

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

THAIS ORTIZ HAMMES

EFEITO DO PROBIÓTICO *Lactobacillus rhamnosus* GG SOBRE FIBROSE
HEPÁTICA EM MODELO DE HEPATOPATIA COLESTÁTICA CRÔNICA EM
RATOS

PORTO ALEGRE

2015

THAIS ORTIZ HAMMES

**EFEITO DO PROBIÓTICO *Lactobacillus rhamnosus* GG SOBRE FIBROSE
HEPÁTICA EM MODELO DE HEPATOPATIA COLESTÁTICA CRÔNICA EM
RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia.

Orientadora: Profa. Themis Reverbel da Silveira

PORTO ALEGRE

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Ortiz Hammes, Thais

Efeito do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG sobre fibrose hepática em modelo de hepatopatia colestática crônica em ratos / Thais Ortiz Hammes. -- 2015.

113 f.

Orientador: 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. Probióticos. 2. Fibrose hepática. 3. *Lactobacillus rhamnosus* GG. I. Reverbel da Silveira, Themis, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Dilcinha e Silvério, pelo amor incondicional, por sonharem os meus sonhos e por sempre ficarem ao meu lado.

Ao Michael, agradeço o amor, a amizade e o companheirismo. Obrigado por toda colaboração científica e por me apoiarem sempre que precisei.

À Dra Themis, minha orientadora, um agradecimento que ultrapassa os limites acadêmicos. Agradeço pela oportunidade de ser sua aluna e por tudo o que aprendi neste anos - ensinamentos que levarei pra vida! Todos os momentos de convivência foram profundamente enriquecedores e eles me tornaram uma pesquisadora e, principalmente, uma pessoa muito melhor!

Agradeço aos colegas de laboratório da nova e da velha guarda por todos estes anos de convivência e companheirismo. Em especial, agradeço a Renata Leke, Thayssa Escobar, Laisa Beduschi e Fabiola Meyer pela colaboração essencial nos experimentos.

Aos amigos da vida, do HCPA e do CPE por torcerem por mim, por estarem ao meu lado e por proporcionarem momentos de alegria sempre que estivemos juntos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, agradeço por toda minha formação acadêmica e por despertar o interesse pela ciência.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre por acreditar na pesquisa e proporcionar o desenvolvimento desse estudo.

Aos financiadores CAPES e FIPE agradeço o apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma participaram durante esta trajetória, muito obrigada!

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 Fibrose Hepática.....	9
2.2 Microbiota intestinal e o eixo entero-hepático	17
2.3 Probiótico <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	22
2.4 Modelo de Ligadura de ducto biliar	29
3 JUSTIFICATIVA.....	31
4 QUESTÃO DE PESQUISA.....	32
5 HIPÓTESE.....	33
6 OBJETIVOS	34
6.1 Objetivo Geral	34
6.2 Objetivos Específicos.....	34
7 MATERIAIS E MÉTODOS	35
7.1 Locais	35
7.2 Modelo experimental.....	35
7.3 Coleta das amostras.....	38
7.4 Análise bioquímica.....	39
7.5 Avaliação do estresse oxidativo	39
7.5.1 Preparo do homogeneizado e dosagem de proteínas	39
7.5.2 Dosagem de sulfidril (SH).....	40
7.5.3 Atividade de catalase (CAT).....	40
7.5.4 Atividade de superóxido dismutase (SOD).....	41
7.6 Análise Molecular	41
7.6.1 Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)	41
7.6.2 Expressão gênica	42
7.7 <i>Enzyme Linked Immune Sorbent Assay</i> (ELISA)	43
7.8 Avaliação histológica e imunohistoquímica.....	43
7.9 Cálculo de amostra e análise estatística	44
7.10 Considerações éticas	45
8 RESULTADOS.....	46
9 DISCUSSÃO.....	53

10 CONCLUSÕES.....	66
11 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
12 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	68
ANEXOS.....	76

RESUMO

Introdução: Fibrose hepática é a resposta cicatricial a lesões celulares agudas ou crônicas do fígado. Produtos derivados do intestino podem chegar ao fígado através da veia porta e mediar resposta inflamatória via receptores TLR4. O aumento de citocinas inflamatórias induz a ativação de células estreladas, fibroblastos periportais e células de Kupffer. A ativação destas células estimula a secreção de TGF β e a deposição excessiva de colágeno. Assim, a modulação da microbiota intestinal com uso de probióticos poderia reduzir a inflamação e fibrogênese hepática. **Objetivo:** Avaliar o efeito do *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) sobre a fibrose hepática em modelo de hepatopatia colestática crônica em ratos. **Métodos:** Ratos Wistar (n = 29) adultos machos (299,89g \pm 42,89 g) foram submetidos a ligadura de ducto biliar (BDL) ou a manipulação de ducto biliar comum sem ligadura (Ctrl). Após 14 dias, os grupos foram novamente divididos para receber gavagens durante 14 dias: os grupos Ctrl e BDL receberam 1 ml de PBS e os grupos Ctrl-P e BDL-P, 1 ml de PBS contendo 2,5 \times 10⁷ UFC de LGG. A eutanásia ocorreu 5 dias após o término do tratamento quando foram coletadas amostras de sangue e fígado. **Resultados:** A ligadura de ducto biliar promoveu redução no peso e na albumina plasmática acompanhado da elevação das provas de disfunção hepatobiliar em comparação aos grupos controle. O tratamento com LGG não alterou os parâmetros séricos ou o peso corporal dos animais. Não houve diferença na atividade de superóxido dismutase (SOD) entre os grupos. A atividade de catalase (CAT) e os níveis de sulfidrilas foram significativamente menores no grupo BDL em relação aos controles. O tratamento com LGG mostrou uma tendência ao aumento dos níveis de sulfidrilas. A razão SOD/CAT foi maior no grupo BDL em relação aos controles e o tratamento com LGG preveniu este desequilíbrio. O tratamento com LGG mostrou uma tendência a redução da razão SOD / CAT. A expressão gênica de *Tlr4*, *Tnfa* e *Il6* e os níveis de IL1 β foram maiores no grupo BDL em relação ao controle. O tratamento com LGG atenuou parcialmente a elevação de IL1 β e *Tlr4*. O grupo BDL-P teve redução da expressão gênica de *Il6* em relação ao grupo BDL. A expressão gênica de *Tgf β* foi maior no grupo BDL em comparação ao Ctrl. A expressão de metaloproteinases 2 e 9 foi significativamente maior nos grupos BDL e BDL-P, sem diferença em relação ao tratamento com LGG. A deposição de colágeno e a reação ductular avaliado pelo conteúdo de citoqueratina 7 (CK7) foi maior nos animais submetidos a ligadura de ducto biliar. O tratamento com LGG reduziu significativamente a deposição de colágeno e conteúdo de CK7 no fígado em comparação com grupo de BDL. **Conclusão:** O tratamento com LGG foi capaz de reduzir a fibrose hepática, a reação ductular e a expressão gênica de *Il6* em modelo de hepatopatia colestática crônica em ratos.

PALAVRAS-CHAVE: Probióticos, Fibrose hepática, inflamação, *Lactobacillus rhamnosus*

ABSTRACT

Introduction: Liver fibrosis is a wound-healing response to acute or chronic cellular liver injury. Gut-derived products can reach the liver through the portal vein and mediate inflammatory response via TLR4. The increase of inflammatory cytokines induces the activation of stellate cells, periportal fibroblasts and Kupffer cells. The activation of these cells stimulates the secretion of TGF β and the excessive collagen deposition. Thus, modulation of gut microbiota using probiotics could reduce inflammation and hepatic fibrogenesis. **Aim:** To evaluate the effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) on liver fibrosis in a model of cholestatic liver disease in rats. **Methods:** Adult male (n = 29) Wistar rats (299.89 g \pm 42.89 g) were subjected to bile duct ligation (BDL) or the manipulation of common bile duct without ligation (Ctrl). After 14 days, groups were again divided to receive gavagens during 14 days: Ctrl and BDL groups received 1 ml of PBS and Ctrl-P and BDL-P groups, 1 ml of PBS containing 2.5×10^7 CFU of LGG. Euthanasia occurred five days after the end of the treatment when were collected samples of blood and liver tissue. **Results:** The bile duct ligation promoted a reduction in body weight and plasma albumin levels followed by an increase of liver dysfunction parameters in comparison to control groups. LGG treatment did not change serum analyses or body weight of animals. There was no difference in superoxide dismutase activity (SOD) between groups. The catalase activity (CAT) and sulfhydryl levels were significantly lower in the BDL group compared to controls. Treatment with LGG showed a tendency to increase sulfhydryl levels. The SOD / CAT ratio was higher in BDL group compared to controls and treatment with LGG prevented this imbalance. Treatment with LGG showed a tendency to decrease SOD / CAT ratio. The gene expression of *Tlr4*, *Tnfa* and *Il6* and IL1 β levels were higher in the BDL group compared to the control. Treatment with LGG partially attenuated the increase of IL1 β and *Tlr4*. The BDL-P group had decreasing in *Il6* gene expression compared to the untreated group. The gene expression of *Tgf β* was higher in the BDL group compared to the Ctrl. The expression of metalloproteinases 2 and 9 was significantly higher in BDL and BDL-P groups, with no difference in comparison to treatment with LGG. The collagen deposition and ductular reaction evaluated by the content of cytokeratin 7 (CK7) was higher in animals submitted to the bile duct ligation. The hepatic collagen deposition and CK7 content was significantly decreased in BDL-P compared to BDL group. **Conclusion:** Treatment with LGG was able to reduce liver fibrosis, ductular reaction and *Il-6* gene expression in a model of chronic cholestatic liver disease in rats.

Keywords: Probiotics, Liver fibrosis, inflammation, *Lactobacillus rhamnosus*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC: Ácidos graxos de cadeia curta
ALT: Alanina aminotransferase
AST: Aspartato aminotransferase
BDL: ligadura de ducto biliar
BDL-P: grupo com ligadura de ducto biliar que recebeu probiótico
BT: Bilirrubina total
CAT: Catalase
CCl₄: Tetracloreto de carbono
cDNA: DNA complementar
CK7: Citoqueratina 7
CPE-HCPA: Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Ct: Threshold cycle
Ctrl: grupo controle
Ctrl-P: grupo controle que recebeu probiótico
DALY: *Disability adjusted life of years*
DATASUS: Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
ECM: Matriz extracelular
ERO: Espécies reativas de oxigênio
FA: Fosfatase alcalina
GALT: tecido linfoide associados ao intestino
GGT: Gama glutamil transferase
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
HCV: Vírus da hepatite C
HSC: Célula estrelada hepática
IgA: Imunoglobulina A
IL: Interleucina
LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG
LPS: Lipopolissacarídeos
LTA: Ácido lipoteicoico
MAMP: Padrões moleculares associados a micróbios

MELD: *Model for end-stage liver disease*

MF: Miofibroblastos

MHC: *Major Histocompatibility Complex*

MMP: Metaloproteinase de matriz

mRNA: RNA mensageiro

NPP-DGKC: método cinético colorimétrico de hidrólise do p-nitrofenil fosfato da Sociedade
Germânica de Química Clínica

OMS: Organização Mundial da Saúde

PF: Fibroblastos portais

pH: Potencial de hidrogênio

qRT-PCR: Método quantitativo da reação em cadeia da polimerase em tempo real

SH: Sulfidrina

SOD: Superóxido dismutase

STAT3: *Signal transducer and activator of transcription 3*

TGF β : *Transforming growth factor β*

TIMP-1: Inibidor tecidual de metaloproteinases do tipo 1

TLR: Receptores do tipo *Toll*

TNF α : Fator de necrose tumoral α

UAMP: Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas

UEA: Unidade de Experimentação Animal

UFC: Unidades formadoras de colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Origem dos miofibroblastos na lesão hepática.....	12
Figura 2 - Respostas celulares no processo de iniciação.	13
Figura 3 - Diferenças no arranjo celular no fígado normal e no fígado com fibrose hepática.....	16
Figura 4 - Condições luminais e distribuição das bactérias no trato gastrointestinal.	18
Figura 5 - Diagrama esquemático do ducto biliar comum após ligadura de ducto biliar.	36
Figura 6 - Desenho Experimental.	38
Figura 7 - Efeito do <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG sobre o estresse oxidativo.....	47
Figura 8 - Efeito do <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG sobre a expressão gênica de citocinas inflamatórias no fígado.	49
Figura 9 - Efeito do <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG sobre os níveis proteicos de citocinas inflamatórias no tecido hepático.	49
Figura 10 - Efeito do <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG sobre a expressão gênica de marcadores fibrogênicos em tecido hepático.	50
Figura 11 - Aspecto microscópico das lâminas de Picrosirius e CK7 dos diferentes grupos experimentais (100 ×).	51
Figura 12 - Efeito do <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG sobre a quantificação das fibras de colágeno e do imunconteúdo de CK7.	52
Figura 13 - Número de artigos científicos publicados nos últimos 10 anos envolvendo probióticos e doenças hepáticas em geral em comparação aqueles que avaliam o efeito dos probióticos apenas na cirrose.	53
Figura 14 - Papel da disbiose intestinal na fibrogênese hepática.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes padrões de fibrose quanto à causa do dano hepático.....	11
Tabela 2 - Estudos experimentais e ensaios clínicos com uso de probióticos na cirrose.....	23
Tabela 3 - Análise bioquímica e peso corporal dos animais ao final do experimento.....	46

1 INTRODUÇÃO

A fibrose hepática é um processo dinâmico que resulta do progressivo acúmulo de matriz extracelular no fígado com diminuição do seu remodelamento e destruição da arquitetura hepática normal (1). É o caminho final da maioria das doenças hepáticas crônicas causadas por vírus, drogas, doenças autoimunes, metabólicas, entre outras (2). A fibrose hepática tem um impacto importante na saúde pública. Em 2012, cerca de 1 milhão de pessoas morreram em decorrência de doenças hepáticas com fibrose em todo mundo (3).

A deposição dos componentes matriciais, independente dos fatores etiológicos, provoca várias mudanças estruturais no fígado, como capilarização dos sinusoides, perda das microvilosidades hepatocitárias e morte celular (4). Estes processos determinam alterações funcionais que se restringem, inicialmente, ao órgão de origem. Porém, o avanço da doença hepática crônica é acompanhado de repercussões catastróficas em outros tecidos, incluindo sistema digestivo, cardiovascular, renal e nervoso (4, 5).

Vários fatores podem contribuir com o avanço das doenças hepáticas, dentre eles, a microbiota intestinal. Recentemente, Lee & colaboradores alertaram para a existência de um "microbioma fibrogênico" - produto da disbiose e do supercrescimento bacteriano no intestino (6). Neste sentido, vários estudos experimentais e clínicos tem sido propostos a fim de desvendar o impacto do uso dos probióticos em várias doenças hepáticas (7).

Probióticos são micro-organismos vivos (bactérias ou leveduras) que quando consumidos em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (8). Um

dos desafios para sua recomendação na prática clínica está na grande variabilidade de micro-organismos e doses já testados. Embora, existam mecanismos de ação comuns atribuídos aos probióticos, não se pode generalizar os resultados obtido com o uso de uma cepa específica à todos os organismos pertencentes aquele filo ou gênero (9). Em Hepatologia já foram testadas mais de 20 combinações distintas de probióticos com as mais variadas doses e em diferentes entidades patológicas (7).

Desse modo, a realização de estudos com micro-organismos bem descritos e amplamente conhecidos, aumenta a segurança e facilita o entendimento dos possíveis mecanismos envolvidos no seu efeito. Por isso, a proposta desta estudo é avaliar o efeito de um micro-organismo com funcionamento bem definido - o *Lactobacillus rhamnosus* GG - em um modelo tradicional de hepatopatia colestática crônica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fibrose Hepática

A fibrose hepática é a resposta cicatricial a lesões agudas ou crônicas do fígado, considerada o caminho comum a um grande número de doenças hepáticas crônicas (10, 11). A fibrose hepática apresenta causas diversas, dentre elas estão incluídas a exposição à vírus e drogas hepatotóxicas, o consumo crônico de etanol, as doenças autoimunes, metabólicas e gordurosas. Os estímulos lesivos iniciam o processo fibrogênico que se caracteriza pelo aumento da deposição de matriz extracelular (ECM) no tecido hepático. A persistência da fibrogênese é responsável pela progressão a formas mais graves de doença hepática como cirrose e insuficiência hepática (12). A cirrose é definida como um estágio avançado de fibrose hepática caracterizado pela formação de nódulos regenerativos bem definidos (12, 13).

O consumo crônico de álcool e a hepatite C estão entre as principais causas de cirrose, embora o avanço da doença gordurosa do fígado associada à obesidade contribua consideravelmente para as estatísticas (13, 14). No Canadá, estimou-se que o gasto anual de um indivíduo adulto com HCV (Vírus da hepatite C) em 2013 era em torno de 65 mil dólares, com previsão de aumento de 60% até 2032. Dos 161,4 milhões gastos com pacientes infectados por HCV neste país em 2013, 56% foram atribuídos à cirrose e outros estágios avançados de doença hepática (15).

A mortalidade relacionada às doenças hepáticas tem aumentado progressivamente nos últimos anos (16). De acordo com documento da Organização Mundial da Saúde (OMS),

em 2012, a cirrose foi responsável por mais de 1 milhão de mortes em todo mundo, com total de 36 milhões de anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (DALY, do inglês *Disability Adjusted Life of Years*) (3). Na Europa, a cirrose é responsável por mais de 170 mil mortes por ano, o que responde por quase 2% da mortalidade anual no continente (14). Nas Américas, a cirrose foi a 12ª causa de morte (14,4 mortes a cada 100 mil habitantes) em 2012, sendo a 16ª causa de anos de vida perdidos por incapacidade (3). Ela é também a 5ª causa de óbito no Reino Unido e a 12ª nos Estados Unidos da América (5). No Brasil, um levantamento com dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) de 2001 a 2010 mostrou que as doenças hepáticas foram responsáveis por mais de 850 mil internações e 308 mil mortes. Apenas em 2012, a cirrose foi responsável pela morte de 23,9 mil brasileiros, de acordo com a OMS (3, 16).

O mecanismo responsável pela produção de tecido fibroso prevê a participação conjunta de várias células, como miofibroblastos (MF), fibroblastos portais (PF), células estreladas hepáticas (HSC, do inglês *Hepatic Stellate Cell*), colangiócitos, hepatócitos e células tronco mesenquimais (2, 17, 18). Sabe-se que a deposição dos componentes matriciais é comum a toda hepatopatia, no entanto, os mecanismos de fibrose, o grau de envolvimento de determinadas células e o padrão histopatológico podem diferir quanto à origem da doença (**Tabela 1**) (12) Assim, a reação ductular com formação septal entre os espaços porta, comum na cirrose biliar, não é vista na cirrose alcoólica onde a fibrose se distribui em forma de "tela de arame"(12).

Tabela 1 - Diferentes padrões de fibrose quanto à causa do dano hepático.

Padrão de fibrose	Histopatologia	Etiologia e mecanismo	Miofibroblasto envolvido
Pontes fibrosas	Desenvolvimento de septo fibroso que conecta a área portal com a área da veia centro lobular ou diferentes áreas portais.	Infecção viral crônica Doenças autoimunes Estresse oxidativo	Célula estrelada ativada Fibroblasto portal Miofibroblastos da medula
Fibrose Perissinusoidal	Deposição de matriz extracelular no espaço de Disse, em torno dos sinusoides ou hepatócitos, formando um aspecto peculiar de “tela de arame”.	Doença Hepática gordurosa alcoólica e não-alcoólica Estresse oxidativo	Célula estrelada ativada
Fibrose biliar	Reação ductular com formação de septos porta-porta	Colangiopatia Colestática Crônica	Fibroblasto Portal

Fonte: Adaptado de Forbes e Parola, 2011 (12).

Embora o tipo de doença hepática determine vários processos envolvidos com a fibrose, sabe-se que o miofibroblasto hepático representa o sustentáculo do processo fibrogênico independente da origem patogênica (12, 18). Os MF constituem um grupo heterogêneo de células altamente proliferativas e contráteis envolvidas na deposição dos componentes de ECM e no seu remodelamento (19). Estas células atuam também na síntese e liberação de diversos fatores de crescimento, os quais promovem a ativação e a perpetuação de estímulos fibrogênicos, inflamatórios e neoangiogênicos (2, 20). Os MF podem ser originários de diferentes tipos celulares com distintos perfis antigênicos e tropismo por determinados locais do fígado (**Figura 1**). Miofibroblastos originários de fibroblastos portais, por exemplo, são encontrados no tecido conjuntivo em torno dos tratos portais ou na parte interna dos septos fibróticos. Já os miofibroblastos originários das HSC se localizam próximos aos sinusoides capilarizados dos fígados fibróticos (1, 12). Ainda que várias células

possam diferenciar-se em MF, a ativação das HSC permanece sendo o caminho dominante em direção a fibrose hepática (20).

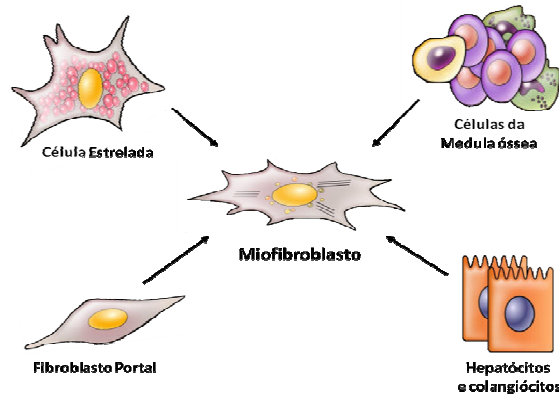


Figura 1 - Origem dos miofibroblastos na lesão hepática.

Fonte: Adaptado de Friedman, 2008 (20).

As células estreladas hepáticas, também conhecidas como células de Ito ou lipócitos, são células perissinusoidais residentes no espaço subendotelial de Disse. As HSC representam cerca de 10 a 15% do total de células de um fígado normal e são responsáveis pelo armazenamento de retinoides (12, 19). Agressões ao fígado promovem a transdiferenciação das HSC, do fenótipo quiescente (lipócito) para o fenótipo ativado (miofibroblastos). Neste processo morfológico e funcional de transdiferenciação, as HSC perdem a capacidade de estocar retinoides e aumentam a produção de colágeno e outros componentes da ECM (21). O processo de ativação das HSC em MF envolve as fases sequenciais de iniciação e a perpetuação.

