneration caused by mutation of zebrafish S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Development* 2009; 136(5):865-75.



Matsumoto M, Kibe R, Ooga T, Aiba Y, Sawaki E, Oga Y, *et al.* Cerebral low-molecular metabolites influenced by intestinal microbiota: a pilot study. *Front Syst Neurosci.* 2013; 23: 7:9.

Meng Z, Zhang XY, Guo J, Xiang LX, Shao JZ. Scavenger receptor in fish is a lipopolysaccharide recognition molecule involved in negative regulation of NF- $\kappa$ B activation by competing with TNF receptor-associated factor 2 recruitment into the TNF- $\alpha$  signaling pathway. *J Immunol.* 2012; 189(8):4024-39

Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, *et al.* Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1 beta in mice. *Gastroenterology.* 2010; 139 (1):323-34.

Morita H, Toh H, Oshima K, Murakami M, Taylor TD, Taylor TD, *et al.* Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. *J Bacteriol.* 2009; 191(24):7630-1

Mussulini BH, Leite CE, Zenki KC, Moro L, Baggio S, Rico EP, *et al.* Seizures induced by pentylentetrazole in the adult zebrafish: a detailed behavioral characterization. *PLoS One.* 2013; 8(1):e54515

Nava GM, Stappenbeck TS. Diversity of the autochthonous colonic microbiota. *Gut Microbes.* 2011; 2(2):99-104.

Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15(2):300-10.

Nosova T, Jousimies-Somer H, Jokelainen K, Heine R, Salaspuro M. Acetaldehyde production and metabolism by human indigenous and probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Alcohol & Alcohol* 2000; 35(6):561-8.

Ogryzko NV, Hoggett EE, Solaymani-Kohal S, Tazzyman S, Chico TJ, Renshaw SA, *et al.* Zebrafish tissue injury causes upregulation of interleukin-1 and caspase-dependent amplification of the inflammatory response. *Dis Model Mech.* 2014; 7(2):259-64.

Oliva J, French BA, Li J, Bardag-Gorce F, Fu P, French SW. Sirt1 is involved in energy metabolism: the role of chronic ethanol feeding and resveratrol. *Exp Mol Pathol.* 2008; 85(3): 155-9.

Oliveira GMT, Schimer H, Pereira TCB, Rico EP, Rosemberg DB, Bonan CD, Souto AA, Bogo MR. Análise do padrão transcricional de SIRT1, PGC1 $\alpha$  e PPAR- $\gamma$  influenciado por etanol em fígado de zebrafish. 2009 Disponível em: [http://www.pucrs.br/edipucrs/XSalaoIC/Ciencias\\_Biologicas/Bioquimica/70777-GIOVANNA\\_MEDEIROS\\_TAVARES\\_DE\\_OLIVEIRA.pdf](http://www.pucrs.br/edipucrs/XSalaoIC/Ciencias_Biologicas/Bioquimica/70777-GIOVANNA_MEDEIROS_TAVARES_DE_OLIVEIRA.pdf)

Oliveira TA, Koakoski G, Kreutz LC, Ferreira D, da Rosa JG, de Abreu MS, *et al.* Alcohol impairs predation risk response and communication in zebrafish. *PLoS One.* 2013; 8(10):e75780.

OMS - Organização Mundial de Saúde - Global status report on alcohol and health. WHO Press; Geneva, Switzerland: 2011

O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ. Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver Diseases; Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology; Alcoholic liver disease. *Hepatology.* 2010; 51(1):307-28.

Park BJ, Lee YJ, Lee HR. Chronic liver inflammation: clinical implications beyond alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(9): 2168-75.

Passeri MJ, Cinaroglu A, Gao C, Sadler KC. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. *Hepatology* 2009; 49(2):443-52.

Pavlović N, Stankov K, Mikov M. Probiotics-Interactions with Bile Acids and Impact on Cholesterol Metabolism. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012; 168:1880–95.

Petrasek J, Bala S, Csak T, Lippai D, Kodys K, Menashy V, *et al.* IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J Clin Invest.* 2012; 122(10): 3476-89.

Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschöp MH. Sirt1 protects against high-fat diet induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(28):9793-8.