A iniciação ou fase pré-inflamatória é caracterizada por respostas precoces de expressão gênica estimulada por vários sinais parácrinos, advindos principalmente de hepatócitos e células endoteliais lesadas (**Figura 2**) (6, 12). O estresse oxidativo parece ser um das manifestações mais precoces que determinam a ativação das HSC. Ele pode ocorrer pelo aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) - específica de algumas

etiologias; pela ativação de células inflamatórias ou em resposta à lesão de células do parênquima, como necrose ou apoptose (12). Esta última contribui para inflamação por promover a ativação de células de Kupffer e o recrutamento de células inflamatórias (6, 22). Já na necrose ocorre a liberação de constituintes intracelulares, radicais livres extracelulares, citocinas inflamatórias e moléculas sinalizadoras (1, 4). As ERO são capazes de atuar tanto na regulação de genes pró-fibrogênicos, como o pró-colágeno tipo I e o TIMP-1 (Inibidor tecidual de metaloproteinases), quanto estimular a proliferação das HSC ativadas, já na fase de perpetuação (18, 23). Além disso, células endoteliais e plaquetas, nas fases iniciais de dano hepático, podem participar da fibrogênese por promover a ativação de TGF β (do inglês, *Transforming growth factor* β) - uma citocina fibrogênica indutora imediata da ativação das HSC (4, 21).

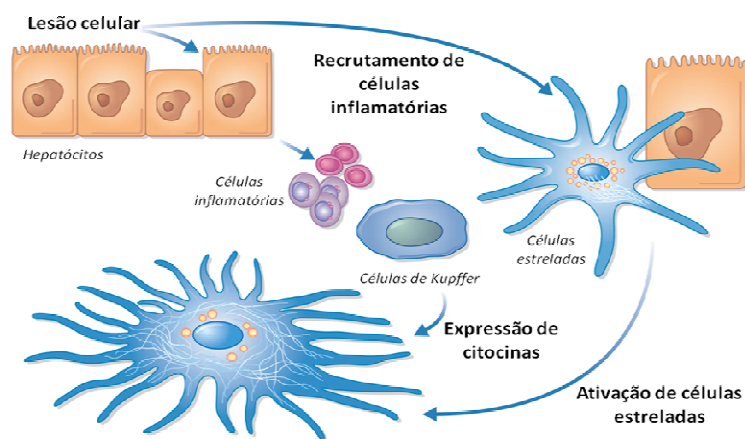


Figura 2 - Respostas celulares no processo de iniciação.

Lesões às células hepáticas, tanto hepatócitos quanto colangiócitos, estimulam o recrutamento de células inflamatórias via recrutamento de células inflamatórias como células T, *Natural Killer* e células de Kupffer. Estas células produzem citocinas e fatores de crescimento que induzem a ativação das células estreladas hepáticas. Fonte: Rockey & Friedman, 2006 (4).

A perpetuação compreende a fase onde a mudança do perfil de expressão gênica, observada na iniciação, se traduz em aumento da deposição de ECM. Ela abrange processos de proliferação celular, aumento da contratilidade, perda de retinoides, quimiotaxia, estímulo à fibrogênese, degradação de ECM e sinalização pró-inflamatória exacerbada (24). O aumento

da fibrogênese é uma das principais conseqüências da ativação da células estreladas para o fígado. Sabe-se que o TGF β é a principal citocina envolvida neste processo embora Interleucina (IL) 1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF α), lipídeos peroxidados e acetaldeído parecem ter alguma ação como sinalizadores pró-fibrogênicos (4).

O TGF β pode ser liberado tanto por células de Kupffer ativadas - no início do dano hepático - quanto pelas próprias HSC quando a doença hepática já está estabelecida (2, 12). O resultado do aumento de TGF β é a intensa produção de matriz extracelular com composição marcadamente diferente daquela observada no fígado normal. Em vigência de lesão hepática, a produção de colágeno e outros componentes aumenta de 3 a 5 vezes. Também o tipo de ECM que compõem o espaço subendotelial sofre alterações: de uma matriz semelhante a membrana basal, de baixa densidade e bastante permeável à uma matriz intersticial de alta densidade e rígida. De acordo com Rockey & Friedman, este processo - conhecido como "capilarização sinusoidal" - leva à perda das microvilosidades dos hepatócitos e ao desaparecimento da fenestração endotelial (4).

Acredita-se que este cenário seja o resultado do desequilíbrio entre o excesso de deposição fibrilar e a redução na degradação e remodelamento de ECM (12). As HSC ativadas apresentam um perfil gênico que favorece a deposição de matriz em detrimento a degradação. Isso se traduz pela baixa expressão de metaloproteinase de matriz (MMP) do tipo 1 - uma colagenase intersticial - acompanhada de elevados níveis de colagenases pouco eficientes para degradação fibrilar (MMP2 e MMP9) e de alta expressão de TIMP1 (12, 25).

A resposta inflamatória intensa da fase de perpetuação é considerada uma das principais forças que sustentam a fibrogênese (12). A necrose, seguida da ativação das células de Kupffer são apenas os estímulos iniciais que direcionam à sinalização inflamatória (26). Esta sinalização induz a ativação das HSC que passam a ser mediadores centrais na cascata inflamatória associada a fibrose (4). As HSC ativadas contribuem para a persistência da

inflamação e amplificação da resposta de fase aguda pela secreção de IL6 e em resposta a outros estímulos inflamatórios como IL1 β , TNF α e lipopolissacarídeos (LPS) (2, 20). Além disso, as HSC também atuam como alvo para mediadores com potencial inflamatório como as ERO, os corpos apoptóticos, as endotoxinas bacteriana ou outros ativadores endógenos dos receptores do tipo *Toll* 4 (TLR4) (12).

Além das HSC, outras células também contribuem para a manutenção do estímulo inflamatório. As células do endotélio sinusoidal, especialmente quando da capilarização dos sinusoides, comportam-se como indutores da expressão de moléculas pró-inflamatórias, ativando rotas angiogênicas em resposta a hipoxemia local causada pela perda das fenestrações (4). As células de Kupffer e monócitos infiltrados no tecido hepático também participam da sinalização inflamatória por serem fontes primárias da produção de TNF α , IL6 e IL1 β (27).

Por outro lado, tanto células de Kupffer quanto HSC são capazes de produzir resposta anti-inflamatória em determinadas situações. As células de Kupffer produzem IL10 em resposta a doses fisiológicas de LPS. Já as HSC aumentam a expressão de IL10 nos estágios iniciais da sua ativação. A IL10 é uma citocina anti-inflamatória com importante efeito antifibrótico por reduzir a expressão de colágeno e estimular a produção de colagenases (2).

O saldo final da fase de perpetuação será a formação de uma “cicatriz” constituída marcadamente por colágeno tipo I, um colágeno maduro. No fígado, a deposição exacerbada de colágeno provoca várias mudanças estruturais (**Figura 3**). Inicialmente ocorre mudança fenotípica das HSC e células de Kupffer que sofrem ativação e aumentam sua proliferação. Em seguida, o aumento da deposição de matriz extracelular promove a perda das fenestrações e capilarização dos sinusoides. Como consequência, os hepatócitos passam a ter menor acesso

a nutrientes e oxigênio, resultando num primeiro momento em perda das microvilosidades, e em seguida em morte celular.

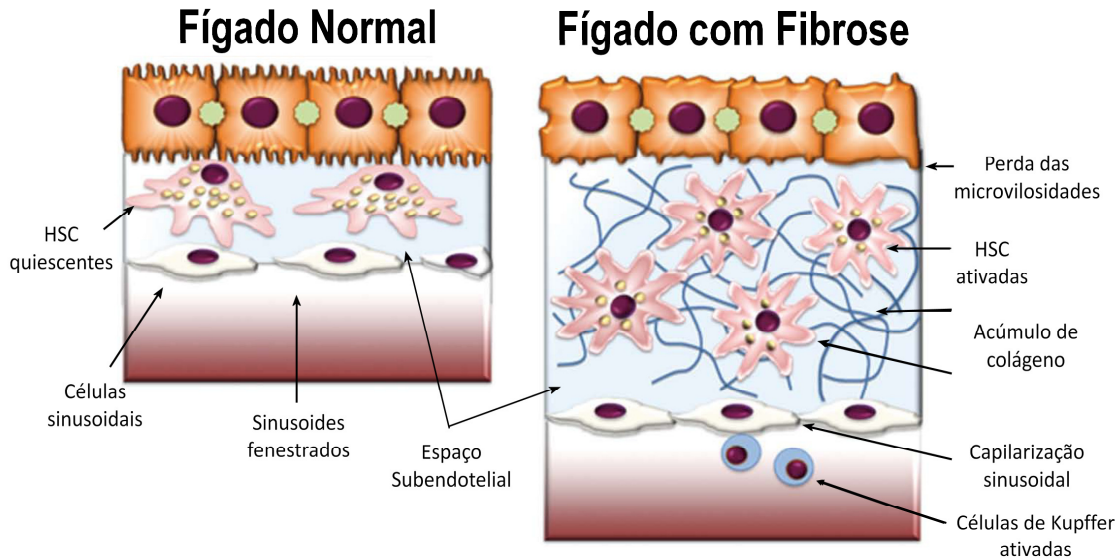


Figura 3 - Diferenças no arranjo celular no fígado normal e no fígado com fibrose hepática.

Fonte: Adaptado de Elpek, 2014 (1).

A fibrose biliar tem um mecanismo um pouco diferente das fibroses de causa alcoólica, viral e gordurosa. Nas doenças colestáticas a redução do fluxo biliar causa aumento da pressão nas vias biliares que, associado com o efeito tóxico dos ácidos biliares hidrofóbicos, promovem lesão aos colangiócitos e destruição dos ductos biliares (28). O dano ao epitélio biliar libera mediadores inflamatórios, especialmente IL6, que induz a diferenciação de fibroblastos portais em miofibroblastos (29).

Fibroblastos portais são células fibrogênicas localizadas e originadas na região periportal (21). No fígado normal, os PF expressam ectonucleotidases que hidrolisam nucleotídeos extracelulares tornando-os incapazes de interagir com receptores responsáveis pela proliferação dos colangiócitos. No entanto, obstruções biliares levam a ativação de miofibroblastos portais que aumentam a concentração destes nucleotídeos resultando em estímulo a proliferação de colangiócitos (30). Este mecanismo é o responsável pela reação

ductular - achado comum em diversas hepatopatias, especialmente as colestática (31). A intensidade da reação ductular parece ter correlação direta com a gravidade da fibrose não apenas nas doenças colestáticas, mas também em doenças hepáticas das mais variadas etiologias, incluindo hepatites virais e alcoólicas (12, 29).

A proliferação ductular e a ativação de PF promovem o aumento da expressão de IL6 e TGF β . Nas células estreladas, estas citocinas induzem a transdiferenciação do estado quiescente para o estado ativado. Dessa forma, a diferenciação de PF que ocorre nos estágios iniciais da fibrose biliar, promove a ativação sequencial de HSC. Por isso, postulou-se que os fibroblastos portais sejam os "primeiros respondedores" no dano biliar, logo suplantados pela ação das HSC (29, 32).

Assim, alguns eventos parecem ser comuns a todas as formas de fibrose. São eles: lesão celular inicial, liberação de espécies reativas de oxigênio, sinalização inflamatória, ativação de miofibroblastos e toda sua cascata de reações (33)

2.2 Microbiota intestinal e o eixo entero-hepático

O corpo humano é habitado por um amplo número de bactérias, vírus, fungos e outros micro-organismos que compreendem uma população estimada em 10^{14} micro-organismos - um número 10 vezes maior que o número de células do corpo (34, 35). A microbiota intestinal responde por mais de 99% da população bacteriana que habita o ser humano sendo que cerca de 70% destas bactérias encontram-se no intestino grosso (36). Entende-se por microbiota intestinal o conjunto de micro-organismos residentes no intestino (tanto grosso como delgado) que coexistem em harmonia com o hospedeiro. A maioria destes micro-organismos são anaeróbios estritos ou facultativos, pertencentes majoritariamente aos

filos Bacteroidetes e Firmicutes, embora Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria e Cyanobacteria possam estar presentes em menores proporções (34).

A distribuição de bactérias dentro do trato gastrointestinal depende de fatores relacionados a espécie e as condições de colonização, como motilidade, pH (potencial de hidrogênio), pressão de oxigênio, disponibilidade de nutriente e secreções do hospedeiro (saís biliares, enzimas) (37). Assim, a população bacteriana é crescente em direção ao cólon, que chega a ter 10^{12} células bacterianas por grama de conteúdo colônico e abarca condições favoráveis de proliferação como baixa velocidade de transito, pH neutro a básico, ausência de secreções digestivas e baixa pressão de oxigênio (**Figura 4**) (38).

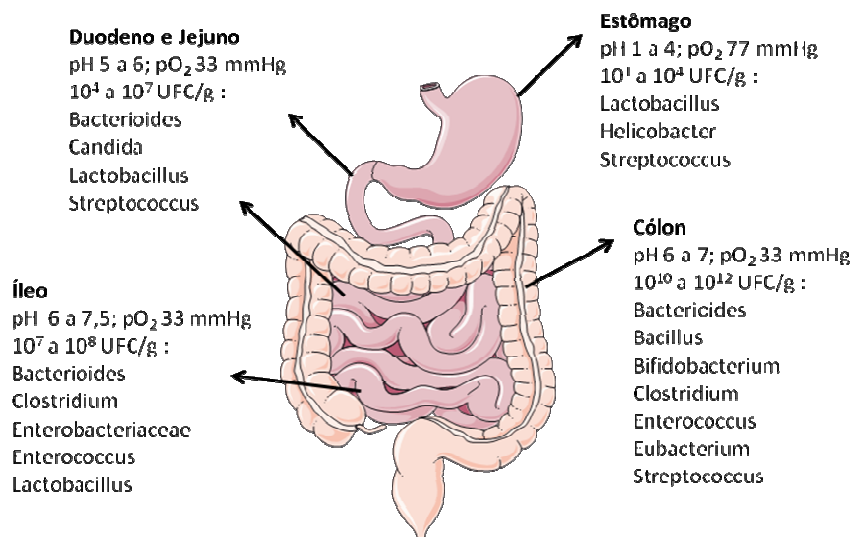


Figura 4 - Condições luminiais e distribuição das bactérias no trato gastrointestinal.

Fonte: Adaptado de Isolauri *et al*, 2004 (34, 39-41)

A microbiota intestinal é composta por dois grandes grupos de micro-organismos: as espécies autóctones ou residentes e as espécies transientes (42). Para ser considerado residente, o micro-organismo necessita ser repetidamente isolado ao longo de pelo menos 3 semanas (42). A microbiota transiente é bastante variável e está diretamente relacionada a alimentação, hábitos de vida e uso de medicamentos. Já a microbiota autóctone se mantém

estável ao longo dos anos e tem vantagem ecológica sobre as bactérias transientes, sendo relativamente difícil a implantação deliberada de outras espécies (42, 43).

A colonização bacteriana depende da interação da bactéria com o hospedeiro. Assim, locais onde o ambiente não é favorável para a fixação possuem essencialmente bactérias transientes, como é o caso do duodeno e jejuno. Dentre os micro-organismos transientes estão os probióticos, que em sua maioria não colonizam o trato digestivo mas sobrevivem durante o trânsito digestivo (43). As características dos micro-organismos também influenciam na habilidade de colonização. Bactérias ácido-lácticas, por exemplo, produzem ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) durante a fermentação de açúcares o que reduz o pH local. O ambiente ácido favorece multiplicação de Firmicutes (tolerantes ao pH ácido) porém dificulta a proliferação de Bacteroidetes que apresentam crescimento prejudicado em $\text{pH} < 6$ (37).

A microbiota intestinal, em geral, estabelece relação mutualista com o hospedeiro. Dessa forma, uma microbiota saudável promoveria:

- **Redução da permeabilidade intestinal:** micro-organismos residentes encontram-se aderidos ao muco de forma a criar uma “película” que dificulta a adesão de micro-organismos patogênicos. A microbiota também modula a expressão de junções apertadas e outras proteínas envolvidas na barreira intestinal (44, 45);

- **Funções metabólicas:** a microbiota intestinal é capaz de sintetizar vitaminas do complexo B e K. Produz também AGCC cuja oxidação fornece 10% da energia diária;

- **Imunomodulação:** a microbiota intestinal aumenta a produção de imunoglobulina (Ig) A secretória e interage com o sistema imune intestinal aumentando sua eficácia contra patógenos (46);

- **Ação contra bactérias patogênicas:** a microbiota autóctone compete por nutrientes e secretam defensinas na luz intestinal como estratégia contra micro-organismos patogênicos e para evitar a proliferação de patobiontes (47).

Além dos papel de defesa exercidos pela microbiota intestinal é importante que o hospedeiro desenvolva mecanismos para evitar a entrada inadvertida de micro-organismos no organismo. De fato, o intestino é continuamente exposto a uma ampla variedade de partículas e micro-organismos potencialmente patogênicas, através da alimentação e dos hábitos de vida. Por esse motivo, epitélio intestinal se organiza de forma a funcionar como uma grande barreira física a entrada de diversos componentes nocivos (46).

Os enterócitos são as principais células envolvidas na função de barreira intestinal e apresentam junções apertadas bastante desenvolvidas, responsáveis por impedir a permeabilidade intestinal. Além da barreira física, o intestino também conta uma barreira imunológica contra invasores (45). O sistema imune intestinal é um importante regulador do crescimento bacteriano e é formado por imunoglobulinas e tecido linfóide associados ao intestino (GALT, do inglês, *gut-associated lymphoid tissue*)(48). Além disso, os enterócitos também podem atuar como células apresentadora de antígenos, expressando moléculas MHC (*Major Histocompatibility Complex*) classe II e receptores do tipo *Toll* (TLR) (49).

O fígado é o primeiro órgão que entra em contato com as moléculas provenientes da digestão intestinal (50). Cerca de 70% do suprimento sanguíneo intestinal chega ao fígado via veia portal (51). Por isso, alterações na microbiota e/ou na permeabilidade intestinal podem promover a translocação de micro-organismos ou componentes derivados do seu metabolismo para o tecido hepático (52). É no fígado que ocorre a metabolização dos nutrientes e a detoxificação de produtos microbiológicos e tóxicos derivados do intestino. Cerca de 80% das endotoxinas endovenosas são detectadas no fígado dentro de 20 a 30 minutos (53).

Distúrbios da microbiota intestinal, em particular o supercrescimento de bactérias do intestino delgado, ocorrem em 20 a 75% dos pacientes com doença hepática crônica (51, 54-56). Isso se deve à perturbações do trato gastrointestinal tais como redução da secreção ácida do estômago, hipertensão portal, diminuição da motilidade intestinal, aumento do pH luminal, redução dos ácidos biliares e desnutrição (35, 50, 56). Do ponto de vista de competência da barreira intestinal, a doença hepática crônica com hipertensão portal promove a redução de junções apertadas, o alargamento dos espaços intercelulares intestinais, a congestão vascular na mucosa intestinal e a deficiência de Ig A luminal (45, 53). Estes efeitos terminam por facilitar a translocação de micro-organismos e/ou outros componentes bacterianos do lúmen intestinal até linfonodos mesentéricos ou órgãos extraintestinais, como o fígado (51, 53, 54).

Os produtos da translocação bacteriana podem induzir resposta inflamatória no fígado do hospedeiro (52). O sistema imune humano reconhece padrões moleculares associados à micróbios (MAMP) como invasores. Esse reconhecimento promove uma sinalização de alerta ao organismo, atuando principalmente via TLR (52, 53). A função dos TLR é sinalizar a presença de patógenos ao organismo, sendo amplamente expressos em células sinusoidais, biliares, hepatócitos, células de Kupffer e em HSC (54). O TLR4 é ativado principalmente por lipopolissacarídeos presentes na parede celular das bactérias Gram-negativas, sendo o MAMP mais estudado em relação a sinais patogênicos derivados do intestino (52, 53). As células de Kupffer são as primeiras células a perceber a presença de endotoxinas intestinais (53, 54). Após a ligação do LPS ao TLR4, estas células rapidamente expressam citocinas inflamatórias como TNF α , TGF β , IL1 β IL6 e IL18. Embora a ligação LPS-TLR4 não promova a ativação das HSCs, a cascata pró-inflamatória resultante dessa reação pode induzir a ativação destas células e aumentar sua resposta ao TGF β (26, 57)

O papel da ligação LPS-TLR4 na fibrogênese hepática é de tal forma pronunciado que estudos envolvendo ratos mutantes deficientes de TLR4 mostraram resistência ao desenvolvimento de fibrose hepática em comparação ao animal *wild-type* (58). Neste mesmo estudo, ratos com supressão plasmática de TLR submetidos à ligadura de ducto biliar apresentaram redução da fibrose hepática em comparação ao controle, sem interferência nos níveis de LPS (58). Nesse cenário, a modulação da microbiota bacteriana no sentido de reduzir a liberação de LPS, parece representar um aspecto promissor no manejo da fibrose hepática.

2.3 Probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG

Probióticos são micro-organismos vivos (bactérias ou leveduras) que quando consumidos em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (8). Esses benefícios incluem: redução do pH intestinal e da permeabilidade intestinal, competição com bactérias patogênicas, imunomodulação e a produção de compostos nutritivos ao epitélio intestinal (59). Os probióticos já foram testados em diferentes hepatopatias, tais como cirrose e suas complicações (encefalopatia hepática, peritonite bacteriana e hipertensão portal), doença gordurosa alcoólica e não alcoólica, entre outras (60-62). O raciocínio para o seu uso tem alicerce nos benefícios dos probióticos sobre a homeostase do eixo entero-hepático, traduzido por aumento da barreira intestinal, reduções na endotoxemia, inflamações e níveis de amônia circulantes (63, 64). Vários probióticos tem sido utilizados com sucesso nos estudos envolvendo fibrose ou cirrose (**Tabela 2**). No entanto, os efeitos descritos a um probiótico só podem ser atribuídos à cepa analisada, e não devem ser generalizados para toda a espécie de probióticos (9).

Tabela 2 - Estudos experimentais e ensaios clínicos com uso de probióticos na cirrose.

Micro-organismo	Associação	Dose diária	Modelo	Desfecho
<i>Pediococcus pentoseceus</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Prebiótico	10 ¹⁰ UFC	Cirrose em Humanos	Encefalopatia Hepática (65)
<i>Bifidobacterium longum w11</i>	Prebiótico e Vitaminas	5 × 10 ⁹ UFC	Cirrose em Humanos	Encefalopatia Hepática (66)
<i>E. coli</i> Nissle	Não	2,5 - 25 × 10 ⁹ UFC	Cirrose em Humanos	Complicações da cirrose (63)
VSL#3 [®]	Não	9 × 10 ¹¹ UFC	Cirrose em Humanos	Pressão portal (67)
VSL#3 [®]	Não	9 × 10 ¹¹ UFC	Cirrose em Humanos	Complicações da cirrose (68)
VSL#3 [®]	Não	3 × 10 ⁹ UFC	Cirrose em Humanos	Encefalopatia Hepática (69)
VSL#3 [®]	Não	9 × 10 ¹¹ UFC	Cirrose em Humanos	Hipertensão portal (70)
VSL#3 [®]	Não	4,5 × 10 ¹¹ UFC	Cirrose em Humanos	Encefalopatia Hepática (71)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Não	2 cápsulas por dia	Cirrose em Humanos	Encefalopatia Hepática e endotoxemia (72)
<i>Lactobacillus paracasei</i> B21060	Prebiótico e glutamina	2 × 10 ⁸ UFC/kg	Modelo animal induzido por CCl ₄	Inflamação e permeabilidade intestinal (73)
VSL#3 [®]	Não	5 × 10 ¹⁰ UFC/kg/dia	Modelo animal induzido por BDL	Hipertensão portal (74)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Selênio	10 ⁹ UFC	Modelo animal induzido por CCl ₄	Estresse oxidativo, inflamação e apoptose no fígado (75)
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CECT7765	Não	10 ⁹ UFC	Modelo animal induzido por CCl ₄	Permeabilidade intestinal e translocação (76)
VSL#3 [®]	Não	0,01285 × 10 ⁹ UFC/kg/dia	Modelo animal induzido por CCl ₄	Translocação bacteriana (77)
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CECT7765	Não	10 ⁹ UFC	Modelo animal induzido por CCl ₄	Permeabilidade intestinal (78)

O probiótico VSL#3[®] é composto pelos seguintes micro-organismos: *Lactobacillus paracasei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *Streptococcus thermophilus*.

O probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) é uma bactéria Gram-positiva anaeróbica, pertencente ao filo Firmicutes (79). No início da década de 1980, pesquisadores sabiam que as espécies tradicionalmente utilizadas para a fermentação de laticínios na indústria não eram capazes de aderir ao intestino dos seres humanos. Por isso, estavam a procura de uma cepa de *Lactobacillus* pertencente a microbiota saudável dos seres humanos que apresentasse as seguintes características:

- Boa adesão as células intestinais e
- Capacidade de colonizar o trato gastrointestinal de seres humanos;
- Resistente as secreções ácidas, enzimáticas e biliares;
- Produção de substâncias antimicrobianas;
- Produção de efeitos benéficos à saúde do hospedeiro.

Foi em 1985 que os pesquisadores Sherwood Gorbach e Barry Goldin isolaram pela primeira vez das fezes de humanos uma cepa de *Lactobacillus* que preenchia estes requisitos. Eles a nomearam *Lactobacillus rhamnosus* da cepa GG, como referência as iniciais dos seus nomes (Gorbach & Goldin) (79). Assim, o descobrimento do LGG se deu apenas por seleção natural, não havendo qualquer tipo de manipulação genética ou mutação (79).

Eles também perceberam que o LGG apresentava características que o diferenciavam das demais bactérias da subespécie *rhamnosus*, como o fato de não fermentar lactose, rafinose, maltose e sacarose (80). Essa característica permitiu a utilização do teste de fermentação de lactose para sua identificação (81). Outras características do LGG incluem o crescimento preferencial em ambiente anaeróbico, a produção de substâncias antibacterianas e a fermentação de trealose, sorbitol, manitol, glicose, frutose, ramnose, entre outros (80).

O LGG também produz substâncias bactericidas e bacteriostáticas específicas contra bactérias como *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*, sem no entanto atingir outros *Lactobacillus* (82, 83). Embora vários *Lactobacillus* produzam bacteriocinas, elas geralmente são suscetíveis à proteases de alto peso molecular e com espectro limitado de atividade antimicrobiana (80). Já as substâncias encontradas no LGG apresentam baixo peso molecular e possuem atividade antimicrobiana que atinge amplamente bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo até mesmo algumas bactérias ácido lácticas. As características físico-químicas destas bacteriocinas conferem resistências a várias proteases, como bromelina, tripsina, quimiotripsina e carboxipeptidases (80, 82).

Uma das mais importantes características do LGG é sua capacidade de adesão a mucosa intestinal, em comparação a outros *Lactobacillus* (82). Sabe-se que os constituintes da superfície bacteriana interagem com outras bactérias e com hospedeiro. No caso do LGG, sua superfície é recoberta por múltiplas fímbrias (entre 10 a 50 por célula) que atuam na interação adesiva com o muco e as células epiteliais (84). As fímbrias encontrada no LGG desempenham um papel fundamental na formação de biofilmes, na adesão eficiente na linhagem de células epiteliais intestinais Caco-2 e na inibição da aumento de IL8 induzido pelo ácido lipoteicoico (LTA) (83). O LTA é uma endotoxina de bactérias Gram-positivas equivalente ao LPS no que se refere ao estímulo imune (82). No entanto, diferente do LPS que é ativo em quantidades de nanomolares, o LTA induz atividade biológica apenas em concentrações na ordem de micromolares (85). A interação do LTA com o epitélio intestinal gera um ambiente de microinflamação com recrutamento de células de sistema imune (células B) via TLR2 e aumento da secreção de IgA, favorecendo a proteção do hospedeiro contra patógenos (86). Além disso, o LGG possui uma proteína em sua superfície que apresenta

homologia com o domínio de uma conhecida proteína de adesão do muco. Ela é distribuída por toda a superfície do LGG e participa na adesão entre LGG e mucosa intestinal (83, 87).

O uso de LGG parece ser seguro e bem tolerado em diversas faixas etárias, uma vez que, dentre dezenas de estudos, pouco são os casos de eventos adversos reportados (72, 88-91). Os efeitos adversos mais comuns já relatados para o consumo de probióticos incluem flatulência, diarreia e distensão abdominal (82, 89, 92). No entanto, existe preocupação quanto a possibilidade de infecção decorrente do uso de probióticos. Pesquisadores Finlandeses reportaram um caso de abscesso hepático positivo para LGG, em um idosa que consumiu diariamente em torno de meio litro de produtos lácteos com adição de LGG durante 4 meses (15 litros ou $7,5 \times 10^{11}$ UFC por mês) (92). O uso de LGG também causou sepse em crianças menores de 1 ano com nutrição parenteral total por defeitos congênitos no trato gastrointestinal. Nestes casos, as bactérias mostraram sensibilidade a ampicilina (93). Em pacientes imunossuprimidos também foram reportados casos de infecções (94).

Na década de 1990, o LGG foi introduzido nos produtos lácteos produzidos na Finlândia. Já em 1999, o consumo anual de LGG estava em torno 3×10^{11} UFC por pessoa ou 6 litros de produtos lácteos per capita. Apesar do aumento expressivo no consumo de LGG, não foi identificado aumento na bacteremia causada por *Lactobacillus* naquele período, permanecendo a taxa de 0,3 casos/100 mil habitantes por ano de 1995 a 2000. Neste período, dos 48 casos confirmados de infecção por *Lactobacillus*, 11 pertenciam a cepa *L. rhamnosus* GG (95). Em Estocolmo, de 1999 a 2004, a incidência de bacteremia causada por *Lactobacillus* foi menor que 1%, sendo que não foram identificados casos de infecção causada por LGG (96).

Assim, o LGG tem sido utilizado em diversos estudos envolvendo diarreias, alergias, úlcera gástrica, síndrome do intestino irritável, dislipidemia e doenças hepáticas, com bons resultados (9, 97-99). A utilização do LGG em hepatopatias concentra-se, até o

momento, nas doenças hepáticas gordurosas, tanto alcoólica quanto não-alcoólicas (97, 98). Na doença gordurosa hepática não-alcoólica induzida por dieta com alto teor de frutose em camundongos, o uso de 5×10^7 UFC/kg de peso corporal fortaleceu a barreira intestinal com consequente redução da endotoxemia, inflamação e acúmulo de gordura hepática (100). Ratos induzidos a esteatose hepática por dieta rica em gordura mostraram aumento na expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos, com melhora na sensibilidade à insulina e redução no acúmulo de gordura no fígado, com uso diário de 10^8 UFC de LGG durante 13 semanas (101). Além disso, crianças obesas com hipertransaminasemia e exame ultrassonográfico sugestivo de esteatose hepática que receberam LGG (12×10^9 UFC) por 8 semanas, apresentaram redução dos valores de alanina aminotransferase, a despeito da manutenção do índice de massa corporal e gordura visceral (98).

Há estudos envolvendo doença hepática alcoólica e LGG. Em modelo de esteato-hepatite alcoólica em ratos, o tratamento com LGG ($2,5 \times 10^7$ UFC) promoveu melhora no padrão histológico e perfil inflamatório do fígado, bem como redução na permeabilidade intestinal (97). Camundongos expostos ao etanol por 8 semanas tiveram redução da endotoxemia e da esteatose hepática quando tratados com 10^9 UFC de LGG (102). *In vitro*, pesquisadores observaram que a adição de *Lactobacillus* GG preveniu a disfunção epitelial induzida por álcool em células Caco-2 (102). Além disso, o uso prévio de 10^9 UFC de LGG por 5 dias foi capaz de reduzir a esteatose hepática e a expressão de TNF α induzida por exposição aguda à 6 g/kg de etanol (103). Em 2013, Wang & colaboradores observaram redução da expressão de TNF α e TLR4 no fígado com o uso de LGG por 2 semanas em animais com doença hepática gordurosa alcoólica (104). Já em modelo de esteatose hepática alcoólica em Zebrafish, realizado em nosso laboratório, o uso de LGG promoveu a redução do conteúdo de colesterol e triglicérides no fígado (105). O LGG (10^9 UFC/dia) também foi capaz de prevenir o aumento da expressão de genes lipogênicos e a diminuição da

fosforilação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato em ratos expostos cronicamente ao etanol (106). Shi & colaboradores mostraram que ratos expostos ao álcool desenvolvem esteatose hepática com aumento de gordura saturada no fígado e redução desta nas fezes. Neste experimento, o tratamento com LGG tanto reduziu a esteatose e o acúmulo com gordura saturada no fígado enquanto aumentou a presença de gordura saturada nas fezes (107).

Até o momento apenas 3 estudos avaliaram o efeito do LGG no contexto de fibrose ou cirrose. Em 2002, Bauer e colaboradores não encontraram efeito sobre a translocação bacteriana com uso de $1-2 \times 10^8$ UFC / dia durante 10 dias em ratos ascíticos induzidos à cirrose por tetracloreto de carbono (108). Cheng *et al.* relataram casos bem sucedidos de descolonização de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina em pacientes com quadro avançado de cirrose. Nestes casos foi aplicado um protocolo específico para descolonização que incluía limpeza intestinal com propilenoglicol, uso de antibiótico oral, descontaminação ambiental e uso 80 mg de LGG por 5 dias (109). Em 2014, Bajaj & colaboradores conduziram um ensaio clínico randomizado com o intuito inicial de avaliar a segurança e a tolerabilidade do uso de LGG em pacientes cirróticos adultos com encefalopatia mínima (72). Neste estudo, os pacientes foram randomizados 1:1 para receber 1 cápsula de LGG (n = 14) ou placebo (n = 16) 2 vezes ao dia. Foram excluídos pacientes com consumo de álcool, episódio de sangramentos, uso de antibiótico, carcinoma hepatocelular, em tratamento para encefalopatia e uso de medicação psicoativa nos últimos 6 meses ou uso de probiótico nas últimas 2 semanas. Eles observaram um aumento significativo nos episódios de diarreia no grupo LGG em comparação ao placebo sem alteração no score MELD (*Model for end-stage liver disease*) ou níveis de amônia sanguíneos. Foi observada redução nos níveis séricos de endotoxinas e TNF α com impacto benéfico sobre a disbiose intestinal (aumento de Firmicutes e redução de Bacteroides) com o tratamento com LGG (72).

A despeito destes estudos, até o momento, o impacto do uso de LGG sobre a fibrose hepática ainda não foi alvo de estudo. Dada a larga aplicação do LGG e os benefícios comprovados em outras doenças, seriam importante a utilização deste *Lactobacillus* em modelos de fibrose, como o BDL, com o intuito de explorar seus efeitos e possíveis mecanismos de ação.

2.4 Modelo de Ligadura de ducto biliar

A ligadura de ducto biliar (BDL) é um modelo que determina fibrose biliar secundária. Neste modelo, a redução do fluxo biliar induzida pela obstrução do ducto biliar comum resulta em reação ductular, inflamação e fibrose, estimulada pelo efeito tóxico dos ácidos biliares e pelo aumento na pressão intrabiliar (110, 111). Este modelo consiste do isolamento do ducto biliar comum, pós-laparotomia, seguido da realização de duas ligaduras: uma a montante do ducto pancreático e outra abaixo da junção dos ducto biliares. Após as ligaduras, o ducto é seccionado para impedir o refluxo de conteúdo biliar (112).

As primeiras 48 horas após a ligadura são marcadas pelo aumento das áreas de infarto biliar, dano hepatocelular e início da proliferação biliar, traduzido por valores aumentados de alanina aminotransferase sérica e citoqueratina tecidual (111). Os exames bioquímicos que avaliam fluxo biliar, como fosfatase alcalina, gamaglutamil transferase e bilirrubina, aumentam de forma importante nos primeiros 7 dias e permanecem altos a partir de então. A inflamação é também pronunciada no modelo BDL. Infiltração de células imune ocorrem 8 horas após a ligadura, sendo representada essencialmente por neutrófilos nos primeiros 3 dias. Aumento importante nas células de Kupffer são observados por volta da 2ª semana, sem alterações significativas antes deste período. A partir do 5º dia pós ligadura, um

número crescente de células T é detectado nos tratos portais os quais são encontrados até a 6ª semanas após a ligadura do ducto biliar (111).

A fibrogênese no modelo BDL inicia por volta do 3º dia, onde existem elevações no colágeno, TIMP-1, TGFβ, MMP2 e MMP9 (111, 113). A deposição de colágeno é visível na 1ª semana e máxima no 14º dia. A deposição de colágeno, a reação ductular e a expressão de MMP2 e 9 não tem acréscimos importantes após o 14º pós ligadura (111, 113).

Com a cronificação do processo de fibrose são observados sinais clínicos semelhantes a cirrose como hipertensão portal, *shunts* porto-sistêmicos e ascite. No entanto, a presença de nódulos regenerativos como os observados em pacientes com cirrose decorrente da obstrução biliar extra-hepática não é frequente (112). Entre a 5ª e 6ª semana pós-cirúrgica a mortalidade no modelo BDL é elevada (em torno de 20% em ratos) e está relacionada com a gravidade da doença hepática (112).

O eixo entero-hepático tem ganhado notório espaço nos últimos anos em razão da sua importância no fluxo de potenciais patógenos ao fígado. É pautado neste entendimento que a modulação da microbiota intestinal aparece como uma alternativa terapêutica para redução do avanço da fibrose hepática.

3 JUSTIFICATIVA

A possibilidade da modulação da microbiota intestinal parece uma alternativa promissora devido a sua intrínseca relação com a translocação de substâncias potencialmente inflamatórias até o fígado.

Neste sentido, é importante que o estudo desta relação se dê em um modelo bem estabelecido de doença hepática, onde todas as etapas da progressão da doença estejam bem documentadas. A escolha do probiótico é igualmente importante pois sabe-se que espécies diferentes podem ter ações distintas na microbiota intestinal. O *Lactobacillus rhamnosus* GG é um probiótico conhecido desde 1985 que tem sido amplamente estudado tanto por seus benefícios quanto na identificação de possíveis efeitos adversos.

Assim, conhecer o efeito do *Lactobacillus rhamnosus* GG em uma hepatopatia crônica pode ser um passo significativo no entendimento do seu papel sobre a progressão da fibrose hepática.

4 QUESTÃO DE PESQUISA

O tratamento com o *Lactobacillus rhamnosus* GG em um modelo murino de hepatopatia colestática crônica poderia reduzir a fibrose hepática?

5 HIPÓTESE

O tratamento com o *Lactobacillus rhamnosus* GG pode reduzir fibrose hepática em ratos com hepatopatia colestática crônica.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento do *Lactobacillus rhamnosus* GG na fibrose hepática em modelo de hepatopatia colestática crônica em ratos.

6.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do *Lactobacillus rhamnosus* GG na evolução ponderal;
- Analisar o efeito do *Lactobacillus rhamnosus* GG nos parâmetros de disfunção hepática em ratos submetidos a ligadura de ducto biliar;
- Caracterizar o efeito do probiótico sobre o estresse oxidativo no tecido hepático dos animais induzidos à fibrose hepática;
- Avaliar o impacto do tratamento de hepatopatia colestática crônica com *Lactobacillus rhamnosus* GG sobre marcadores inflamatórios e fibrogênicos no fígado;
- Determinar o efeito do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG sobre a deposição de colágeno e reação ductular em tecido hepático.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Locais

Os animais foram alocados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CPE-HCPA).

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório Experimental de Gastroenterologia e Hepatologia, na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) e no Laboratório de Patologia, do CPE-HCPA.

7.2 Modelo experimental

O modelo de ligadura de ducto biliar e o desenho experimental deste estudo foram, inicialmente, padronizados para avaliação de encefalopatia hepática no período de 6 semanas (anexo I). Na tentativa de otimizar o tempo experimental, foi realizado estudo piloto com a mesma configuração porém no período de 4 semanas. Este experimento revelou grau semelhante de disfunção hepática porém com menor mortalidade.

Para a execução do experimento, ratos Wistar machos (n = 29) com 2 meses de idade e peso de 299,89 g \pm 42,89 g foram aleatoriamente alocados em dois grupos experimentais: o grupo que foi submetido ao procedimento de ligadura de ducto biliar (n = 17) e o grupo controle cirúrgico (n = 12). Para o procedimento cirúrgico de ambos os grupos foi utilizada cetamina (90 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg) para indução anestésica. Foi realizada

tricotomia e antisepsia do abdômen utilizando tintura de iodo a 2%. Em seguida os ratos foram acomodados na posição supina em uma placa térmica a 37°C para assegurar a temperatura corporal durante o procedimento cirúrgico e evitar a hipotermia.

O procedimento cirúrgico foi realizado conforme descrito por nosso grupo em artigo publicado em 2012 e de acordo com a técnica proposta por Kountouras et al (114, 115). Para a cirurgia, ambos os grupos sofreram incisão abdominal seguida da exposição e inversão do fígado para visualização do ducto biliar comum. Duas ligaduras foram realizadas: uma próxima a junção dos ductos biliares hepáticos e outra acima da junção dos ductos pancreáticos e biliar (**Figura 5**). O espaço entre as ligaduras foi seccionado para garantir a impossibilidade de fluxo biliar. Os animais do grupo controle cirúrgico tiveram apenas manipulação do ducto biliar comum após a exposição e inversão hepática sem a realização de qualquer ligadura. Em ambos os grupos, o fígado foi cuidadosamente retornado à cavidade abdominal, a camada muscular abdominal suturada com pontos contínuos e a camada cutânea com pontos individuais com fio de mononylon 4-0. Foi administrado analgésico tramadol por via subcutânea na dose de 5 mg/kg logo após o término das cirurgias.

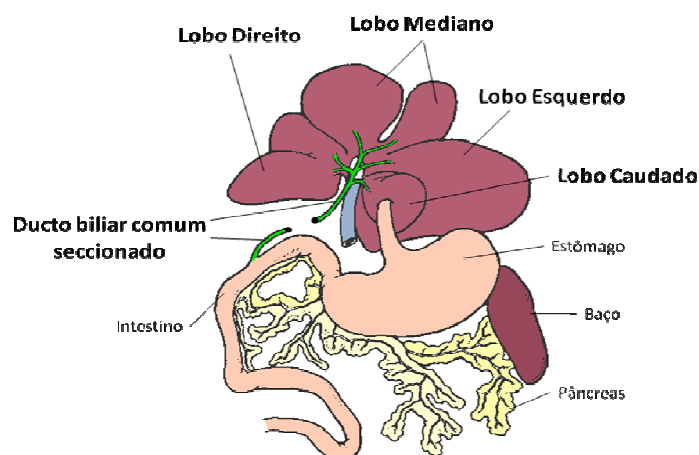


Figura 5 - Diagrama esquemático do ducto biliar comum após ligadura de ducto biliar.
Fonte: Adaptado de Scott-Conner & Grogan, 1994

Após a recuperação anestésica, os animais foram encaminhados ao alojamento da Unidade de Experimental Animal do CPE-HCPA. Foram mantidos 4 animais por gaiola em ambiente controlado ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 12:12 horas de ciclo claro-escuro) com ração padrão e água *ad libitum*.

Após 14 dias do procedimento cirúrgico, os ratos foram randomizados por meio de envelopes opacos para o recebimento de probiótico ou solução controle. Os animais submetidos a ligadura de ducto biliar foram divididos em grupo BDL (n = 9) e BDL-P (n = 8) e os pertencentes ao grupo controle cirúrgico foram separados em Ctrl e Ctrl-P, com 6 animais cada. Os ratos dos grupos Ctrl e BDL receberam 1 mL de solução tampão-fosfato (PBS) por gavagem. Os animais dos grupos Ctrl-P e BDL-P receberam 1 mL de PBS contendo $2,5 \times 10^7$ UFC do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC[®] 53103) também por gavagem .

Os animais receberam administrações diárias de gavagens durante 14 dias, sempre no mesmo horário. A solução contendo probiótico foi preparada a cada 3 dias para garantir a viabilidade das bactérias. Para esta solução foi utilizada 1 cápsula de *Lactobacillus rhamnosus* GG contendo 10×10^9 UFC (Culturelle[™], Amerifit, EUA) diluída em 400 ml de PBS estéril. Após o 14º dia, os animais permaneceram cinco dias sem receber gavagens. No 33º dia os animais foram eutanaziados para a coleta das amostras (**Figura 6**).