Pochart P, Dewit O, Desjeux JF, Bourlioux P. Viable starter culture, beta-galactosidase activity, and lactose in duodenum after yogurt ingestion in lactase-deficient humans. *Am J Clin Nutr.* 1989; 49(5):828-31.

Portugal FB, Campos MR, de Carvalho JR, Flor LS, Schramm JM, Costa MF. Disease burden in Brazil: an investigation into alcohol and non-viral cirrhosis. *Cien Saude Colet.* 2015; 20(2):491-501.

Qing L, Wang T. Lactic acid bacteria prevent alcohol-induced steatohepatitis in rats by acting on the pathways of alcohol metabolism. *Clin Exp Med.* 2008; 8(4):187-91.

Quigley EM, Stanton C, Murphy EF. The gut microbiota and the liver. Pathophysiological and clinical implications. *J Hepatol.* 2013; 58(5):1020-7.

Quigley EM. Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterol Hepatol*. 2013; 9(9):560-9.

Rao R. Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009; 50:638–44.

Rasineni K, Casey CA. Molecular mechanism of alcoholic fatty liver. *Indian J Pharmacol*. 2012; 44(3):299-303.

Rawls JF, Samuel BS, Gordon JI. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci*. 2004; 101(13):4596-601.

Rekha RD, Amali AA, Her GM, Yeh YH, Gong HY, Hu SY, *et al*. Thioacetamide accelerates steatohepatitis, cirrhosis and HCC by expressing HCV core protein in transgenic zebrafish *Danio rerio*. *Toxicology* 2008; 243(1-2):11-22.

Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009; 6(5):306-14.

Rehm J, Samokhvalov AV, Shield KD. Global burden of alcoholic liver diseases. *J Hepatol*. 2013; 59(1):160-8.

Rico EP, Rosemberg DB, Langoni AS, Souto AA, Dias DD, Bogo MR, *et al*. Chronic ethanol treatment alters purine nucleotide hydrolysis and nucleotidase gene expression pattern in zebrafish brain. *Neurotoxicology* 2011; 32(6):871-8.

Ritze Y, Bárdos G, Claus A, Ehrmann V, Bergheim I, Schwiertz A, *et al*. *Lactobacillus rhamnosus* GG protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice. *PLoS One*. 2014; 9(1):e80169.

Rosemberg DB, da Rocha RF, Rico EP, Zanotto-Filho A, Dias RD, Bogo MR, *et al.* Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. *Neuroscience*. 2010; 171(3):683-92.

Rosemberg DB, Braga MM, Rico EP, Loss CM, Córdova SD, Mussulini BH, *et al.* Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol. *Neuropharmacology* 2012; 63(4):613-23.

Rusyn I, Bataller R. Alcohol and toxicity. *J Hepatol*. 2013; 59(2):387-8.

Sadler KC, Krahn KN, Gaur NA, Ukomadu C. Liver growth in the embryo and during liver regeneration in zebrafish requires the cell cycle regulator, *uhrf1*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(5):1570-5.

Salaspuro M. Microbial metabolism of ethanol and acetaldehyde and clinical consequences. *Addiction Biol*. 1997; 2: 35-46.

Santos Rocha SW, Silva BS, Gomes FO, Soares e Silva AK, Raposo C, Brbosa KP, *et al.* Effect of diethylcarbamazine on chronic hepatic inflammation induced by alcohol in C57BL/6 mice. *Eur J Pharmacol*. 2012; 689(1-3):194-203.

Sapp V, Gaffney L, EauClaire SF, Matthews RP. Fructose leads to hepatic steatosis in zebrafish that is reversed by mechanistic target of rapamycin (mTOR) inhibition. *Hepatology*. 2014; 60(5):1581-92.

Saulnier DM, Ringel Y, Heyman MB, Foster JA, Bercik P, Shulman RJ, *et al.* The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. *Gut Microbes*. 2013; 4(1):17-27.

Schneider ACR, Maurer R, Matte U, Porawski M, Schaeffer PG, *et al.* Implementação de um Novo Modelo de Experimentação Animal - Zebrafish. *Revista HCPA* 2009; 29(2): 100-3.