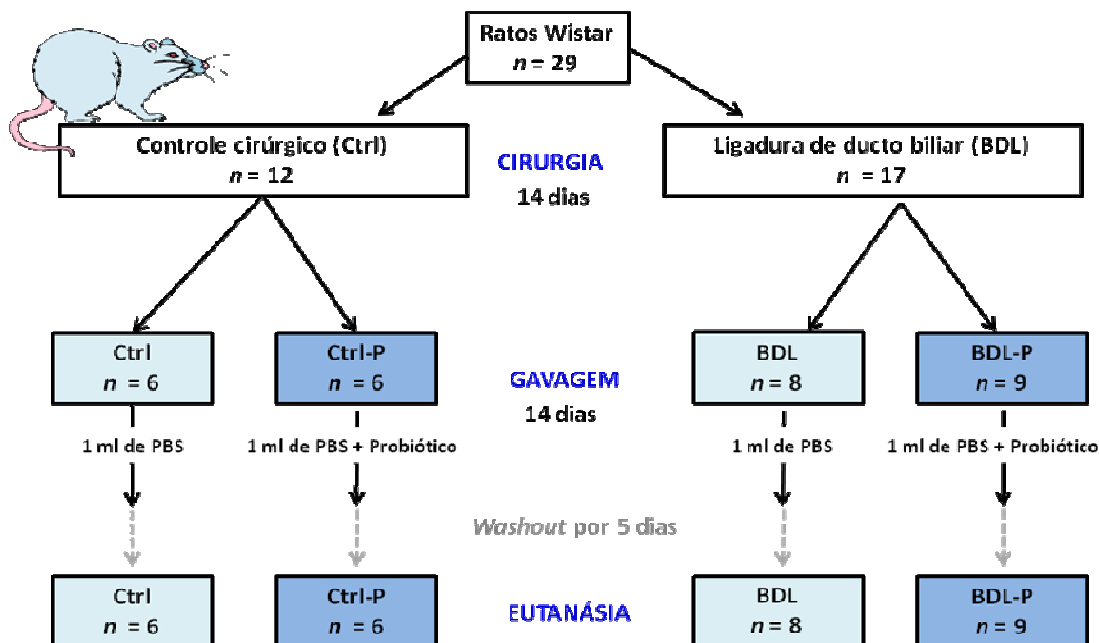


Figura 6 - Desenho Experimental.

7.3 Coleta das amostras

A coleta das amostras foi realizada no 33º dia após a cirurgia. Os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg) antes da coleta de sangue. Aproximadamente 3 mL de sangue foram coletados por punção cardíaca do ventrículo esquerdo e acondicionados em tubo com heparina-lítica. O sangue foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos para a obtenção do plasma e mantido em freezer - 80°C até o momento das análises. Em seguida os animais foram perfundidos com 50 mL de tampão-fosfato 0,1 M (23 mM Na₂HPO₄ e 77 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) a 4°C utilizando bomba de infusão na velocidade de 500 mL/h com a inserção de uma cânula diretamente no ventrículo esquerdo. Antes da perfusão o animal recebeu 0,1 mL de heparina na concentração de 5000 U/mL.

Após a perfusão foram retiradas 3 amostras do lobo mediano hepático com aproximadamente 100 mg cada e estocadas em freezer - 80°C. O restante do fígado foi fixado em formalina 10% (10 % formaldeído em 0.1 M de tampão-fosfato).

7.4 Análise bioquímica

As análises bioquímicas foram realizadas de acordo com os protocolos utilizados na rotina assistencial do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A avaliação da amônia plasmática foi feita por método enzimático colorimétrico automatizado utilizando aparelho autoanalisador de química líquida (Dimension® RxL Max® Integrated Chemistry System, Siemens, USA). As enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram mensurada pelo método cinético UV. A albumina plasmática foi aferida pelo método colorimétrico de verde de bromocresol. A fosfatase alcalina (FA) foi avaliada pelo método cinético colorimétrico de hidrólise do p-nitrofenil fosfato proposto pela Sociedade Germânica de Química Clínica (NPP-DGKC). Os valores de bilirrubina total (BT) foram obtidos pelo método de oxidação via Vanadato e a gama glutamil transferase (GGT) por método cinético colorimétrico.

7.5 Avaliação do estresse oxidativo

7.5.1 Preparo do homogeneizado e dosagem de proteínas

Para a realização das técnicas de estresse oxidativo as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C . O tecido foi homogeneizado na proporção de 100 mg de tecido para cada 900 μL de solução tampão fosfato por grama de tecido. Após homogeneizado, o tecido foi centrifugado por 10 minutos a $1110 \times g$ a 4°C . O precipitado foi desprezado e o sobrenadante retirado e congelado no freezer a -80°C para posterior utilização nas dosagens.

A concentração de proteínas foi determinada utilizando o método de Bradford (116) que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina (Sigma). As amostras foram mensuradas por espectrofotômetro em 595 nm e os valores expressos em mg/mL.

7.5.2 Dosagem de sulfidril (SH)

Para detectar os níveis de grupamentos tiol reduzidos presente nas amostras de fígado foi realizado ensaio proposto por Soszynski *et al* (117). Para isso, as amostras de fígado (40 µL) foram incubadas com 10 µL de ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) 10 mM (Sigma-Aldrich # D8130) diluído em etanol (Merck KGaA) por 60 minutos. A reação foi medida em microplacas por espectrofotometria a 412 nm (Spectramax M3, Molecular Devices). A concentração foi determinada utilizando a equação linear obtida com uma curva padrão de glutathiona reduzida. Os resultados foram expressos como nmol de SH / mg de proteína.

7.5.3 Atividade de catalase (CAT)

A catalase decompõe o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular. A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade enzimática. O ensaio consiste em medir a diminuição da absorção em 240 nm a 30°C.

A medida espectrofotométrica (Spectramax M3, Molecular Devices) foi realizada em placas onde o meio de reação (tampão fosfato 50 mM, pH 7) foi pipetado com 10 µL de catalase em diferentes concentrações ou amostra. Em seguida, se adicionou 10 µL de H₂O₂ a 200 mM. Os valores obtidos nas dosagens de catalase foram utilizado como curva padrão. A concentração foi expressa em Unidade × mg de proteína⁻¹ (118).

7.5.4 Atividade de superóxido dismutase (SOD)

Esta enzima catalisa a reação de dois ânions superóxidos com a consequente formação de peróxido de hidrogênio. Este produto é altamente reativo e pode ser degradado por duas enzimas: Catalase e Glutathione Peroxidase. Para sua detecção, utiliza-se adrenalina que, em meio alcalino, transforma-se em adenocromo.

Antes de realizar a determinação, faz-se a medida do meio de reação (glicina 50 mM, pH 10,2) com 5 µL de adrenalina (20 mM, pH 2,0), o que corresponde a 100% da reação, lida a 480 nm em espectrofotômetro (Spectramax M3, Molecular Devices). Posteriormente, adicionou-se diferentes volumes do homogeneizado para a medida da inibição da reação. A atividade enzimática foi expressa em unidades Unidade × mg de proteína⁻¹ (quantidade de SOD que inibe em 50% a velocidade de redução da adrenalina) (119).

7.6 Análise Molecular

7.6.1 Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)

O RNA total foi extraído das amostras de fígado (50 mg) armazenadas em -80°C utilizando TRIzol (Trizol®, Invitrogen, Carlsbad, CA) conforme protocolo estabelecido pelo fabricante. O RNA total extraído foi ressuspensão em 50 µL de água (água ultrapura estéril).

A quantificação do RNA foi feita utilizando 1 µL de RNA total em espectrofotômetro (NANODROP 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific), lido em 260 nm e o resultado expresso em ng/mL. A pureza do RNA foi avaliada através da razão das

leituras no comprimento de 260 nm e 280 nm. Todas as amostras apresentaram uma razão 260 nm/280 nm maior que 1,8.

O cDNA foi sintetizado utilizando o *High Capacity cDNA reverse Transcription Kit* (Invitrogen™, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) a partir de 800 ng de RNA total em termociclador (Veriti® Thermal Cycler, Applied Biosystems®). O protocolo de quantificação do cDNA foi o mesmo descrito para a leitura de RNA total. A pureza do cDNA foi avaliada através da razão das leituras no comprimento de 260 nm e 280 nm. Todas as amostras apresentaram uma razão 260 nm/280 nm maior que 1,8.

7.6.2 Expressão gênica

O método quantitativo da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) foi escolhido para análise da expressão gênica. A quantificação do produto da PCR em cada ciclo se deu pela detecção de fluorescência existente em cada amostra de produto. Foi utilizado o sistema Taqman® constituído por um par de primers e uma sonda marcada com fluoróforo FAM.

Foram utilizados os kits *TaqMan® Gene Expression Assays* (Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA), para: Fator de necrose tumoral alfa (*Tnfa*: Rn01525859_g1), Interleucina 6 (*Il6*: Rn00561420_m1), Receptor do tipo Toll 4 (*Tlr4*: Rn00569848_m1), Fator de transformação do crescimento beta (*Tgfb*: Rn00572010_m1), Metaloproteinase de matriz 2 e 9 (*Mmp2*: Rn01538170_m1; *Mmp9*: Rn00579162_m1), e beta actina (β -actina: Rn00667869_m1) como controle endógeno.

A reação foi feita com um volume final de 10 μ L, os quais foram compostos de: 5 μ L de *Taqman® Gene Expression PCR Master Mix* (Life Technologies™, CA, USA), 0,5 μ L de sonda Taqman® específica para cada gene, 2 μ μ L de cDNA (100 ng) e 2,5 μ μ L de

água ultrapura estéril. As condições de ciclagem para a amplificação foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguida por 40 ciclos de 10 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Foi utilizado termociclador *StepOne™ Real-time PCR System* (Applied Biosystems®, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA).

A quantificação da expressão gênica foi feita utilizando método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (threshold cycle). Para cada amostra, analisada em duplicata, o valor de ΔCt foi obtido subtraindo o valor de Ct do β -actina do valor de Ct do gene de interesse (120). A expressão relativa de mRNA entre os grupos foi calculada utilizando a expressão do grupo controle para a calibração.

7.7 Enzyme Linked Immune Sorbent Assay (ELISA)

Interleucina 10 e 1 β foram avaliadas em homogenato de fígado utilizando kits comerciais (rato IL-10 Quantikine Kit ELISA, # R1000 e do rato IL1 β Quantikine Kit ELISA, # R6000B). As amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão-fosfato (1% de Triton, pH 7,2) contendo coquetel inibidor de protease (Sigma P8340, Saint Louis, MO, USA), diluídas 5,55 vezes e avaliadas conforme instruções do kit. O conteúdo total de proteína foi avaliado pela técnica de Bradford e os resultados foram expressos como picograma de interleucina / mg de proteína.

7.8 Avaliação histológica e imunohistoquímica

Os fígados foram fixados em formalina 10% durante 48 horas, embebidas em parafina e seccionadas (3 μ M). As lâminas foram utilizadas para coloração de Picrosirius Red e para imuno-histoquímica. A avaliação de citoqueratina 7 (CK7) por imuno-histoquímica foi realizada utilizando anticorpo primário anti-CK7 (Abcam, Ab9021; diluição 1: 100). A

imunomarcação foi amplificada utilizando o complexo avidina-biotina-peroxidase, conforme descrito por Hsu & Colaboradores (121). Foi utilizado um reagente multiespécies (EasyPath; Erviegas Ltd, São Paulo, Brasil) como anticorpo secundário.

Após o processamento histológico padrão, as imagens foram capturadas em microscópio (Olympus BX51) com aumento de 10 vezes utilizando o programa Q Capture Pro Software v.5.1.1.14 (Q Imagem Co. Burnaby, BC, Canadá). As imagens capturadas foram quantificadas com o auxílio do programa Adobe® Photoshop® CS3 e expressa como pixels por 100. Foram fotografadas 3 imagens para cada lâmina de fígado.

Para a quantificação, a cor que representava positividade (vermelho para Picrosirius ou marrom para CK7, respectivamente) foi selecionada como primeiro plano e a cor que representava o restante do tecido hepático (verde ou azul para Picrosirius e CK7 imuno-histoquímica, respectivamente), como segundo plano. O valor em pixels relativo ao primeiro plano e ao valor do somatório do primeiro e segundo planos foram anotados e transformados em percentual (122).

7.9 Cálculo de amostra e análise estatística

O cálculo do tamanho da amostra foi baseado na quantificação do colágeno no tecido hepático utilizando a coloração de Picrosirius obtida em estudo piloto. Foi calculada amostra de 5 animais por grupo para detectar uma redução de 20% no conteúdo hepático de colágeno no grupo BDL-P (1,05) em comparação com o grupo BDL (1,37), considerando poder de 80% e significância de 5% (Winpepi 11,44).

As variáveis quantitativas foram descritas como média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil. Inicialmente as amostras foram testadas quanto à normalidade da distribuição utilizando teste de Shapiro-Wilk. As análises estatísticas foram

executadas utilizando ANOVA seguida de teste de Tukey quando as variáveis eram simétricas, e Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, quando assimétricas. O nível de significância considerado foi de 5%.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 5 (Graph Pad, San Diego, EUA).

7.10 Considerações éticas

Todos procedimentos descritos estão de acordo com a legislação vigente no Brasil (Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008) e com o *National Guidelines on Animal Care*.

Este projeto foi encaminhado à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e aprovado sob o número 12-0312.

8 RESULTADOS

Ao 33º dia após cirurgia de ligadura de ducto biliar, os animais dos grupos BDL e BDL-P apresentavam sinais claros de doença hepática crônica como: ascite, icterícia, hepatomegalia e esplenomegalia. A análise bioquímica confirmou estes achados (**Tabela 3**). Os ratos submetidos à ligadura do ducto biliar, tanto BDL quanto BDL-P, apresentavam níveis plasmáticos elevados de bilirrubina total, fosfatase alcalina, gama glutamil transferase e amônia, acompanhado da redução do peso corporal e dos níveis plasmáticos de albumina quando comparado ao grupo controle. O tratamento com LGG não promoveu qualquer diferença nos parâmetros plasmáticos.

Tabela 3 - Análise bioquímica e peso corporal dos animais ao final do experimento.

	Ctrl	Ctrl-P	BDL	BDL-P	P
Peso (g)	413,7 ± 72,8	413,2 ± 25,5	311,23 ± 17,9 ^{*#}	323,3 ± 27,2 ^{*#}	< 0,001
Ganho de peso (g) ^a	93,9 ± 14,5	99,1 ± 12,1	34,0 ± 33,2 ^{*#}	30,8 ± 29,6 ^{*#}	< 0,001
AST (mg/dL)	303,4 ± 172,1	275,4 ± 152,3	526,5 ± 268,5	464,1 ± 158,9	0,104
ALT (mg/dL)	60 ± 9,3	62,40 ± 15,2	76,78 ± 34,8	67,88 ± 22,4	0,609
Albumina (mg/dL)	3,7 ± 0,2	3,7 ± 0,3	3,1 ± 0,5 ^{*#}	3,1 ± 0,4 [*]	0,017
BT (mg/dL)	0,3 ± 0	0,3 ± 0	10,1 ± 0,8 ^{*#}	10,4 ± 0,8 ^{*#}	< 0,001
FA (U/L)	155 ± 33,3	138,4 ± 44,2	275 ± 58,1 ^{*#}	307,4 ± 61,5 ^{*#}	< 0,001
GGT (U/L)	1,8 ± 1,6	1,6 ± 1,3	66,4 ± 32,3 ^{*#}	61,9 ± 28,4 ^{*#}	< 0,001
Amônia (µmol/L)	196,2 ± 147,2	166,2 ± 72,1	285 ± 104,7	340,8 ± 120,3	0,046

Para testar a diferença entre os grupos foi utilizado o teste de ANOVA ($P < 0.05$). ^a Ganho de peso foi calculado através da diferença entre o peso ao final do experimento e o peso imediatamente antes da cirurgia. ^{*} Diferença em comparação ao grupo Ctrl. [#] Diferença em comparação ao grupo Ctrl-P. AST: Aspartato aminotransferase; ALT: Alanina aminotransferase; BT: Bilirrubina Total; FA: Fosfatase alcalina GGT: Gama glutamil transferase.

O estresse oxidativo hepático foi avaliado através da determinação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, seguida da quantificação dos níveis de grupamento tiol reduzidos (**Figura 7**). Ligadura de ducto biliar induziu uma redução significativa na atividade CAT quando comparado aos grupos controle: Ctrl (P <0,001) e Ctrl-P (P <0,001). No entanto, não foi observada diferença na atividade de CAT os grupos BDL e BDL-P. Já a atividade de SOD não apresentou alterações significativas entre os grupos (P = 0,1025).

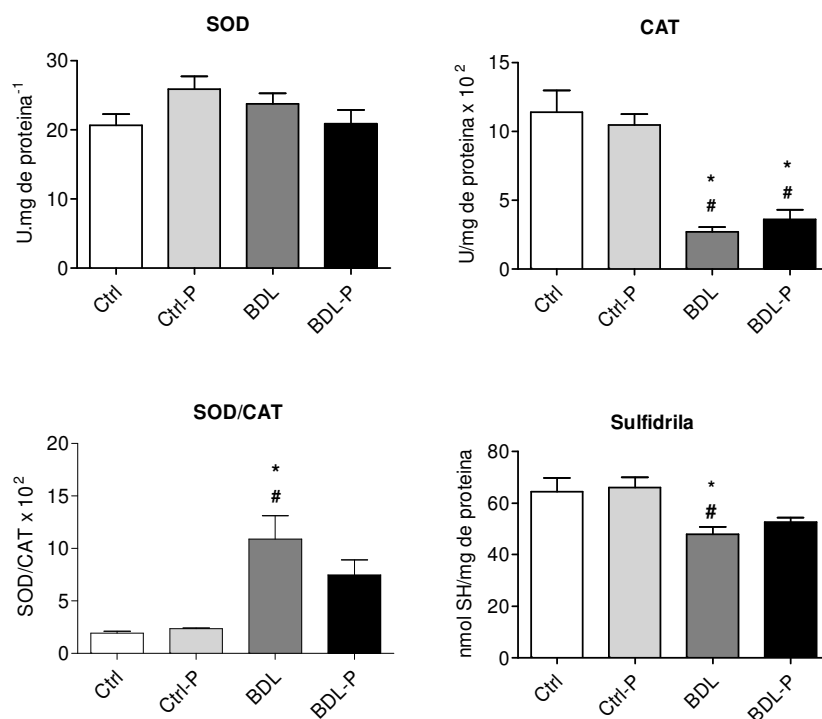


Figura 7 - Efeito do *Lactobacillus rhamnosus* GG sobre o estresse oxidativo.

Para testar a diferença entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA seguido do teste de Tukey. P <0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão. *Diferença em relação ao grupo Ctrl. # Diferença em relação ao grupo Ctrl-P.

O aumento na razão SOD/CAT pode ser indicador de um estado pró-oxidante. Isso se deve a ação sinérgica entre estas duas enzimas: o produto de reação da SOD - o peróxido de hidrogênio - é uma espécie reativa de oxigênio que pode ser transformada em

componentes inertes, H₂O e O₂, pela ação da CAT. O grupo BDL apresentou aumento na razão SOD/CAT em comparação aos grupos Ctrl (P <0,05) e Ctrl-P (P <0,01). O tratamento com *Lactobacillus* promoveu uma redução de aproximadamente 30% na razão SOD/CAT em comparação ao grupo BDL, embora não significativa. O grupo BDL-P não apresentou diferença significativa na relação SOD/CAT quando comparado com ambos os grupos controle. Os níveis de sulfidrilas reduzidas foram reduzidos no grupo BDL em comparação com Ctrl (P <0,05) e Ctrl-P (P <0,01). No entanto, o tratamento com probiótico preveniu parcialmente a redução de sulfidrilas característico do modelo de ligadura de ducto biliar, uma vez que o grupo BDL-P não apresentou diferença em relação aos grupos de controle.

A avaliação das citocinas inflamatórias no fígado está ilustrada na **Figura 8**. A expressão de *Tnfa* foi maior nos grupos submetidos a ligadura de ducto biliar em relação aos grupos Ctrl (P <0,001) e Ctrl-P (P <0,001). Não foi observada diferença entre BDL e BDL-P. A expressão de *Tlr4* foi maior no grupo BDL quando comparado aos grupos Ctrl (P <0,05) e Ctrl-P (P <0,05). O grupo BDL-P não mostrou nenhuma diferença na expressão de *Tlr4* em relação aos demais grupos. Ambos os grupos submetidos a ligadura de ducto biliar apresentaram aumento na expressão de *Il6* quando comparado a Ctrl (P <0,001; P <0,01, BDL e BDL-P, respectivamente) e Ctrl-P (P <0,001). Já o tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* GG promoveu uma redução na expressão hepática de *Il6* em comparação ao grupo BDL (P <0,05).

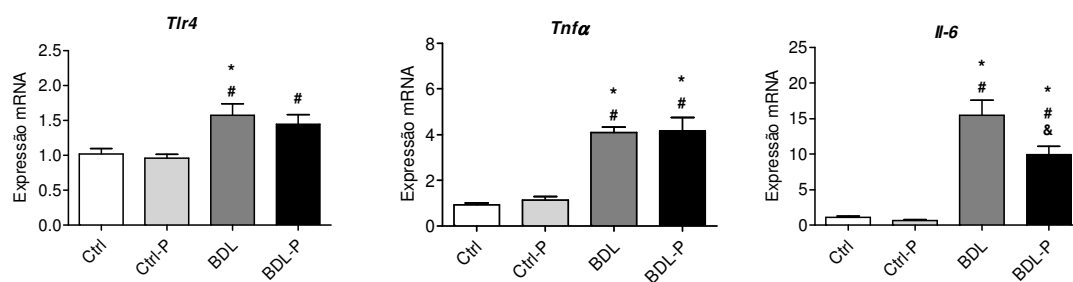


Figura 8 - Efeito do *Lactobacillus rhamnosus* GG sobre a expressão gênica de citocinas inflamatórias no fígado.

Para testar a diferença entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA seguido do teste de Tukey. $P < 0,05$ foi considerado significativo. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão. *Diferença em relação ao grupo Ctrl. # Diferença em relação ao grupo Ctrl-P. & Diferença em relação ao grupo BDL.

Os níveis de IL1 β (**Figura 9**) no grupo BDL foram significativamente maiores em comparação a ambos os grupos controle ($P < 0,05$; $P < 0,01$, Ctrl e Ctrl-P, respectivamente). O tratamento com probiótico promoveu uma discreta redução no teor de IL1 β quando comparado ao grupo BDL (BDL: $49,72 \pm 23,03$ contra BDL-P: $42,77 \pm 5,651$; NS), embora não significativa. O grupo BDL-P não apresentou qualquer diferença nos níveis de IL1 β em relação aos grupos controle. A expressão de IL10 não foi diferente entre os grupos.

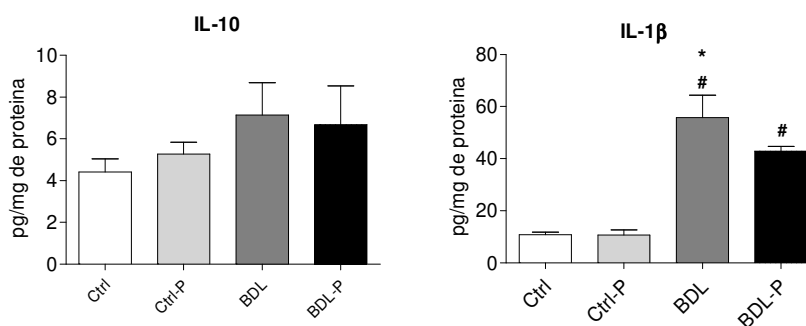


Figura 9 - Efeito do *Lactobacillus rhamnosus* GG sobre os níveis proteicos de citocinas inflamatórias no tecido hepático.

Para testar a diferença entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA seguido do teste de Tukey. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão. *Diferença em relação ao grupo Ctrl. # Diferença em relação ao grupo Ctrl-P.

O efeito do tratamento com probiótico sobre a expressão gênica de marcadores fibrogênicos no fígado está apresentada na **Figura 10**. Os grupos submetidos a ligadura de ducto biliar tiveram aumento na expressão hepática de *Mmp2* quando comparados os grupos de controle (Ctrl: $1,06 \pm 0,38$; Ctrl-P: $1,38 \pm 0,11$; BDL: $3,45 \pm 0,87$; BDL-P: $4,13 \pm 1,49$; $P < 0,05$). Não foi observada diferença entre os grupos BDL e BDL-P. Resultado semelhantes foi encontrado para expressão *Mmp9* (Ctrl: $1,14 \pm 0,49$; Ctrl-P: $1,38 \pm 0,49$; BDL: $3,89 \pm 1,48$; BDL-P: $4,42 \pm 2,44$; $P < 0,05$). O grupo BDL apresentou aumento de expressão de *Tgf β* quando comparado aos grupos Ctrl ($P < 0,01$) e Ctrl-P ($P < 0,01$). Não houve diferença na expressão de mRNA de *Tgf β* entre o grupo BDL-P e os demais.

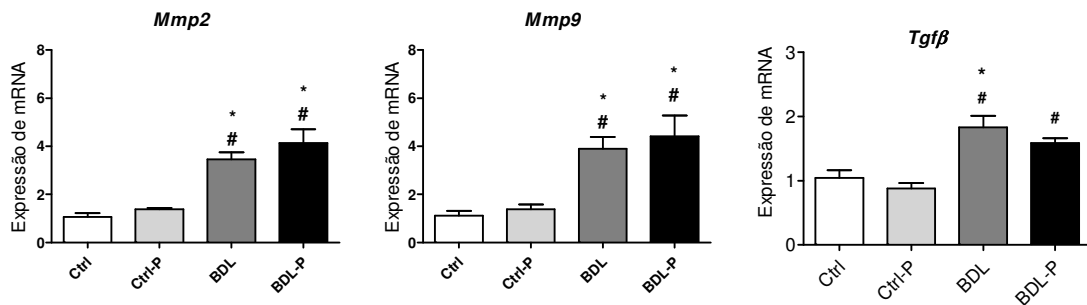


Figura 10 - Efeito do *Lactobacillus rhamnosus* GG sobre a expressão gênica de marcadores fibrogênicos em tecido hepático.

Para testar a diferença entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA seguido do teste de Tukey. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão. *Diferença em relação ao grupo Ctrl. # Diferença em relação ao grupo Ctrl-P.

O efeito do tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* GG sobre fibrose hepática está representado nas **Figuras 11 e 12**. O teor de colágeno foi significativamente maior nos grupos BDL e BDL-P em comparação aos controles ($P < 0,001$). O tratamento com probiótico promoveu a redução da deposição de colágeno no fígado em comparação com o grupo BDL ($P < 0,05$).

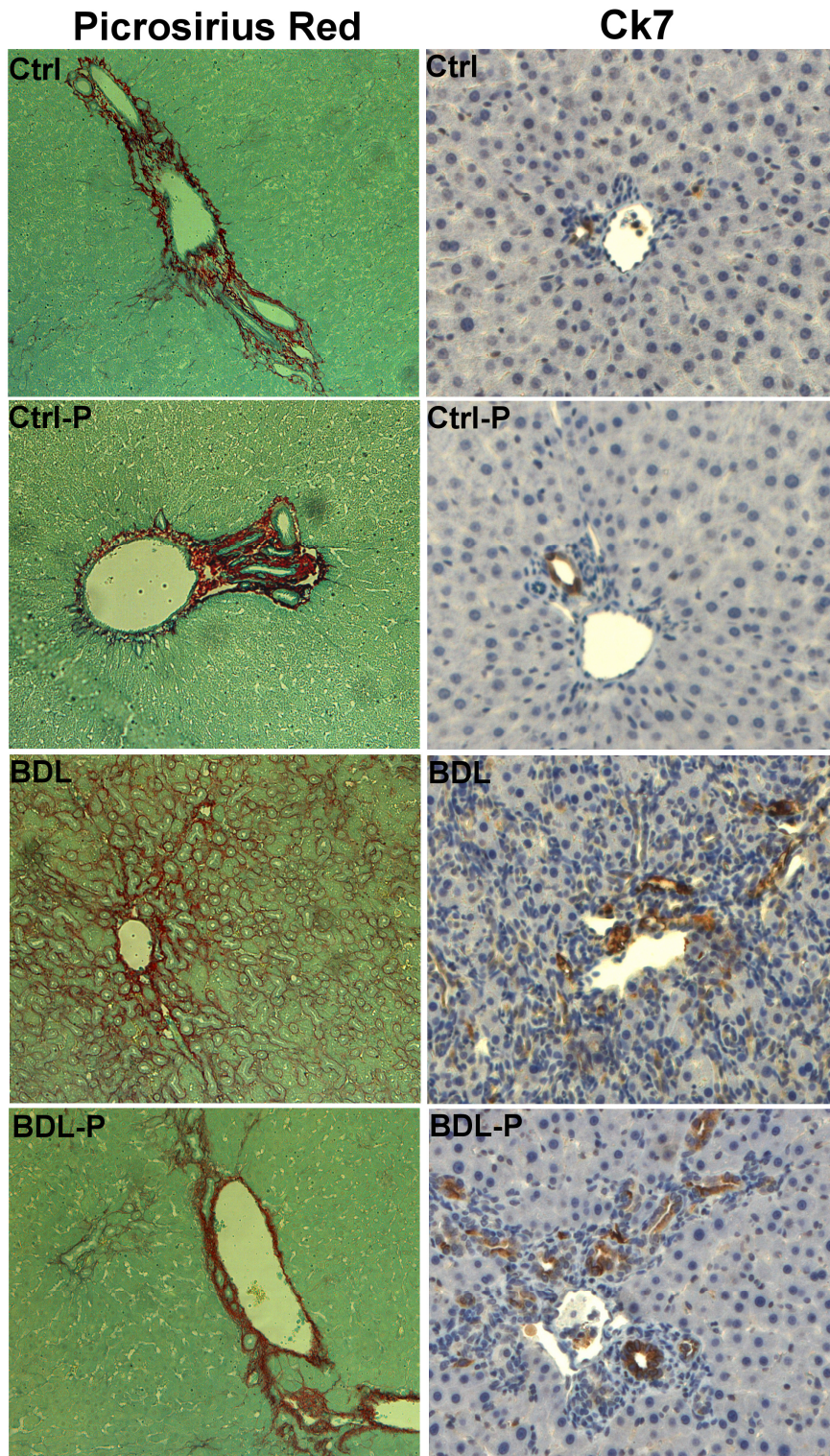


Figura 11 - Aspecto microscópico das lâminas de Picrosirius e CK7 dos diferentes grupos experimentais (100 ×).

A imuno-histoquímica para CK7 é classicamente utilizada para demonstrar respostas iniciais de células progenitoras em regiões periportais bem como destacar reações ductulares (123). O grupo BDL e BDL-P apresentaram maior imunoconteúdo de CK7 em comparação aos grupos Ctrl (P <0,001) e Ctrl-P (P <0,001; P <0,01, BDL e BDL-P, respectivamente). O tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* GG reduziu o teor de CK7 no grupo BDL-P em comparação ao BDL (P <0,05).

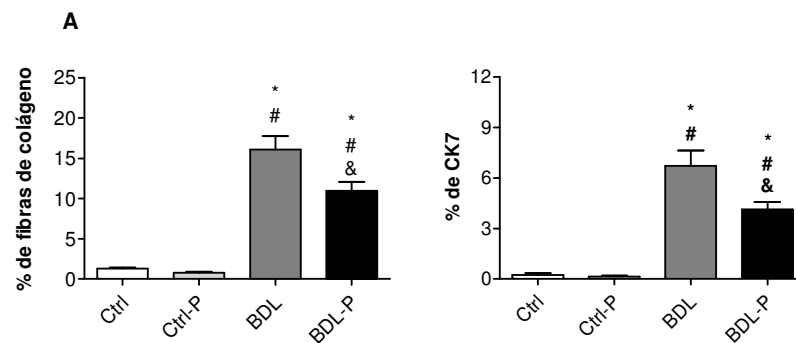


Figura 12 - Efeito do *Lactobacillus rhamnosus* GG sobre a quantificação das fibras de colágeno e do imunoconteúdo de CK7.

Para testar a diferença entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA seguido do teste de Tukey. P <0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão. *Diferença em relação ao grupo Ctrl. [#] Diferença em relação ao grupo Ctrl-P. [&] Diferença em relação ao grupo BDL.

9 DISCUSSÃO

O entendimento de que o eixo entero-hepático pode ter um papel importante sobre a progressão das doenças hepáticas tem ganhado espaço nos últimos anos. Da mesma forma, o uso terapêutico dos probióticos saiu do obscurantismo para ganhar divulgação nas principais revistas médico-científicas do mundo. Há cerca de 30 anos, existiam menos de 100 artigos sobre probióticos em todas as áreas do conhecimento - atualmente este número ultrapassa 20 mil publicações. Em Hepatologia, os estudos envolvendo probióticos datam apenas dos últimos 15 anos, com pouco mais de 200 publicações até o final de 2014. Dentre estas, as publicações que relacionam os probióticos à fibrose hepática ou cirrose respondem por menos de um quarto dos artigos (**Figura 13**).

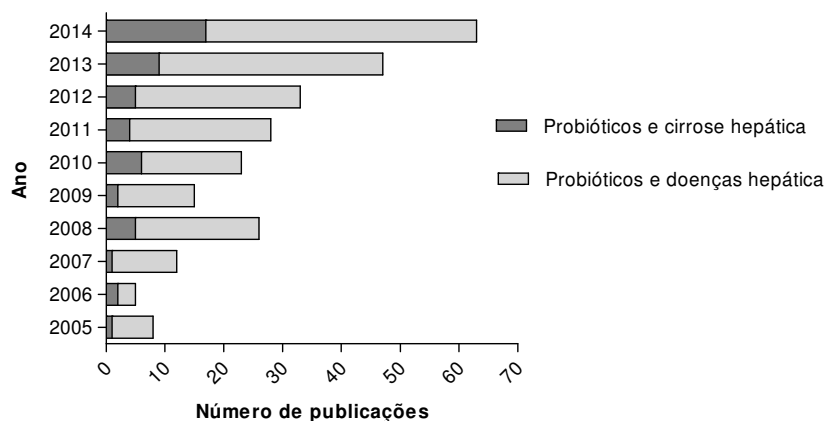


Figura 13 - Número de artigos científicos publicados nos últimos 10 anos envolvendo probióticos e doenças hepáticas em geral em comparação aqueles que avaliam o efeito dos probióticos apenas na cirrose.

A pesquisa para a construção do gráfico foi realizada na base de referências bibliográficas Pubmed utilizando os termos MeSH "Probiotics", "Liver diseases" e "Liver cirrhosis" no período de 01/01/2005 a 31/12/2014

Neste estudo , foi observado que a deposição de colágeno e o conteúdo de CK7 no tecido hepático diminuíram com o tratamento com probiótico. No entanto, os parâmetros tradicionalmente utilizados para avaliação de disfunção hepatobiliar, como aminotransferases e bilirrubinas, não sofreram alteração com o uso de LGG. Também foi observada uma tendência à diminuição do perfil inflamatório com o tratamento com LGG nos ratos submetidos a ligadura de ducto biliar. Em conjunto, estes resultados destacam a importância dos probióticos e do eixo entero-hepático na modulação da fibrose hepática.

Em hepatopatias colestáticas crônicas, como a que ocorre no modelo BDL, o aumento da pressão intraductal e a toxicidade causada do acúmulo dos ácidos biliares induzem rapidamente a lesão e morte de hepatócitos periportais e colangiócitos (112). Lesões hepatocelulares podem causar o rompimento da membrana plasmática dos hepatócitos com liberação imediata de aminotransferases intracelulares para a corrente sanguínea. No modelo de ligadura de ducto biliar, a morte de hepatócitos pode ser detectada 8 horas após o procedimento cirúrgico com aumento progressivo do número de células afetadas nas primeiras 48 horas. Isso é observado tanto histologicamente, pelo aumento das áreas de infarto, quanto através do aumento da ALT sérica (111). A partir do segundo dia de ligadura, estes marcadores começam a mostrar decréscimo na lesão hepatocitária, sendo que valores de ALT próximos aos basais, são encontrados após o 28º dia (111). Neste estudo, não foi observada aumento estatisticamente significativo nos valores das aminotransferases plasmática nos animais submetidos a ligadura de ducto biliar em relação aos controles. Em outros estudos foram encontrados aumento das aminotransferases hepáticas em modelo BDL (124, 125). Uma vez que o poder da análise estatística das aminotransferases foi inferior a 50%, a ausência de diferença entre os grupos deve ser analisada com parcimônia no presente estudo. No que se refere aos marcadores de colestase, foi observado valores

significativamente maiores de gamaglutamil transferase, fosfatase alcalina e bilirrubina total nos animais submetidos a ligadura de ducto biliar em comparação aos controles. Em outros estudos também foi demonstrado aumento nos parâmetros bioquímicos de avaliação do fluxo biliar em modelo BDL (111, 124, 125). Por outro lado, o tratamento com LGG não promoveu alteração nos parâmetros analisados. Poucos estudos avaliaram o efeitos dos probióticos em modelo de ligadura de ducto biliar (74, 126). Zhou *et al* encontraram uma diminuição nos valores de bilirrubina total avaliada no soro proveniente do sangue portal de ratos induzidos a fibrose hepática quando tratados com 2×10^8 UFC / mL de *L. plantarum* (126). No entanto, no presentes estudo, os parâmetros bioquímicos foram avaliados em sangue coletado por punção cardíaca. Talvez por este motivo, tenhamos resultados discordantes em relação a Zhou & colaboradores.

As doenças hepáticas crônicas também repercutem negativamente no estado nutricional dos indivíduos. Entre as causas da desnutrição nas hepatopatias observa-se a redução da ingestão alimentar, o hipermetabolismo e a alteração na absorção de nutrientes (127). Neste estudo, os animais com hepatopatia colestática tiveram peso final e ganho de peso inferiores aos animais do grupo controle no 33º dia de experimento. Em acordo com os nossos resultados, Jover *et al* encontraram diferença no peso dos animais induzidos a fibrose hepática por ligadura de ducto biliar em comparação aos controles (124). Porém, outros pesquisadores não observaram diferença entre os grupos BDL e controle no que se refere ao peso no final dos experimentos. Em relação a albumina, menores valores plasmáticos foram encontrados em animais induzidos a doença hepática em comparação aos animais controles. A albumina plasmática não é um bom marcador para avaliação nutricional em indivíduos hepatopatas, pois sua redução pode estar associada tanto a deficiência nutricional quanto a piora da capacidade de síntese do órgão (127, 128). No entanto, se avaliados em conjunto,

estes dados sinalizam para um impacto negativo da hepatopatia sobre o estado nutricional dos animais submetidos a ligadura de ducto biliar.

No modelo de ligadura de ducto biliar a sinalização fibrogênica em resposta as lesões celulares se inicia nos primeiros dias após o procedimento cirúrgico. Picos de expressão gênica de pró-colágeno tipo I e *Tgfβ* são observados no 3º, 7º e 14º dia pós-cirúrgico, permanecendo estáveis a partir de então. Embora muitas transformações ocorram nos momentos iniciais, a deposição de colágeno ainda é reduzida até o 5º dia. A partir do 7º dia após a cirurgia, o acúmulo de tecido fibrótico inicia um crescimento vertiginoso até atingir o pico máximo no 14º dia. De forma semelhante, a reação ductular que inicia por volta do 2º dia também é máxima no 14º dia. De acordo com Georgev *et al*, após o 14º dia não existe mais deposição significativa de colágeno ou reação ductular importante (111). Assim, 14 dias após a cirurgia de ligadura de ducto biliar pode ser considerado um tempo adequado para o estabelecimento de uma doença colestática crônica em ratos. Por esse motivo, foi escolhido 14º dia após a cirurgia para o início do tratamento com o probiótico LGG neste estudo.

O estresse oxidativo representa um importante estímulo pró-fibrogênico que pode atuar de forma direta ou indireta sobre as HSC (129). Sua origem está na produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio geradas durante a lesão de células do parênquima hepático ou pela ativação de células inflamatórias como neutrófilos e células de Kupffer (18). Espécies reativas de oxigênio atuam diretamente sobre as HSC induzindo a expressão de genes pró-fibrogênicos tanto na fase inicial da fibrose quanto na sustentação do estímulo fibrogênico (18). Estudo *in vitro* com HSC humanas expostas a hidroxinonanal - um produto da lipoperoxidação - observou aumento da expressão de colágeno e TIMP-1 (130). Ainda em cultura de HSC humanas, a exposição a baixas doses do ânion superóxido estimula a migração celular e a expressão de pró-colágeno tipo I (131). As HSC também são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio. Greenwell *et al*, em estudo *in vitro*, mostraram que

HSC expostas a metabólitos do etanol aumentam a produção de peróxido de hidrogênio e colágeno tipo I - efeito que foi inibido pela presença de catalase (132).

Além disso, o estresse oxidativo pode atuar indiretamente na ativação das HSC através do aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e do recrutamento de células inflamatórias. Nieto e colaboradores observaram a ativação das HSC, com mudança característica no fenótipo, quando do co-cultivo com células de Kupffer (133). Neste cenário, o co-cultivo promoveu o aumento de 50% na produção de peróxido de hidrogênio e a indução da expressão de pró-colágeno tipo I e IL6, em comparação ao cultivo isolado de HSC (133). A importância do estresse oxidativo neste estudo foi comprovada quando a introdução de catalase no co-cultivo resultou na diminuição da expressão de genes pró-fibrogênicos e pró-inflamatórios (133). De forma semelhante, tanto HSC quanto células de Kupffer respondem com aumento da expressão de IL6 quando expostas a H_2O_2 - com reversão deste cenário em presença de catalase (133).

A expressão de $TGF\beta$ também pode ser modulada pela presença de estresse oxidativo (129). Células de Kupffer extraídas de fígado de ratos cirróticos, quando expostas a hidroxinonenal, aumentam a expressão de $TGF\beta$ (134). Em HSC, a expressão de pró-colágeno tipo I é aumentada tanto com a adição de $TGF\beta$ quanto de H_2O_2 (135). O contrário também parece verdadeiro: HSC tratadas com $TGF\beta$ tem aumento da expressão de H_2O_2 - o que não acontece quando ocorre o co-tratamento com catalase (135).

Neste estudo, os grupos submetidos a ligadura de ducto biliar apresentaram significativa redução da atividade de catalase em relação aos grupos controle. Além disso, o grupo BDL apresentou razão SOD / CAT cinco vezes maior que a observada nos grupos controle - evidenciando a presença de um ambiente potencialmente pró-oxidativo. Um dos resultados do aumento de substâncias oxidantes é o dano a proteínas. Neste sentido, o grupo BDL também apresentou redução no conteúdo de grupamentos tiol reduzidos - confirmando a

hipótese de dano oxidativo as proteínas. O tratamento com LGG preveniu apenas parcialmente o estabelecimento de um ambiente redox uma vez que a razão SOD / CAT e o conteúdo de grupamentos tiol reduzidos não foram diferentes tanto dos grupos controle quanto dos grupos BDL.

A redução do estresse oxidativo pela ação de probióticos foi observada em outros estudos. Em modelo murino de esteato-hepatite alcoólica, o tratamento com LGG ($2,5 \times 10^7$ UFC) durante 10 semanas promoveu a redução da oxidação e nitrificação protéica tanto no fígado quanto no cólon dos animais (97). Wang *et al*, avaliaram o efeito do pré-tratamento com LGG (10^9 UFC/dia) durante 5 dias sobre a exposição aguda ao etanol (6 g/kg de peso corporal) em camundongos. Neste estudo, o LGG preveniu a geração do radical superóxido no fígado e em amostras do íleo, em comparação aos animais sem pré-tratamento (103). Recentemente, em 2014, Liu *et al* encontraram redução na atividade de glutathiona peroxidase e catalase com o tratamento com probióticos enriquecidos com selênio em modelo de fibrose hepática induzida por CCl_4 (75).

Como dito anteriormente, os produtos do estresse oxidativo podem induzir a ativação de células de Kupffer e disparar a indução de resposta inflamatória e fibrogênica (129). Além disso, a presença de LPS também é capaz de mediar a ativação de HSC resultando em aumento da liberação de citocinas inflamatórias (55, 58). Indivíduos cirróticos apresentam aumento de endotoxemia, especificamente de LPS, mesmo sem evidencia clínica de infecção (136, 137). A descompensação da doença hepática também promove alteração da microbiota intestinal com aumento da população de bactérias gram-negativas e de endotoxemia - favorecendo a chegada de LPS ao fígado (137).

Entre os fatores responsáveis pelo aumento da endotoxemia no indivíduo cirrótico, destacam-se o aumento da permeabilidade e a presença de disbiose intestinal (6). Dilatação dos capilares com edema de lâmina própria, congestão vascular e alteração da

motilidade intestinal são encontrados em pacientes com hipertensão portal e podem ser possíveis causas do aumento da permeabilidade intestinal e da translocação bacteriana em indivíduos cirróticos (136). O supercrescimento bacteriano é outro achado comum em pacientes com doença hepática crônica, especialmente as doenças colestáticas, onde o efeito antimicrobiano exercido pelos ácidos biliares está reduzido (55, 138).

Endotoxinas intestinais ligam-se a receptores TLR encontrados em diferentes células do fígado promovendo ativação da cascata inflamatória e fibrogênica (55). Embora as células de Kupffer sejam a principal fonte de TLR4, Seki & colaboradores observaram que as HSC quiescentes são alvos importantes dos ligantes de TLR4 (58). A ligação do LPS ao TLR4 não promove diretamente a transdiferenciação das HSC, no entanto, induz a expressão de *Tgfb* e a quimiotaxia de células de Kupffer (58). O *Tgfb* é um potente indutor da ativação das HSC e as células de Kupffer ativadas liberam um amplo painel de citocinas inflamatórias, como $TNF\alpha$, $IL1\beta$ e $IL6$ (27). É através destes dois mecanismos que a ligação de LPS ao TLR4 promove a ativação das HSC e modula a fibrogênese hepática (58).