Segawa S, Wakita Y, Hirata H, Watari J. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates alcoholic liver disease in ethanol-containing diet-fed C57BL/6N mice. *Int J Food Microbiol.* 2008; 128(2):371-7.

Segers ME, Lebeer S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG--host interactions. *Microb Cell Fact.* 2014; 13 (Suppl 1):S7.

Sepulcre MP, Alcaraz-Pérez F, López-Muñoz A, Roca FJ, Meseguer J, Cayuela ML, *et al.* Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-kappaB activation. *J Immunol.* 2009; 182(4):1836-45.

Shan SD, Boutin S, Ferdous J, Ali DW. Ethanol exposure during gastrulation alters neuronal morphology and behavior in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol.* 2015; 48C:18-27.

Shen Z, Liang X, Rogers CQ, Rideout D, You M. Involvement of adiponectin-SIRT1-AMPK signaling in the protective action of rosiglitazone against alcoholic fatty liver in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010; 298(3):G364-74.

Silva TE, Colombo G, Schiavon LL. Adiponectin: A multitasking player in the field of liver diseases. *Diabetes Metab.* 2014; 40 (2):95-107.

Sindhu KN, Sowmyanarayanan TV, Paul A, Babji S, Ajjampur SS, Priyadarshini S, *et al.* Immune response and intestinal permeability in children with acute

gastroenteritis treated with *Lactobacillus rhamnosus* GG: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis*. 2014; 58(8):1107-15

Singh AK, Pandey SK, Naresh Kumar G. Pyrroloquinoline quinone-secreting probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 ameliorates ethanol-induced oxidative damage and hyperlipidemia in rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014; 38(7):2127-37.

Slagter SN, van Vliet-Ostapchouk JV, Vonk JM, Boezen HM, Dullaart RP, *et al*. Combined effects of smoking and alcohol on metabolic syndrome: the LifeLines cohort study. *PLoS One*. 2014; 9(4):e96406.

Spanagel R. Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev*. 2008; 89(2):649-705.

Stewart A, Gaikwad S, Kyzar E, Green J, Roth A, Kalueff AV. Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. *Neuropharmacology* 2012; 62(1): 135-43.

Szabo G, Bala S. Alcoholic liver disease and the gut-liver axis. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(11):1321-9.

Szabo G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease. *Gastroenterology*. 2015; 148(1):30-6.

Tao T, Peng J. Liver development in zebrafish (*Danio rerio*). *J Genet Genomics* 2009; 36, (6):325-34.

Thakur PC, Stuckenholtz C, Rivera MR, Davison JM, Yao JK, Amsterdam A, *et al*. Lack of de novo phosphatidylinositol synthesis leads to endoplasmic reticulum stress and hepatic steatosis in *cdipt*-deficient zebrafish. *Hepatology*. 2011; 54(2):452-62.

Tong M, Longato L, Ramirez T, Zabala V, Wands JR, de la Monte SM. Therapeutic reversal of chronic alcohol-related steatohepatitis with the ceramide inhibitor myriocin. *Int J Exp Pathol*. 2014; 95(1):49-63.

Tsedensodnom O, Vacaru AM, Howarth DL, Yin C, Sadler KC. Ethanol metabolism and oxidative stress are required for unfolded protein response activation and steatosis in zebrafish with alcoholic liver disease. *Dis Model Mech*. 2013; 6(5):1213-26.

Tsukamoto H, Machida K, Dynnyk A, Mkrtychyan H. "Second hit" models of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*. 2009; 29(2):78-87.

Uesugi T, Froh M, Arteel GE, Bradford BU, Thurman RG. Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice. *Hepatology* 2001, 34: 101–8.

Vandenplas Y, Huys G, Daube G. Probiotics: an update. *J Pediatr (Rio J)*. 2014; 7557(14):147-8

Wakabayashi I. Associations between heavy alcohol drinking and lipid-related indices in middle-aged men. *Alcohol*. 2013; 47(8):637-42.

Wang Z, Du J, Lam SH, Mathavan S, Matsudaira P, Gong Z. Morphological and molecular evidence for functional organization along the rostrocaudal axis of the adult zebrafish intestine. *BMC Genomics* 2010; 11:392.