Dessa forma, o uso de estratégias que reduzam a chegada de LPS ao fígado poderiam induzir a modulação negativa da fibrogênese. D'Argenio *et al*, avaliaram o uso de simbiótico (200 milhões de UFC/kg de *Lactobacillus paracasei*, glutamina e prebióticos) no tratamento de ratos induzidos a fibrose hepática por tetracloreto de carbono (73). Observaram que o tratamento com simbióticos durante 7 semanas promoveu a redução da expressão de mRNA de *Tnfa*, *Il10* e *Trl4* no fígado, porém sem diferenças na expressão gênica de *Il1b* (73). Liu & colaboradores, utilizando novamente o modelo de fibrose induzido por CCl_4 , encontraram redução na expressão gênica de *Tnfa* e *Il6* no fígado de ratos tratados com probióticos enriquecidos com selênio (10^9 UFC de *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces cerevisiae*) (75). Já em modelo de fibrose por ligadura de ducto biliar, a administração dos probióticos VSL # 3 (5×10^{10} bactérias / kg de peso corporal / dia) durante

7 semanas promoveu redução dos níveis plasmáticos de TNF α e IL1 α (74). Todos os estudos citados tem em comum o fato de iniciar o tratamento com os probióticos concomitante à indução da doença, seja no modelo de indução por CCl₄ ou BDL. No entanto, no presente estudo, o tratamento com probiótico LGG foi iniciado após 14 dias de desenvolvimento de doença. É possível que esta estratégia no desenho experimental tenha provocado efeitos mais sutis sobre a sinalização inflamatória, como observado para IL1 β e TLR4. Além disso, a perfusão com tampão-fosfato antes na retirada do fígado - etapa necessária para avaliação do estresse oxidativo - pode ter reduzido o número de células de Kupffer presentes nas amostras, resultando em menores valores de *Tlr4* e de algumas citocinas inflamatórias avaliadas.

As células de Kupffer estão localizadas próximo as regiões periportais do fígado e constituem a primeira população de macrófagos a ser exposta ao sangue proveniente do trato gastrointestinal via circulação portal (139). O sangue portal é rico em bactérias e endotoxinas ligantes dos receptores *Tlr* expressos pelas células de Kupffer, as quais são a fonte mais abundante de *Tlr4* do fígado (140, 141). Como dito anteriormente, a ligação do LPS ao receptor *Tlr4* presente nas células de Kupffer induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias e induz a ativação das HSC (**Figura 14**) (140). De Minics e colaboradores encontraram aumento da endotoxemia e da expressão de *Tlr4* e *Il6* no fígado de animais submetidos a ligadura de ducto biliar (55).

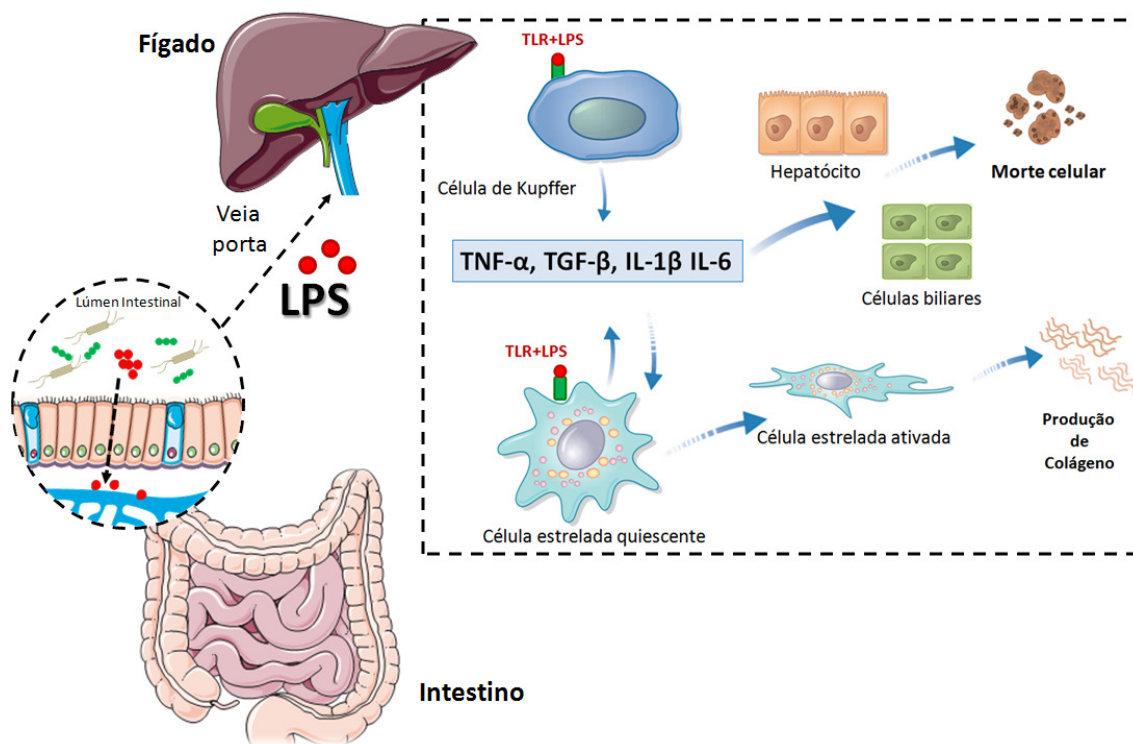


Figura 14 - Papel da disbiose intestinal na fibrogênese hepática.

A alteração da microbiota e o aumento da permeabilidade intestinal que ocorrem na vigência de hepatopatias crônicas pode levar a liberação de endotoxinas intestinais até o fígado. Endotoxinas, como os lipopolissacarídeos (LPS), são ligantes de receptores TLR4 expressos em células de Kupffer e células estreladas hepáticas (HSC). Esta ligação promove o aumento da expressão de citocinas inflamatórias e fibrogênicas como TNF α , TGF β , IL1 β e IL6. A sinalização inflamatória exacerbada promove a ativação de HSC, aumento da produção de colágeno e morte celular.

Os animais submetidos a ligadura de ducto biliar, neste estudo, apresentam valores de mRNA de *Il6* significativamente maiores que os animais dos grupos controle. Outros estudos observaram o aumento da expressão de *Il6* em animais submetidos a ligadura de ducto biliar (29, 139, 142). A *Il6* é uma citocina pró-inflamatória capaz de induzir a ativação das HSC (21, 143). Embora possa ser largamente produzida por várias células hepáticas como células de Kupffer e HSC, a *Il6* é considerada um marcador da ativação de fibroblastos periportais (21). Indivíduos saudáveis apresentam níveis plasmáticos de *Il6* inferiores a 5 pg/ml, podendo chegar 1 g/ml em caso de sepse (143). Já pacientes com doença

hepática aguda ou crônica apresentam aumento nos níveis séricos e intra-hepáticos desta interleucina (144).

No presente estudo, o tratamento com o LGG promoveu a redução da expressão gênica de *Il6* induzida pela doença colestática no fígado dos animais BDL. O efeito dos probióticos sobre a redução de *Il6* foi observado em modelo de fibrose hepática induzida por CCl_4 (75, 78). Liu *et al*, encontraram redução na expressão gênica de *Il6* no fígado dos animais induzidos a fibrose quando tratados com 10^9 UFC de *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces cerevisiae* (75). Moratalla & colaboradores, observaram redução nos níveis proteicos de IL6 no fígado dos animais expostos ao tetracloreto de carbono após o tratamento com 10^7 UFC/dia de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 (78). Baseado em nossos achados e nos dados da literatura, é possível que o tratamento com LGG tenha reduzido a exposição das células Kupffer às endotoxinas intestinais, com consequente redução da expressão hepática de mRNA de *Il6*. Também é possível que a redução da expressão de mRNA de *Il6* esteja associada à redução da ativação de fibroblastos periportais com consequente redução na deposição de colágeno e reação ductular.

O papel da IL6 sobre a fibrogênese hepática permanece controverso (144). Embora níveis plasmáticos de IL6 estejam diretamente correlacionados com a gravidade da doença hepática em pacientes com cirrose pelo vírus da hepatite C ou álcool, pesquisadores cogitam um possível efeito protetor da IL6 sobre a fibrose (144-146). Nieto & colaboradores mostraram um claro efeito da IL6 como indutor da produção de colágeno *in vitro* (133). Neste estudo, culturas primárias de HSC apresentaram aumento de colágeno tipo I e TIMP1, acompanhado da redução de MMP13 com o tratamento com 10 ng/mL de *Il6* (133). Resultado semelhante foi encontrado com o co cultivo de HSC e células de Kupffer, onde o aumento de colágeno tipo I cursou com elevação de IL6 (133). Neste mesmo modelo de co cultivo, a adição de anticorpo neutralizador de IL6 promoveu a redução de colágeno tipo I e

TIMP1 e o aumento da expressão de MMP13 - confirmando o efeito pró-fibrogênico da IL6 (133). Em células extra-hepáticas, como fibroblastos da pele e condrócitos de seres humanos, a adição de IL6 também promove aumento da síntese de TIMP-1 (147, 148).

Por outro lado, Kovalovich *et al* observaram que camundongos geneticamente deficientes em IL6 apresentam aumento do dano hepatocitário e da fibrose hepática após uma única dose de CCl₄ (149). De forma semelhante, camundongos *knockout* para *Il6* tem aumento do dano hepatocelular, extensa fibrose biliar e alta mortalidade após a ligadura de ducto biliar em comparação aos animais sem a deficiência (150). Gehring & colaboradores encontraram que injeção de IL6 1 hora após a ligadura de ducto biliar em camundongos deficiente em *Il6* reverte o aumento da necrose hepatocelular observado em animais não tratados (139). No entanto, os mesmos pesquisadores observaram que a injeção de IL6 4 horas após a cirurgia não prevenia o dano da mesma forma (139).

A IL6 exerce um papel crítico nos momentos iniciais de dano hepático (139). Níveis séricos de IL6 aumentam expressivamente (3 ng/mL) em 3 a 4 horas após a ligadura de ducto biliar em modelo murino; decrescem rapidamente até 60 pg/mL após o décimo dia, porém permanecem significativamente elevados em relação aos animais *sham* (142). Assim, o aumento dos níveis de IL6 parece ser importante para a indução de resposta aguda ao dano hepático. Já a permanência de elevados níveis desta citocina estão associados a piores desfechos em relação a doença hepática crônica (151). Como os receptores de IL6 são amplamente expressos em várias células hepáticas, Wang *et al* sugerem que a IL6 pode exercer papel positivo ou negativo sobre a modulação da fibrogênese hepática dependendo da célula alvo em que ocorre a ligação (152). Neste estudo, a diminuição da expressão gênica de *Il6* foi acompanhada da redução da deposição de colágeno e da reação ductular com o tratamento com LGG. Por isso, acreditamos que a modulação negativa da *Il6* em nosso modelo possa estar envolvida no mecanismo de redução da fibrose.

Nas doenças colestáticas, a presença de ácidos biliares hidrofóbicos em concentrações milimolares pode induzir lesão ductular e hepatocitária com destruição e perda de ductos biliares (28). Na fibrose secundária a obstrução biliar, a ativação dos fibroblastos ocasiona deposição de colágeno nas áreas periportais, com progressivo alargamento dos domínios portais e reação ductular (153). A reação ductular característica da fibrose biliar se refere ao aumento do número de estruturas ductulares na periferia dos tratos portais acompanhado de edema, infiltração de células inflamatórias, fibrose e neovascularização (123, 154). A reação ductular também pode ocorrer em doenças inflamatórias do fígado e em condições de perda massiva de parênquima hepático (155). Como a CK7 é expressa pelas células biliares, a imunohistoquímica para esta citoqueratina é utilizada para avaliação da reação ductular (123).

O mecanismo de deposição de colágeno na fibrose biliar envolve a participação de fibroblastos periportais e HSC. Os fibroblastos periportais são os responsáveis pela produção de colágeno e secreção de TGF β imediatamente após a lesão biliar (30). No entanto, o TGF β secretado por estas células induz a ativação das HSC que passam a contribuir de forma importante na produção de colágeno (12, 32). Como esperado, os animais submetidos a ligadura de ducto biliar apresentaram intensa deposição de colágeno e reação ductular avaliada pelo imunocontéudo de CK7 em comparação aos animais controle. No presente estudo, a expressão gênica de *Tgf β* também foi 75% maior nos animais do grupo BDL em relação aos animais do grupo controle.

Como dito anteriormente, endotoxinas oriundas do metabolismo das bactérias intestinais podem chegar ao fígado via circulação portal e lá desencadear a ativação de células de Kupffer e liberação de citocinas inflamatórias (57). Em seres humanos normais, a circulação de endotoxinas é na ordem de 3 pg/mL. No entanto, pacientes com doença hepática apresentam aumento dos níveis de endotoxinas proporcional a gravidade da doença, podendo

alcançar até 10 pg/mL em pacientes com cirrose Child-Pugh C (57). O aumento da sinalização inflamatória mediada pela presença de endotoxinas bacterianas no fígado induz a ativação de HSC. Neste estudo, o tratamento com o *Lactobacillus rhamnosus GG* promoveu a redução significativa na deposição de colágeno e na reação ductular, acompanhado da redução em 25% na expressão gênica de *Tgfb* em relação ao grupo BDL. No modelo BDL, a presença de sinalização inflamatória e fibrogênica é inevitável uma vez que a lesão causada pela interrupção do fluxo biliar é constante. No entanto, é possível que a presença de LPS potencialize a ativação das HSC e amplie o efeito fibrogênico neste modelo. Sendo assim, a modulação da microbiota intestinal exercida pela administração do probiótico LGG em modelo BDL pode ter minimizado o estímulo fibrogênico pela redução da chegada de endotoxinas ao fígado. Nesta hipótese, os níveis reduzidos de *Il6* seriam o reflexo da redução da ativação de células de Kupffer, HSC e fibroblastos periportais. O resultado deste estado de hipo-ativação celular é a redução da proliferação biliar e da produção de colágeno, como observado em nossas análises.

10 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que em ratos submetido a ligadura de ducto biliar:

– O *Lactobacillus rhamnosus* GG não alterou o ganho de peso e os parâmetros de disfunção hepatobiliar;

– O tratamento com probiótico promoveu uma discreta redução no perfil oxidativo;

– O uso do *Lactobacillus rhamnosus* GG durante 14 dias reduziu a expressão de genes codificantes de proteínas envolvidas no processo inflamatório e mostrou uma tendência a redução da expressão gênica de *Tgfβ* no fígado;

– O tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* GG reduziu a deposição de colágeno e reação ductular em tecido hepático.

Dessa forma, concluímos que o *Lactobacillus rhamnosus* GG foi capaz de reduzir a fibrose hepática e a reação ductular, possivelmente pela redução na expressão gênica de *Il6* em modelo de hepatopatia colestática crônica em ratos.

11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O avanço das pesquisas sobre o papel da microbiota intestinal abriu caminho para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de doenças hepáticas crônicas. Atualmente, vários estudos procuram desvendar o impacto do probiótico na progressão de hepatopatias crônicas bem como encontrar a posologia adequada para cada situação. Este estudo mostrou que o uso de *Lactobacillus rhamnosus* GG promove redução na deposição de colágeno, na reação ductular e na inflamação em modelo de doença hepática crônica. Nossos achados reforçam a importância da modulação da microbiota intestinal na doença hepática colestática mesmo quando a causa primária da hepatopatia permanece não tratada, como é o caso da obstrução biliar.

Embora tenhamos explorado algumas vias de sinalização, a dúvida quanto ao mecanismo de atuação dos probióticos permanece em aberto. Nossos resultados em relação a IL6 mostram um possível caminho a ser explorado. Sendo assim, a avaliação dos receptores de IL6, do fator de transcrição STAT3 e da glicoproteína 130 - todas moléculas envolvidas na rota de atuação da IL6 - seria importante passo para esclarecer o real papel desta citocina na fibrogênese e sua relação com a microbiota.

12 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Elpek GO. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 21;20(23):7260-76.
2. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*. 2013 Oct;3(4):1473-92.
3. WHO. WHO methods and data sources for country-level causes of death 2000-2012. *Global Health Estimates Technical Paper WHO*; 2014.
4. Rockey DC, Friedman SL. Chapter 6 - Hepatic Fibrosis and Cirrhosis. In: by E, Editor *TDBLWPM, Zakim D, editors. Zakim and Boyer's Hepatology (Fifth Edition)*. Edinburgh: W.B. Saunders; 2006. p. 87-109.
5. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. New therapeutic paradigm for patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2012 Nov;56(5):1983-92.
6. Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut*. 2015 Feb 13.
7. Imani Fooladi AA, Mahmoodzadeh Hosseini H, Nourani MR, Khani S, Alavian SM. Probiotic as a novel treatment strategy against liver disease. *Hepat Mon*. 2013 Feb;13(2):e7521.
8. FAO/WHO. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria 2001.
9. Guarner F, Khan AG, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, et al. Probiotics and probiotics. *World Gastroenterology Organisation Practice Guideline*. 2008:1-22.
10. Trautwein C, Friedman SL, Schuppan D, Pinzani M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J Hepatol*. 2015 Apr;62(1S):S15-S24.
11. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2011 Apr;25(2):195-206.
12. Forbes SJ, Parola M. Liver fibrogenic cells. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2011 Apr;25(2):207-17.
13. Pinzani M, Rosselli M, Zuckermann M. Liver cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011 Apr;25(2):281-90.
14. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol*. 2013 Mar;58(3):593-608.
15. Myers RP, Krajden M, Bilodeau M, Kaita K, Marotta P, Peltekian K, et al. Burden of disease and cost of chronic hepatitis C infection in Canada. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2014 May;28(5):243-50.
16. Nader LA, de Mattos AA, Bastos GA. Burden of liver disease in Brazil. *Liver Int*. 2014 Jul;34(6):844-9.
17. Jiao J, Friedman SL, Aloman C. Hepatic fibrosis. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2009 May;25(3):223-9.
18. Novo E, Cannito S, Paternostro C, Bocca C, Miglietta A, Parola M. Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Apr 15;548:20-37.
19. Novo E, di Bonzo LV, Cannito S, Colombatto S, Parola M. Hepatic myofibroblasts: a heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Nov;41(11):2089-93.
20. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews*. 2008 Jan;88(1):125-72.
21. Xu J, Liu X, Koyama Y, Wang P, Lan T, Kim IG, et al. The types of hepatic myofibroblasts contributing to liver fibrosis of different etiologies. *Front Pharmacol*. 2014;5:167.

22. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis as a mechanism for liver disease progression. *Semin Liver Dis.* 2010 Nov;30(4):402-10.
23. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol.* 2001 Aug;35(2):297-306.
24. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008 May;134(6):1655-69.
25. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol.* 2007 May;46(5):955-75.
26. Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Seminars in Liver Disease.* 2010 Aug;30(3):245-57.
27. Tacke F, Luedde T, Trautwein C. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2009 Feb;36(1):4-12.
28. Paumgartner G. Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets. *World J Gastroenterol.* 2006 Jul 28;12(28):4445-51.
29. Dranoff JA, Wells RG. Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis. *Hepatology.* 2010 Apr;51(4):1438-44.
30. Wells RG. The portal fibroblast: not just a poor man's stellate cell. *Gastroenterology.* 2014 Jul;147(1):41-7.
31. Penz-Osterreicher M, Osterreicher CH, Trauner M. Fibrosis in autoimmune and cholestatic liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011 Apr;25(2):245-58.
32. Wells RG, Kruglov E, Dranoff JA. Autocrine release of TGF-beta by portal fibroblasts regulates cell growth. *FEBS Lett.* 2004 Feb 13;559(1-3):107-10.
33. Kisseleva T, Brenner DA. Anti-fibrogenic strategies and the regression of fibrosis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 2011 Apr;25(2):305-17.
34. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews.* 2010 Jul;90(3):859-904.
35. Lo RS, Austin AS, Freeman JG. Is there a role for probiotics in liver disease? *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:874768.
36. Mencin A, Kluwe J, Schwabe RF. Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut.* 2009 May;58(5):704-20.
37. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012 Oct;9(10):577-89.
38. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006 Jul;7(7):688-93.
39. Espey MG. Role of oxygen gradients in shaping redox relationships between the human intestine and its microbiota. *Free Radical Biology and Medicine.* 2013;55(0):130-40.
40. Evans DF, Pye G, Bramley R, Clark AG, Dyson TJ, Hardcastle JD. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut.* 1988;29(8):1035-41.
41. Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics.* *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004 Apr;18(2):299-313.
42. Alderberth I, Cerquetti M, Poilance I, Wold A, Collignon A. Mechanisms of Colonisation and Colonisation Resistance of the Digestive Tract. *Microbial Ecology in Health and Disease.* 2011;12(2).
43. Collignon A, Butel M-J. Establishment and composition of the gut microflora. In: Rambaud J-C, Buts J-P, Corthier G, Flourie B, editors. *Gut Microflora: Digestive Physiology and Pathology: John Libbey Eurotext; 2006.* p. 19-35.
44. Karczewski J, Troost FJ, Konings I, Dekker J, Kleerebezem M, Brummer RJ, et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010 Jun;298(6):G851-9.
45. Pijls KE, Jonkers DM, Elamin EE, Masclee AA, Koek GH. Intestinal epithelial barrier function in liver cirrhosis: an extensive review of the literature. *Liver Int.* 2013 Nov;33(10):1457-69.