Wang Y, Kirpich I, Liu Y, Ma Z, Barve S, McClain CJ, *et al*. Lactobacillus rhamnosus GG treatment potentiates intestinal hypoxia-inducible factor, promotes intestinal integrity and ameliorates alcohol-induced liver injury. *Am J Pathol*. 2011; 179(6):2866-75.



Wang Y, Liu Y, Sidhu A, Ma Z, McClain C, Fenge W. Lactobacillus rhamnosus GG culture supernatant ameliorates acute alcohol-induced intestinal permeability and liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012; 303(1):G32-41.

Wang Y, Liu Y, Kirpich I, Ma Z, Wang C, Zhang M, *et al*. Lactobacillus rhamnosus GG reduces hepatic TNF $\alpha$  production and inflammation in chronic alcohol-induced liver injury. *J Nutr Biochem*. 2013; 24(9):1609-15.

Wang Z, Su B, Fan S, Fei H, Zhao W. Protective effect of oligomeric proanthocyanidins against alcohol-induced liver steatosis and injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 458(4):757-62.

Westerfield M. The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of the zebrafish (*Danio rerio*). 5<sup>th</sup>.ed. Oregon: University of Oregon Press, 2007.

Wolf JC, Wolfe MJ. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicol Pathol*. 2005; 33(1):75-85.

Wong K, Elegante M, Bartels B, Elkhayat S, Tien D, Roy S, *et al*. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2010; 208(2):450-7.

Yan AW, Fouts DE, Brandl J, Stärkel P, Torralba M, Schott E, *et al*. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology* 2011; 53(1):96-105.

Yeh MM, Brunt EM. Pathological features of fatty liver disease. *Gastroenterology* 2014; 147(4):754-64.

Yin C, Evason KJ, Maher JJ, Stainier DY. The bHLH transcription factor Hand2 marks hepatic stellate cells in zebrafish: analysis of stellate cell entry into the developing liver. *Hepatology* 2012; 56(5): 1958–70.

You M, Rogers CQ. Adiponectin: a key adipokine in alcoholic fatty liver. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009; 234(8):850-9.

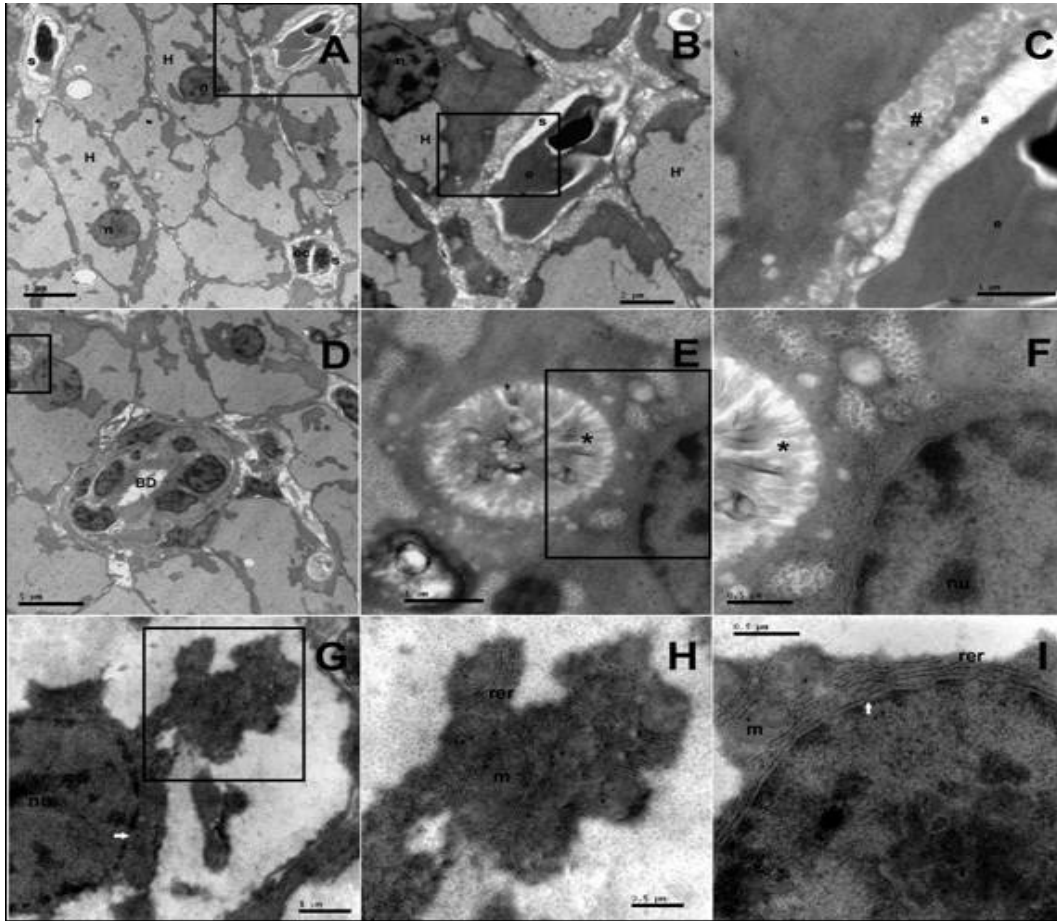
Zenki KC, Mussulini BH, Rico EP, Oliveira DL, Rosemberg DB. Effects of ethanol and acetaldehyde in zebrafish brain structures: An in vitro approach on glutamate uptake and on toxicity-related parameters. *Toxicol in Vitro* 2014; 28(5):822-8.