46. Yu LC, Wang JT, Wei SC, Ni YH. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2012 Feb 15;3(1):27-43.
47. Ostaff MJ, Stange EF, Wehkamp J. Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Mol Med*. 2013 Oct;5(10):1465-83.
48. Acheson DW, Luccioli S. Microbial-gut interactions in health and disease. Mucosal immune responses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004 Apr;18(2):387-404.
49. Ramiro-Puig E, Perez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. [The bowel: a key component of the immune system]. *Rev Esp Enferm Dig*. 2008 Jan;100(1):29-34.
50. Zeuzem S. Gut-liver axis. *International Journal of Colorectal Disease*. 2000 Apr;15(2):59-82.
51. Compare D, Coccoli P, Rocco A, Nardone OM, De Maria S, Carteni M, et al. Gut-liver axis: the impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012 Jun;22(6):471-6.
52. Szabo G, Bala S, Petrasek J, Gattu A. Gut-liver axis and sensing microbes. *Digestive Disease*. 2010;28(6):737-44.
53. Mencin A, Kluwe J, Schwabe RF. Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. 2009. p. 704-20.
54. Fukui H. Gut-liver axis in liver cirrhosis: How to manage leaky gut and endotoxemia. *World J Hepatol*. 2015 Mar 27;7(3):425-42.
55. De Minicis S, Rychlicki C, Agostinelli L, Saccomanno S, Candelaresi C, Trozzi L, et al. Dysbiosis contributes to fibrogenesis in the course of chronic liver injury in mice. *Hepatology*. 2014 May;59(5):1738-49.
56. Zhao HY, Wang HJ, Lu Z, Xu SZ. Intestinal microflora in patients with liver cirrhosis. *Chin J Dig Dis*. 2004;5(2):64-7.
57. Pradere JP, Troeger JS, Dapito DH, Mencin AA, Schwabe RF. Toll-like receptor 4 and hepatic fibrogenesis. *Seminars in Liver Disease*. 2010 Aug;30(3):232-44.
58. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nature Medicine*. 2007 Nov;13(11):1324-32.
59. Solga SF, Diehl AM. Non-alcoholic fatty liver disease: lumen-liver interactions and possible role for probiotics. *J Hepatol*. 2003 May;38(5):681-7.
60. Gratz SW, Mykkanen H, El-Nezami HS. Probiotics and gut health: a special focus on liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 2010 Jan 28;16(4):403-10.
61. Lata J, Jurankova J, Kopacova M, Vitek P. Probiotics in hepatology. *World Journal of Gastroenterology*. 2011 Jun 28;17(24):2890-6.
62. Cesaro C, Tiso A, Del Prete A, Cariello R, Tuccillo C, Cotticelli G, et al. Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases. *Digestive and Liver Disease*. 2011;43:431-8.
63. Lata J, Novotny I, Pribramska V, Jurankova J, Fric P, Kroupa R, et al. The effect of probiotics on gut flora, level of endotoxin and Child-Pugh score in cirrhotic patients: results of a double-blind randomized study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Dec;19(12):1111-3.
64. Solga SF, Buckley G, Clark JM, Horska A, Diehl AM. The effect of a probiotic on hepatic steatosis. *J Clin Gastroenterol*. 2008 Nov-Dec;42(10):1117-9.
65. Liu Q, Duan ZP, Ha DK, Bengmark S, Kurtovic J, Riordan SM. Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2004 May;39(5):1441-9.
66. Malaguarnera M, Greco F, Barone G, Gargante MP, Toscano MA. Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharide (FOS) treatment in minimal hepatic encephalopathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Dig Dis Sci*. 2007 Nov;52(11):3259-65.
67. Gupta N, Kumar A, Sharma P, Garg V, Sharma BC, Sarin SK. Effects of the adjunctive probiotic VSL#3 on portal haemodynamics in patients with cirrhosis and large varices: a randomized trial. *Liver Int*. 2013 Sep;33(8):1148-57.

68. Dhiman RK, Rana B, Agrawal S, Garg A, Chopra M, Thumburu KK, et al. Probiotic VSL#3 reduces liver disease severity and hospitalization in patients with cirrhosis: a randomized, controlled trial. *Gastroenterology*. 2014 Dec;147(6):1327-37 e3.
69. Lunia MK, Sharma BC, Sharma P, Sachdeva S, Srivastava S. Probiotics prevent hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a randomized controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014 Jun;12(6):1003-8 e1.
70. Rincon D, Vaquero J, Hernando A, Galindo E, Ripoll C, Puerto M, et al. Oral probiotic VSL#3 attenuates the circulatory disturbances of patients with cirrhosis and ascites. *Liver Int*. 2014 Nov;34(10):1504-12.
71. Perrin Y, Nutten S, Audran R, Berger B, Bibiloni R, Wassenberg J, et al. Comparison of two oral probiotic preparations in a randomized crossover trial highlights a potentially beneficial effect of *Lactobacillus paracasei* NCC2461 in patients with allergic rhinitis. *Clin Transl Allergy*. 2014;4(1):1.
72. 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 May;39(10):1113-25.
73. D'Argenio G, Cariello R, Tuccillo C, Mazzone G, Federico A, Funaro A, et al. Symbiotic formulation in experimentally induced liver fibrosis in rats: intestinal microbiota as a key point to treat liver damage? *Liver Int*. 2013 May;33(5):687-97.
74. Rashid SK, Khodja NI, Auger C, Alhosin M, Boehm N, Oswald-Mammosser M, et al. Probiotics (VSL#3) prevent endothelial dysfunction in rats with portal hypertension: role of the angiotensin system. *PLoS One*. 2014;9(5):e97458.
75. Liu Y, Liu Q, Ye G, Khan A, Liu J, Gan F, et al. Protective Effects of Selenium-Enriched Probiotics on Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in Rats. *J Agric Food Chem*. 2014 Dec 31.
76. Moratalla A, Gomez-Hurtado I, Santacruz A, Moya A, Peiro G, Zapater P, et al. Protective effect of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 against induced bacterial antigen translocation in experimental cirrhosis. *Liver Int*. 2014 Jul;34(6):850-8.
77. Sanchez E, Nieto JC, Boullosa A, Vidal S, Sancho FJ, Rossi G, et al. VSL#3 probiotic treatment decreases bacterial translocation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Liver Int*. 2015 Mar;35(3):735-45.
78. Moratalla A, Gomez-Hurtado I, Moya-Perez A, Zapater P, Peiro G, Gonzalez-Navajas JM, et al. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 promotes a TLR2-dependent anti-inflammatory response in intestinal lymphocytes from mice with cirrhosis. *Eur J Nutr*. 2015 Feb 6.
79. Gorbach SL. Probiotics and gastrointestinal health. *The American Journal of Gastroenterology*. 2000 Jan;95(1 Suppl):S2-4.
80. Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1987 Aug;31(8):1231-3.
81. Alander M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T, et al. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus GG*, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999;65:351-4.
82. Segers ME, Lebeer S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus GG*--host interactions. *Microb Cell Fact*. 2014 Aug 29;13 Suppl 1:S7.
83. Yan F, Polk DB. *Lactobacillus rhamnosus GG*: An Updated Strategy to Use Microbial Products to Promote Health. *Funct Food Rev*. 2012 Jun;4(2):77-84.
84. Tripathi P, Beaussart A, Alsteens D, Dupres V, Claes I, von Ossowski I, et al. Adhesion and nanomechanics of pili from the probiotic *Lactobacillus rhamnosus GG*. *ACS Nano*. 2013 Apr 23;7(4):3685-97.
85. Claes IJ, Segers ME, Verhoeven TL, Dusselier M, Sels BF, De Keersmaecker SC, et al. Lipoteichoic acid is an important microbe-associated molecular pattern of *Lactobacillus rhamnosus GG*. *Microb Cell Fact*. 2012;11:161.

86. Weill FS, Cela EM, Paz ML, Ferrari A, Leoni J, Maglio DHG. Lipoteichoic acid from *Lactobacillus rhamnosus* GG as an oral photoprotective agent against UV-induced carcinogenesis. *British Journal of Nutrition*. 2013;109(03):457-66.
87. von Ossowski I, Satokari R, Reunanen J, Lebeer S, De Keersmaecker SC, Vanderleyden J, et al. Functional characterization of a mucus-specific LPXTG surface adhesin from probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Jul;77(13):4465-72.
88. Hibberd PL, Kleimola L, Fiorino AM, Botelho C, Haverkamp M, Andreyeva I, et al. No evidence of harms of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 in healthy elderly—a phase I open label study to assess safety, tolerability and cytokine responses. *PLoS One*. 2014;9(12):e113456.
89. Cruchet S, Furnes R, Maruy A, Hebel E, Palacios J, Medina F, et al. The use of probiotics in pediatric gastroenterology: a review of the literature and recommendations by latin-american experts. *Paediatr Drugs*. 2015 Jun;17(3):199-216.
90. Luoto R, Isolauri E, Lehtonen L. Safety of *Lactobacillus* GG probiotic in infants with very low birth weight: twelve years of experience. *Clin Infect Dis*. 2010 May 1;50(9):1327-8.
91. Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hormannsperger G, et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*. 2010 May-Jun;1(3):164-85.
92. Rautio M, Jousimies-Somer H, Kauma H, Pietarinen I, Saxelin M, Tynkkynen S, et al. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin Infect Dis*. 1999 May;28(5):1159-60.
93. Young RJ, Vanderhoof JA. Two cases of *Lactobacillus* bacteremia during probiotic treatment of short gut syndrome. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2004 Oct;39(4):436-7; author reply 7.
94. Ishihara Y, Kanda J, Tanaka K, Nakano H, Ugai T, Wada H, et al. Severe oral infection due to *Lactobacillus rhamnosus* during induction chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2014 Dec;100(6):607-10.
95. Salminen MK, Tynkkynen S, Rautelin H, Saxelin M, Vaara M, Ruutu P, et al. *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin Infect Dis*. 2002 Nov 15;35(10):1155-60.
96. Sullivan A, Nord CE. Probiotic lactobacilli and bacteraemia in Stockholm. *Scand J Infect Dis*. 2006;38(5):327-31.
97. 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 (Fayetteville, NY)*. 2009 Mar;43(2):163-72.
98. Vajro P, Mandato C, Licenziati MR, Franzese A, Vitale DF, Lenta S, et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2011 Jun;52(6):740-3.
99. Lam EK, Yu L, Wong HP, Wu WK, Shin VY, Tai EK, et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG enhances gastric ulcer healing in rats. *European Journal of Pharmacology* 2007 Jun 22;565(1-3):171-9.
100. 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(1):e80169.
101. Kim SW, Park KY, Kim B, Kim E, Hyun CK. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Feb 8;431(2):258-63.
102. 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 Dec;179(6):2866-75.
103. Wang Y, Liu Y, Sidhu A, Ma Z, McClain CJ, Feng W. *Lactobacillus rhamnosus* GG culture supernatant ameliorates acute alcohol-induced intestinal permeability and liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012 Apr 26.

104. Wang Y, Liu Y, Kirpich I, Ma Z, Wang C, Zhang M, et al. Lactobacillus rhamnosus GG reduces hepatic TNF α production and inflammation in chronic alcohol-induced liver injury. *J Nutr Biochem*. 2013 Sep;24(9):1609-15.
105. Schneider AC, Machado AB, de Assis AM, Hermes DM, Schaefer PG, Guizzo R, et al. Effects of Lactobacillus rhamnosus GG on hepatic and serum lipid profiles in zebrafish exposed to ethanol. *Zebrafish*. 2014 Aug;11(4):371-8.
106. Zhang M, Wang C, Zhao H, Zhao C, Chen Y, Wang 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 Apr;26(4):337-44.
107. Shi X, Wei X, Yin X, Wang Y, Zhang M, Zhao C, et al. Hepatic and fecal metabolomic analysis of the effects of Lactobacillus rhamnosus GG on alcoholic fatty liver disease in mice. *J Proteome Res*. 2015 Feb 6;14(2):1174-82.
108. Bauer TM, Fernández J, Navasa M, Vila J, Rodés J. Failure of Lactobacillus spp. to prevent bacterial translocation in a rat model of experimental cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2002;36(4):501-6.
109. Cheng VC, Chen JH, Tai JW, Wong SC, Poon RW, Hung IF, et al. Decolonization of gastrointestinal carriage of vancomycin-resistant Enterococcus faecium: case series and review of literature. *BMC Infect Dis*. 2014;14:514.
110. Trauner M, Fickert P, Halilbasic E, Moustafa T. Lessons from the toxic bile concept for the pathogenesis and treatment of cholestatic liver diseases. *Wien Med Wochenschr*. 2008;158(19-20):542-8.
111. Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, et al. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg*. 2008 May;95(5):646-56.
112. Starkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011 Apr;25(2):319-33.
113. Kossakowska AE, Edwards DR, Lee SS, Urbanski LS, Stabbler AL, Zhang CL, et al. Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *American Journal of Pathology*. 1998 Dec;153(6):1895-902.
114. Leke R, Oliveira DL, Forgiarini LF, Escobar TD, Hammes TO, Meyer FS, et al. Impairment of short term memory in rats with hepatic encephalopathy due to bile duct ligation. *Metab Brain Dis*. 2013 Jun;28(2):187-92.
115. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol*. 1984 Jun;65(3):305-11.
116. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
117. Soszynski M, Bartosz G. Decrease in accessible thiols as an index of oxidative damage to membrane proteins. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(3):463-9.
118. Li Y, Schellhorn HE. Rapid kinetic microassay for catalase activity. *J Biomol Tech*. 2007 Sep;18(4):185-7.
119. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972 May 25;247(10):3170-5.
120. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
121. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 1981 Apr;29(4):577-80.
122. Vercelino R, Crespo I, de Souza GF, Cuevas MJ, de Oliveira MG, Marroni NP, et al. S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in cirrhotic rats. *J Mol Med (Berl)*. 2010 Apr;88(4):401-11.
123. Bateman AC, Hubscher SG. Cytokeratin expression as an aid to diagnosis in medical liver biopsies. *Histopathology*. 2010 Mar;56(4):415-25.

124. Jover R, Rodrigo R, Felipo V, Insausti R, Saez-Valero J, Garcia-Ayllon MS, et al. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology*. 2006 Jun;43(6):1257-66.
125. Leke R, de Oliveira DL, Mussulini BH, Pereira MS, Kazlauckas V, Mazzini G, et al. Impairment of the organization of locomotor and exploratory behaviors in bile duct-ligated rats. *PLoS One*. 2012;7(5):e36322.
126. Zhou YK, Qin HL, Zhang M, Shen TY, Chen HQ, Ma YL, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* on gut barrier function in experimental obstructive jaundice. *World J Gastroenterol*. 2012 Aug 14;18(30):3977-91.
127. Nightingale S, Ng VL. Optimizing nutritional management in children with chronic liver disease. *Pediatr Clin North Am*. 2009 Oct;56(5):1161-83.
128. Klein S. The myth of serum albumin as a measure of nutritional status. *Gastroenterology*. 1990;99(6):1845-6.
129. Urtasun R, Conde de la Rosa L, Nieto N. Oxidative and nitrosative stress and fibrogenic response. *Clinics in liver disease*. 2008 Nov;12(4):769-90, viii.
130. Zamara E, Novo E, Marra F, Gentilini A, Romanelli RG, Caligiuri A, et al. 4-Hydroxynonenal as a selective pro-fibrogenic stimulus for activated human hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 2004 Jan;40(1):60-8.
131. Novo E, Marra F, Zamara E, Valfre di Bonzo L, Caligiuri A, Cannito S, et al. Dose dependent and divergent effects of superoxide anion on cell death, proliferation, and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gut*. 2006 Jan;55(1):90-7.
132. Greenwel P, Dominguez-Rosales JA, Mavi G, Rivas-Estilla AM, Rojkind M. Hydrogen peroxide: a link between acetaldehyde-elicited alpha1(I) collagen gene up-regulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells. *Hepatology*. 2000 Jan;31(1):109-16.
133. Nieto N. Oxidative-stress and IL-6 mediate the fibrogenic effects of [corrected] Kupffer cells on stellate cells. *Hepatology*. 2006 Dec;44(6):1487-501.
134. Leonarduzzi G, Scavazza A, Biasi F, Chiarpotto E, Camandola S, Vogel S, et al. The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB J*. 1997 Sep;11(11):851-7.
135. Garcia-Trevijano ER, Irburu MJ, Fontana L, Dominguez-Rosales JA, Auster A, Covarrubias-Pinedo A, et al. Transforming growth factor beta1 induces the expression of alpha1(I) procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBPbeta-dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 1999 Mar;29(3):960-70.
136. Riordan SM, Williams R. The intestinal flora and bacterial infection in cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2006;45(5):744-57.
137. Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, Sanyal AJ, White MB, Monteith P, et al. Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *J Hepatol*. 2014 May;60(5):940-7.
138. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res*. 2006 Feb;47(2):241-59.
139. Gehring S, Dickson EM, San Martin ME, van Rooijen N, Papa EF, Harty MW, et al. Kupffer cells abrogate cholestatic liver injury in mice. *Gastroenterology*. 2006 Mar;130(3):810-22.
140. Nakamoto N, Kanai T. Role of toll-like receptors in immune activation and tolerance in the liver. *Front Immunol*. 2014;5:221.
141. Seki E, Park E, Fujimoto J. Toll-like receptor signaling in liver regeneration, fibrosis and carcinogenesis. *Hepatol Res*. 2011 Jul;41(7):597-610.
142. Bemelmans MH, Gouma DJ, Greve JW, Buurman WA. Cytokines tumor necrosis factor and interleukin-6 in experimental biliary obstruction in mice. *Hepatology*. 1992 Jun;15(6):1132-6.
143. Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine*. 2014 Nov;70(1):11-20.

144. Hammerich L, Tacke F. Interleukins in chronic liver disease: lessons learned from experimental mouse models. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014;7:297-306.
145. Solis Herruzo JA, de la Torre P, Diaz Sanjuan T, Garcia Ruiz I, Munoz Yague T. IL-6 and extracellular matrix remodeling. *Rev Esp Enferm Dig*. 2005 Aug;97(8):575-95.
146. Lemmers A, Gustot T, Durnez A, Evrard S, Moreno C, Quertinmont E, et al. An inhibitor of interleukin-6 trans-signalling, sgp130, contributes to impaired acute phase response in human chronic liver disease. *Clin Exp Immunol*. 2009 Jun;156(3):518-27.
147. Sato T, Ito A, Mori Y. Interleukin 6 enhances the production of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) but not that of matrix metalloproteinases by human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Jul 31;170(2):824-9.
148. Lotz M, Guerne PA. Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *J Biol Chem*. 1991 Feb 5;266(4):2017-20.
149. Kovalovich K, DeAngelis RA, Li W, Furth EE, Ciliberto G, Taub R. Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. *Hepatology*. 2000 Jan;31(1):149-59.
150. Ezure T, Sakamoto T, Tsuji H, Lunz JG, 3rd, Murase N, Fung JJ, et al. The development and compensation of biliary cirrhosis in interleukin-6-deficient mice. *Am J Pathol*. 2000 May;156(5):1627-39.
151. Dapito DH, Mencin A, Gwak GY, Pradere JP, Jang MK, Mederacke I, et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell*. 2012 Apr 17;21(4):504-16.
152. Wang H, Lafdil F, Kong X, Gao B. Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: a novel therapeutic target. *Int J Biol Sci*. 2011;7(5):536-50.
153. Ramadori G, Saile B. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest*. 2004 Feb;84(2):153-9.
154. Desmet VJ. Histopathology of chronic cholestasis and adult ductopenic syndrome. *Clinics in liver disease*. 1998 May;2(2):249-64, viii.
155. Desmet VJ. Ductal plates in hepatic ductular reactions. Hypothesis and implications. I. Types of ductular reaction reconsidered. *Virchows Arch*. 2011 Mar;458(3):251-9.

ANEXOS

ANEXO I

Impairment of short term memory in rats with hepatic encephalopathy due to bile duct ligation

Renata Leke · Diogo L. Oliveira · Luiz F. Forgiarini ·
Thayssa D. C. Escobar · Thais O. Hammes ·
Fabiola S. Meyer · Susanne Keiding ·
Themis R. Silveira · Arne Schousboe

Received: 18 September 2012 / Accepted: 15 October 2012
© Springer Science+Business Media New York 2012

Abstract Hepatic encephalopathy (HE) arises from acute or chronic liver diseases and leads to cognitive deficits. Different animal models for the study of HE have demonstrated learning and memory impairment and a number of neurotransmitter systems have been proposed to be involved in this. Recently, it was described that bile duct-ligated

(BDL) rats exhibited altered spatio-temporal locomotor and exploratory activities and biosynthesis of neurotransmitter GABA in brain cortices. Therefore, the aim of this study was to evaluate cognition in the same animal model. Male adult Wistar rats underwent common bile duct ligation (BDL rats) or manipulation of common bile duct without ligation (control rats). Six weeks after surgery, control and BDL rats underwent object recognition behavioral task. The BDL rats developed chronic liver failure and exhibited a decreased discrimination index for short term memory (STM) when compared to the control group. There was no difference in long term memory (LTM) as well as in total time of exploration in the training, STM and LTM sessions between the BDL and control rats. Therefore, the BDL rats demonstrated impaired STM for recognition memory, which was not due to decreased exploration.

R. Leke (✉) · L. F. Forgiarini · T. D. C. Escobar · T. O. Hammes ·
F. S. Meyer · T. R. Silveira
Experimental Hepatology and Gastroenterology Laboratory,
Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
Avenida Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre,
Rio Grande do Sul 90035-903, Brazil
e-mail: renataleke@hotmail.com

R. Leke · T. R. Silveira
Post-Graduation in Child and Adolescents Health,
Federal University of Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

D. L. Oliveira
Department of Biochemistry,
Federal University of Rio Grande do Sul,
90035-006, Porto Alegre, Brazil

A. Schousboe
Department of Drug Design and Pharmacology,
University of Copenhagen,
2100 Copenhagen, Denmark

S. Keiding
Positron Emission Tomography Centre,
Aarhus University Hospital,
8000 Aarhus, Denmark

S. Keiding
Department of Medicine V, Hepatology and
Gastroenterology, Aarhus University Hospital,
8000 Aarhus, Denmark

Keywords Hepatic encephalopathy · Bile duct-ligated rats ·
Short term memory · Long term memory · Object recognition

Introduction

Hepatic encephalopathy is a neurological disorder which leads to motor, cognitive and emotional dysfunctions. Its origin is secondary to liver failure, occurring in both acute and chronic liver diseases from different aetiologies, as well as due to increased portal–systemic shunting of blood (Albrecht and Jones 1999; Ferenci et al. 2002). The clinical manifestations of HE depend on the rate at which liver dysfunction occurs as well as the degree of metabolic alteration (Weissenborn et al. 2005a). Therefore, the symptoms can range from sleep disturbances to severe disorientation and coma (Ferenci et al. 2002; Weissenborn et al. 2005a).

Learning and memory impairment have been described in HE patients, occurring from chronic liver disease (Weissenborn et al. 2003; Ortiz et al. 2006). However, the reduced capability of retrieving memory appeared to be due to attention deficit (Weissenborn et al. 2003, 2005b). Cognitive alterations were also verified in animal models employed for the study of HE, showing decreases in performance for tasks evaluating learning ability as well as spatial and working memories (Erceg et al. 2005b; Cauli et al. 2007b; Méndez et al. 2008, 2009).

An increased GABAergic neurotransmitter tone has been suggested as one of the pathophysiological mechanisms of HE (Jones et al. 1984; Jones and Basile 1998). Studies have clearly demonstrated alterations in GABA metabolism and neurotransmission in neural cultures, animal models and also in patients with HE (Wysmyk et al. 1992; Oja et al. 1993; Bender and Norenberg 2000; Cauli et al. 2007a; Ahboucha et al. 2012). Ammonia, which has been described as a pivotal neurotoxin involved in HE development (Felipo and Butterworth 2002), has been shown to cause directly or indirectly alterations in GABAergic system function (Ahboucha and Butterworth 2007). Recently, we have obtained evidence that the pathways involved in biosynthesis of GABA were altered in cerebral cortices of BDL rats, a model of type C HE (Leke et al. 2011), a finding that corroborates with the increased GABAergic tone during HE. Interestingly, employing the same animal model it was verified that such BDL rats exhibited altered spatio-temporal locomotor and exploratory activities, which might be related to the altered biosynthesis of GABA (Leke et al. 2012). Therefore, the present study was undertaken to investigate how the BDL rats would perform a behavioral task which aimed to evaluate recognition memory.