Zhang M, Wang C, Wang C, Zhao H, Zhao C, Chen Y, *et al.* Enhanced AMPK phosphorylation contributes to the beneficial effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supernatant on chronic-alcohol-induced fatty liver disease. *J Nutr Biochem.* 2015; 26(4):337-44.

Zhao H, Zhao C, Dong Y, Zhang M, Wang Y, Li F, *et al.* Inhibition of miR122a by *Lactobacillus rhamnosus* GG culture supernatant increases intestinal occludin expression and protects mice from alcoholic liver disease. *Toxicol Lett.* 2015; 234(3): 194-200.

## 18 - ANEXO I

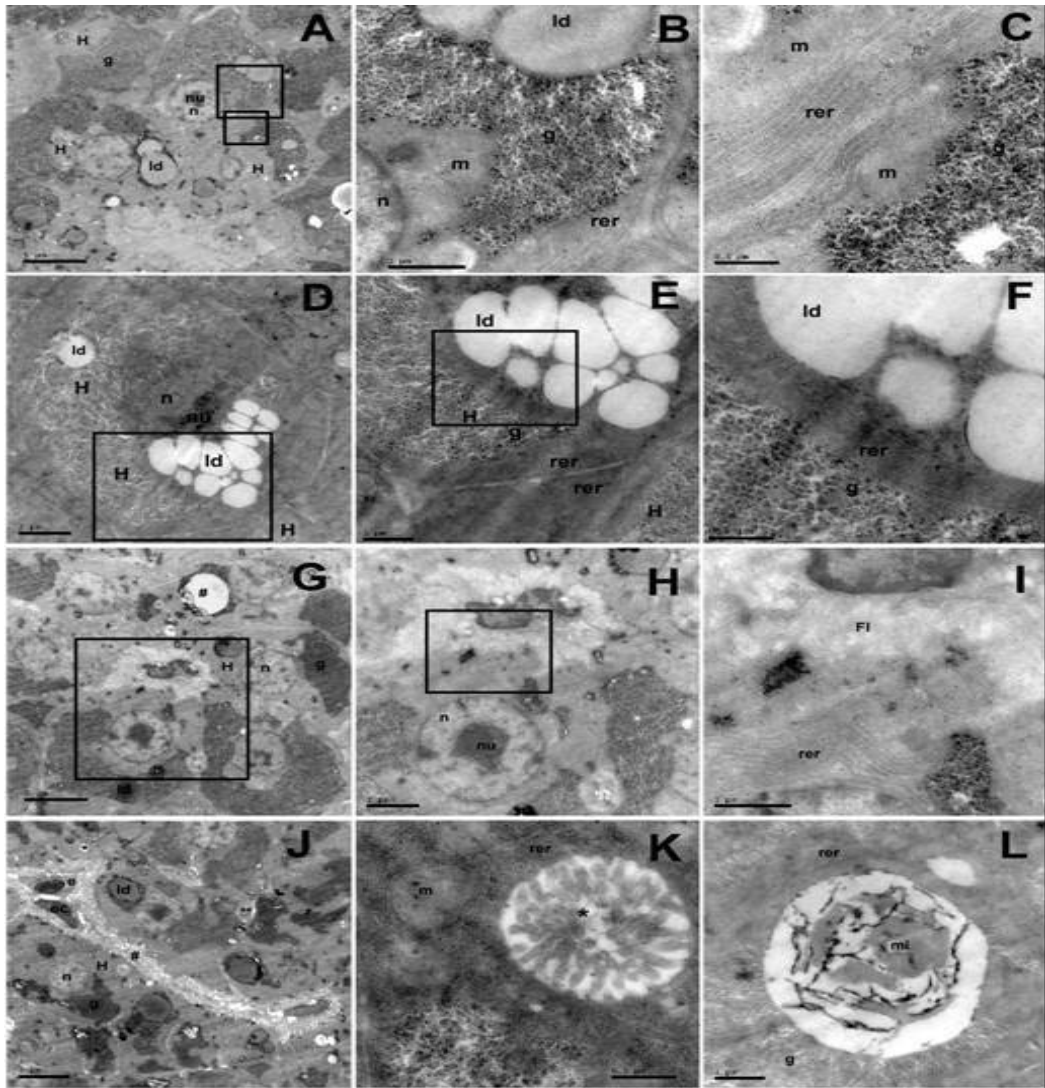
### Micrografias de fígados de animais do grupo controle



Micrografias eletrônicas de seções de fígado de grupo Controle: A, B : hepatócitos poligonais (H), núcleo esférico (n) sinusóide (s), células endoteliais (CE); C : Observar entre os hepatócitos (h) e a parede de sinusóides hepáticos (s), o espaço de Disse preenchido com microvilosidades ( # ) e a presença de eritrócitos (e) no sinusóide; D : ducto biliar (BD) formado por um epitélio cúbico envolto em lâmina basal e tecido conjuntivo; E: canalículo intracelular com grande número de microvilosidades (\*); F: Poros nucleares são observados na membrana nuclear e nucléolo bem desenvolvido (nu); G-I: note-se o arranjo paralelo das cisternas do retículo endoplasmático rugoso (rer) (seta branca), ao redor do núcleo e em estreita associação com as mitocôndrias (m). Escalas das barras: A e D: 5  $\mu$ m; B: 2  $\mu$ m; C,E e G: 1  $\mu$ m; F,H e I:0,5  $\mu$ m.

## 19 - ANEXO II

### Micrografias de fígados de animais do grupo exposto ao etanol na quarta semana



Eletromicrografias de seções de fígado de grupo Etanol : A, B, C, D, E, F: Presença de grande quantidade de glicogênio (g) e gotículas lipídicas ( ld ) no citoplasma dos hepatócitos ; rer composta por número aumentado (cerca de 12) de cisternas paralelas; G, H, I: Canalículo com figuras de mielina, núcleo com respectivo nucleólo, presença de células semelhantes a células Ito com filamentos do citoesqueleto proeminentes (FI); J, K, L: # = espaço de Disse (#); canalículo intracelular com microvilosidades (\*) dentro ; figura mielina dentro de um canalículo intracelular.

H = hepatócitos ; e = eritrócitos ; ec = células endoteliais ; g= glicogênio; ld = gotas de lipídio; m = mitocôndrias ; n = núcleo ; nu = nucléolo; mi= figuras de mielina; FI = filamentos do citoesqueleto; rer = retículo endoplasmático rugoso.  
Escala das barras: A, I = 5,0  $\mu\text{m}$ ; B, E, K = 2,0  $\mu\text{m}$ ; C, F, G, J, L = 1,0  $\mu\text{m}$ ; D, H = 0,5  $\mu\text{m}$ .