Methods

Animals

Adult male Wistar rats ($n=20$, weight 361.21 ± 28.19 g, 70–80 days old at the initiation of the surgical procedure) were obtained from the *animarium* of Experimental Animal Unit of Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The rats were housed five animals per cage and maintained in a controlled environment (room temperature $20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, standard light/dark cycle of 12 h—lights on at 07:00 am) with standard food and water ad libitum. The handling and care of the animals were conducted according to the National Guidelines on Animal Care and was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Bile duct ligation

The animals were randomly distributed into two groups: bile duct-ligated (BDL group, $n=10$) and sham-operated

(control group, $n=10$) rats. The bile duct ligation procedure was conducted as described previously (Kountouras et al. 1984). Briefly, rats were anaesthetized with ketamine (90 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg) i.p. and a middle abdominal incision was performed, the hepatic ligament exposed. Subsequently, the common bile duct was ligated with non-absorbent surgical sutures below the biliary hepatic ducts junction and above the entrance of the pancreatic ducts, and resected between the two ligatures. The abdominal incision was closed with 4–0 non-absorbent suture in two layers. After the regain of consciousness, the rats received a single subcutaneous injection of tramadol (5 mg/kg) and were then returned to their home-cages. The control rats consisted of sham-operated rats, i.e. rats that had the hepatic ligament exposed and manipulated, but the common bile duct was not ligated. All animals were maintained in the animal colony room for the following 6 weeks after surgery.

Behavioral procedure

The behavioral experiment was conducted between the sixth and seventh week after surgical procedures. One hour before the behavior task the rats were placed in the testing room to allow habituation with the environment and researchers. The behavioral tasks were performed between 9:00–16:00 h. All parameters were recorded and analyzed using the appropriate video tracking system (Any-maze[®], Stoelting CO, USA).

Object recognition task

Object recognition task was performed according to the protocol described by Bevins and Besheer (2006). The object-recognition apparatus consisted of a 77 cm diameter circular black arena with 50 cm walls placed in a room where the light intensity was equal in the different parts of the apparatus. Four objects (two identical and two different) made of inert material that could not be displaced by the rat were used for discrimination. In order to habituate animals, a session of 10 min in the empty arena was performed 48 h before the task. The object recognition task consisted of a training session and two test sessions, each lasting 5 min. In the training session rats were individually placed into the arena and exposed to two identical objects (A and B). Rats were then removed and returned to their home-cage. In short-term memory (STM) evaluation, animals were placed into the arena 3 h later and exposed to the familiar object A and a novel object C. To assess long-term memory (LTM), rats were exposed to the familiar object A and another novel object D 24 h after the training session. In all sessions the animals were placed in the open arena facing away from the objects and after each trial the apparatus was cleaned with 30 % ethanol solution. Recognition was defined as sniffing

or touching the object with the nose and/or forepaws. The object recognition results were expressed as the discrimination ratio, calculated by the time to explore the novel object divided by the sum of time to explore the novel and familiar objects.

Sample collection

Rats were anesthetized as described previously and blood was withdrawn by cardiac puncture and placed in a test tube containing heparin, centrifuged for 5 min at $5000\times g$ and plasma samples were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis of ammonia (ammonia assay, Dimension[®] RxL Max[®] Integrated Chemistry System, Siemens, USA). The animals were decapitated and the livers were removed and stored in a 10 % formaldehyde solution (10 % formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer 100 mM phosphate buffer containing 23 mM Na_2HPO_4 and 77 mM NaH_2PO_4 , pH 7.4). Subsequently, the livers were weighed and examined macroscopically and sampled for histological examination using Haematoxylin & Eosin (H&E) and Picrosirius staining.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and were analyzed by Student's *t*-test. For all parameters a $p<0.05$ was considered statistically significant. Data analysis was performed using Microsoft Excel 2010 and GraphPad Prism 5.0 softwares.

Results

Experimental chronic liver disease

BDL rats exhibited enlarged abdomen and yellowish fur and tail. All BDL rats had hepatomegaly and splenomegaly and approximately 72 % had ascites. Histological examination of the livers showed bile duct proliferation, disturbed cytoarchitecture, formation of septa between portal areas and a noticeable increase in collagen fibers. Control rats exhibited normal liver parenchyma. Two BDL rats died prior to behavioral testing and sample collection and one

BDL rat was discarded from the behavioral task because it did not explore the apparatus.

Plasma levels of ammonia

BDL rats had significantly higher plasma ammonia ($116.3\pm 13.90\text{ }\mu\text{M}$) levels when compared to the control rats ($33.00\pm 2.66\text{ }\mu\text{M}$), $p<0.0001$.

Object recognition behavioral task

The BDL and control groups showed the same pattern of behavior during the training session of the object recognition task, as both groups exhibited similar discriminating ratios (control 0.497 ± 0.030 , BDL 0.513 ± 0.047 , Fig. 1a), which were around 0.5. This ratio value indicates that rats stayed the same period of time exploring the similar objects A and B that were presented at the training session. In the STM session, BDL rats exhibited a significantly lower discrimination ratio when compared to the control group (control 0.628 ± 0.029 , BDL 0.485 ± 0.037 , $p=0.0083$, Fig. 1b), meaning that BDL rats were not able to discriminate the novel object C from the familiar object A. In the last session for LTM, the groups exhibited no differences in the discrimination index (control 0.728 ± 0.027 , BDL 0.719 ± 0.056 , Fig. 1c) and had discrimination ratios higher than 0.7, indicating that both groups explored the novel object D for longer periods of time than the familiar object A. Regarding the total time of exploration, control and BDL rats exhibited no differences in total time of exploration in both training (control 52.28 ± 3.86 , BDL 51.97 ± 5.86 , Fig. 2a) and STM (control 39.21 ± 2.01 , BDL 45.70 ± 3.40 , Fig. 2b) and LTM sessions (control 65.75 ± 79.4 , BDL 79.29 ± 5.20 , Fig. 2c).

Discussion

The object recognition task is a behavioral tool used to evaluate recognition memory, regarded as the ability to discriminate the familiarity of things (objects) previously encountered, which is thought to be a component of human declarative memory (Mumby 2001). This behavioral task relies on the natural tendency of rodents to explore

Fig. 1 Object recognition discrimination ratios for training **a**, STM **b** and LTM **c** sessions for the control (white bars, $n=10$) and BDL (gray bars, $n=7$) rats. Results are presented as mean \pm SEM. * $p<0.05$ by Student's *t* test

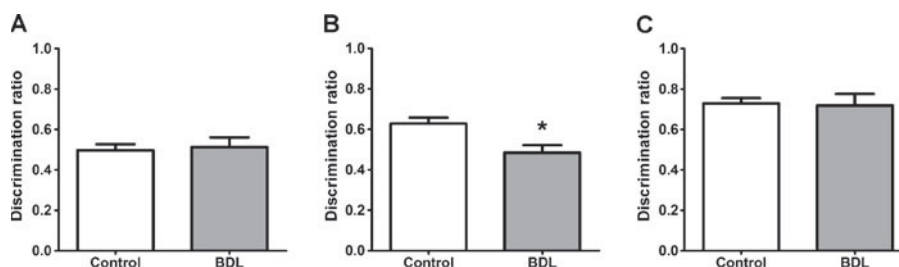
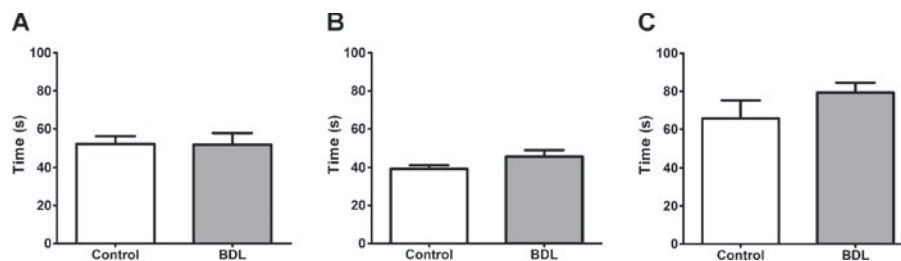


Fig. 2 Total time of exploration in both objects during the training **a**, STM **b** and LTM **c** sessions for the control (white bars, $n=10$) and BDL (gray bars, $n=7$) rats. Results are presented as mean \pm SEM



preferentially novel stimuli over familiar stimuli (Winters et al. 2008).

In the present study the object recognition task was performed in order to evaluate cognitive function in the BDL rats. It was verified that during the training session the BDL and control rats behaved similarly, exploring the two identical objects for the same period of time, revealing that the BDL rats were as motivated as the control group when facing the novelty. However, the BDL rats exhibited impaired STM, since animals did not discriminate the novel object introduced in this session for a longer period of time than the familiar object. It is important to note that the decreased discrimination ratio observed for the BDL rats was not a consequence of decreased exploration, since BDL rats exhibited no differences in total time of exploration when compared to the control rats. In the last session evaluating LTM, BDL rats had the same behavior as the control rats, discriminating more the novel object than the familiar one. Moreover, during the LTM session both the control and BDL rats exhibited increased discrimination ratios when compared to the values for STM and the training sessions, which characterizes exploration of the novel object with higher intensity than the familiar one. This behavior is likely a consequence of memory reinforcement, since rats were exposed to the familiar object two times before the LTM session. In addition, the BDL rats also exhibited an increased discrimination ratio for LTM, although having STM deficits. This result is not surprising, since it has been demonstrated that the mechanisms of STM and LTM are distinct, even though they share common pathways at the receptor and biochemical levels (Izquierdo et al. 1999).

In agreement with the results presented here, García-Ayllón et al. (2008) verified an STM deficit in BDL rats after four hours retention delay. However, LTM was not evaluated in that study. García-Moreno et al. (2005) also evaluated recognition memory in BDL rats but contrary to the results obtained here, it was described as impaired LTM. However, it should be considered that the protocol employed in that study was different from the one described here, i.e. the BDL rats were not tested for STM and the retention delay for the LTM session was 48 h.

Other studies have also demonstrated memory alterations in different animal models used for the study of HE. Spatial and working memory deficits have been described using the

Morris water maze task (Monfort et al. 2007; Méndez et al. 2008), as well as by the active avoidance, a contextual fear conditioning behavioral task (Méndez et al. 2009) in portocaval anastomosis (PCA) and BDL rats. Importantly, in addition to the memory deficits, the animals also exhibited a delay in learning the tasks. In this regard, studies employing the Y-maze behavioral task, a conditional discrimination task verified learning impairment in PCA, BDL and hyperammonemic rats (Erceg et al. 2005a; Cauli et al. 2007b; Rodrigo et al. 2010). However, it should be considered that each behavioral task is employed for a specific purpose, evaluating different kinds of learning and memory processes and the brain areas involved. In this context, recognition memory has been described to involve the medial temporal lobe, although recent findings have questioned the importance of the hippocampus and suggested that the perirhinal cortex plays a more important role in this kind of memory (Winters and Bussey 2005; Winters et al. 2008).

The disturbance in different neurotransmitter pathways have been related to the learning and memory abnormalities observed in the experimental models of HE. An altered signaling pathway related to glutamatergic neurotransmission, i.e. the glutamate – nitric oxide -cyclic guanine monophosphate (cGMP) pathway, has been found altered in PCA rats (Erceg et al. 2005a). In addition, an increased acetyl-cholinesterase activity in the cerebral cortices of BDL rats with STM impairment has been reported (García-Ayllón et al. 2008). Disturbances in the GABAergic system have been related to memory impairment, and drugs which lead to GABA_A receptor activation inhibit memory consolidation (Rossato et al. 2004). In this context, altered GABAergic neurotransmission was also described in PCA rats, which exhibited increased brain concentration of neurosteroids that are positive modulators of GABA_A receptors (Ahboucha et al. 2008). Also, an increased GABA concentration in the cerebellum of hyperammonemic rats has been demonstrated (Cauli et al. 2009). The aberration in GABA biosynthesis in cerebral cortices of BDL rats previously described may contribute to the memory impairment verified in the present study (Leke et al. 2011).

In conclusion, the BDL rats exhibited impairment of STM for recognition memory, while LTM remained unaffected. To understand the neurochemical mechanisms behind this memory deficit and in particular the role of the

GABAergic system in this, further studies are needed. As a perspective, we are currently evaluating the expression of enzymes involved in GABA biosynthesis in the brains of BDL and control rats.

Acknowledgement This study has been supported by the Brazilian funding agencies Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos from Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Auxílio Recém Doutor - 11/1743.0). In addition, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (159769/2010-8) is cordially acknowledged for the post-doctoral fellowship for RL.

References

- Ahboucha S, Butterworth RF (2007) The neurosteroid system: an emerging therapeutic target for hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 22:291–308. doi:10.1007/s11011-007-9065-2
- Ahboucha S, Jiang W, Chatauret N, Mamer O, Baker GB, Butterworth RF (2008) Indomethacin improves locomotor deficit and reduces brain concentrations of neuroinhibitory steroids in rats following portacaval anastomosis. *Neurogastroenterol Motil* 20:949–57. doi:10.1111/j.1365-2982.2008.01132.x
- Ahboucha S, Talani G, Fanutza T, Sanna E, Biggio G, Gamrani H, Butterworth RF (2012) Reduced brain levels of DHEAS in hepatic coma patients: Significance for increased GABAergic tone in hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 61:48–53. doi.org/10.1016/j.neuint.2012.03.020
- Albrecht J, Jones EA (1999) Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci* 170:138–46. doi.org/10.1016/S0022-510X(99)00169-0
- Bender AS, Norenberg MD (2000) Effect of ammonia on GABA uptake and release in cultured astrocytes. *Neurochem Int* 36:389–95. doi:10.1016/s0197-0186(99)00130-8
- Bevins RA, Besheer J (2006) Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study “recognition memory”. *Nat Protoc* 1:1306–11. doi:10.1038/nprot.2006.205
- Cauli O, Mlili N, Llansola M, Felipe V (2007a) Motor activity is modulated via different neuronal circuits in rats with chronic liver failure than in normal rats. *Eur J Neurosci* 25:2112–22. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05435.x
- Cauli O, Rodrigo R, Piedrafita B, Boix J, Felipe V (2007b) Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatology* 46:514–9. doi:10.1002/hep.21734
- Cauli O, Mansouri MT, Agusti ANA, Felipe V (2009) Hyperammonemia increases GABAergic tone in the cerebellum but decreases it in the rat cortex. *Gastroenterology* 136:1359–67. doi:10.1053/j.gastro.2008.12.057
- Erceg S, Monfort P, Hernandez-viadel M, Llansola M, Montoliu C, Felipe V (2005a) Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain Res* 1036:115–21. doi:10.1016/j.brainres.2004.12.045
- Erceg S, Monfort P, Hernández-Viadel M, Rodrigo R, Montoliu C, Felipe V (2005b) Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology* 41:299–306. doi:10.1002/hep.20565
- Felipo V, Butterworth RF (2002) Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* 67:259–79. doi:10.1016/S0301-0082(02)00019-9
- Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT (2002) Hepatic encephalopathy—definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 35:716–21. doi:10.1053/jhep.2002.31250
- García-Ayllón MS, Cauli O, Silveyra MX, Rodrigo R, Candela A, Compañ A, Jover R, Pérez-Mateo M, Martínez S, Felipo V, Sáez-Valero J (2008) Brain cholinergic impairment in liver failure. *Brain* 131:2946–56. doi:10.1093/brain/awn209
- García-Moreno L, Conejo N, González-Pardo H, Aller M, Nava M, Arias J, Arias J (2005) Evaluation of two experimental models of hepatic encephalopathy in rats. *Braz J Med Biol Res* 38(1):127–32. doi:10.1590/S0100-879X2005000100019
- Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo L a, Barros DM (1999) Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 103:1–11. doi:10.1016/S0166-4328(99)00036-4
- Jones EA, Basile AS (1998) Does ammonia contribute to increased GABA-ergic neurotransmission in liver failure? *Metabolic brain disease* 13:351–360. doi:10.1023/A:1020693026810
- Jones E, Schafer D, Ferenci P (1984) The GABA hypothesis of the pathogenesis of hepatic encephalopathy: current status. *Yale J Biol Med* 57:301–16
- Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ (1984) Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 65:305–11
- Leke R, Bak L, Iversen P, Sørensen M, Keiding S, Vilstrup H, Ott P, Portela LV, Schousboe A, Waagepetersen HS (2011) Synthesis of neurotransmitter GABA via the neuronal tricarboxylic acid cycle is elevated in rats with liver cirrhosis consistent with a high GABAergic tone in chronic. *J Neurochem* 117:824–32. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07244.x
- Leke R, de Oliveira DL, Mussulini BHM, Pereira MS, Kazlauckas V, Mazzini G, Hartmann CR, Silveira TR, Simonsen M, Bak LK, Waagepetersen HS, Keiding S, Schousboe A, Portela LV (2012) Impairment of the organization of locomotor and exploratory behaviors in bile duct-ligated rats. *PLoS One* 7:e36322. doi:10.1371/journal.pone.0036322
- Méndez M, Méndez-López M, López L, Aller MÁ, Árias J, Cimadevilla JM, Árias JL (2008) Spatial memory alterations in three models of hepatic encephalopathy. *Behav Brain Res* 188:32–40. doi:10.1016/j.bbr.2007.10.019
- Méndez M, Méndez-López M, López L, Aller MA, Arias J, Arias JL (2009) Associative learning deficit in two experimental models of hepatic encephalopathy. *Behav Brain Res* 198:346–51. doi:10.1016/j.bbr.2008.11.015
- Monfort P, Erceg S, Piedrafita B, Llansola M, Felipe V (2007) Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability. *Eur J Neurosci* 25:2103–11. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05444.x
- Mumby DG (2001) Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. *Behav Brain Res* 127:159–81. doi:10.1016/S0166-4328(01)00367-9
- Oja SS, Saransaari P, Wysmyk U, Albrecht J (1993) Loss of GABAB binding sites in the cerebral cortex of rats with acute hepatic encephalopathy. *Brain Res* 629:355–357. doi:10.1016/0006-8993(93)91346-T
- Ortiz M, Córdoba J, Jacas C, Flavià M, Esteban R, Guardia J (2006) Neuropsychological abnormalities in cirrhosis include learning impairment. *J Hepatol* 44:104–10. doi:10.1016/j.jhep.2005.06.013
- Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo JM, Felipe V (2010) Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 139:675–84. doi:10.1053/j.gastro.2010.03.040
- Rossato JI, Bonini JS, Coitinho AS, Vianna MRM, Medina JH, Cammarota M, Izquierdo I (2004) Retrograde amnesia induced

- by drugs acting on different molecular systems. *Behav Neurosci* 118:563–8
- Weissenborn K, Heidenreich S, Giewekemeyer K, Ru N, Hecker H (2003) Memory function in early hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 39:320–5. doi:[10.1016/S0168-8278\(03\)00295-2](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00295-2)
- Weissenborn K, Bokemeyer M, Krause J (2005a) Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease. *AIDS* 19:S93–8
- Weissenborn K, Giewekemeyer K, Heidenreich S, Bokemeyer M, Berding G, Ahl B (2005b) Attention, memory, and cognitive function in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 20:359–67. doi:[10.1007/s11011-005-7919-z](https://doi.org/10.1007/s11011-005-7919-z)
- Winters BD, Bussey TJ (2005) Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *J Neurosci* 25:52–61. doi:[10.1523/JNEUROSCI.3827-04.2005](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3827-04.2005)
- Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ (2008) Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1055–70. doi:[10.1016/j.neubiorev.2008.04.004](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.04.004)
- Wysmyk U, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (1992) Enhanced GABA release in cerebral cortical slices derived from rats with thioacetamide-induced hepatic encephalopathy. *Neurochem Res* 17:1187–1190. doi:[10.1007/BF00968397](https://doi.org/10.1007/BF00968397)

ANEXO II

PLOS ONE

Lactobacillus rhamnosus GG Reduces Hepatic Fibrosis in a Model of Chronic Cholestatic Liver Disease in Rats

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PONE-D-15-41972
Article Type:	Research Article
Full Title:	Lactobacillus rhamnosus GG Reduces Hepatic Fibrosis in a Model of Chronic Cholestatic Liver Disease in Rats
Short Title:	Lactobacillus rhamnosus GG in Hepatic Fibrosis
Corresponding Author:	Thais Ortiz Hammes Hospital de Clínicas de Porto Alegre Porto Alegre, Rio Grande do Sul BRAZIL
Keywords:	Probiotics; liver fibrosis; Lactobacillus rhamnosus; bile duct-ligated rats
Abstract:	<p>Background & Aims: To evaluate the effect of Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) for the treatment of liver fibrosis originated from cholestatic disease, in rats.</p> <p>Methods: Male adult Wistar rats (n = 29) were submitted to common bile duct ligation (BDL), whereas the control group (Ctrl) undergone the manipulation of bile duct without ligation. Two weeks after surgery, each group was randomly divided in another set of groups, resulting in total of four groups. The groups received 1 ml of PBS or PBS containing 2.5 x 10⁷ CFU of LGG through gavages for 14 days. The treatment was followed by a 5-day washout period and the animals were euthanized in day 33.</p> <p>Results: Both BDL groups had an increase of hepatic mRNA expression of Il-6 when compared to Ctrl, and LGG treatment reduced Il-6 expression in comparison with BDL. The hepatic mRNA expression of Tlr4 and Tgfβ was increased in BDL compared with Ctrl, and LGG administration attenuated this increase. The BDL group showed an increase of oxidative parameters in liver when compared to Ctrl (sulfhydryl levels and SOD/CAT ratio) and this was partially reverted with LGG treatment. The collagen deposition and ductular reaction, evaluated by immunohistochemistry of cytokeratin-7, were significantly higher in BDL groups in comparison to Ctrl group. The treatment with LGG significantly reduced these parameters in comparison to BDL group.</p> <p>Conclusion: Treatment with LGG reduces liver fibrosis, ductular reaction, and hepatic mRNA expression of Il-6 in a model of chronic cholestatic liver disease in rats.</p>
Order of Authors:	<p>Thais Ortiz Hammes</p> <p>Renata Leke</p> <p>Michael Éverton Andrades</p> <p>Thayssa Dalla Costa Escobar</p> <p>Laisa Beduschi Fracasso</p> <p>Fabiola Schons Meyer</p> <p>Themis Reverbel da Silveira</p>
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Financial Disclosure	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos of Hospital de Clínicas de Porto Alegre http://www.hcpa.edu.br/content/view/1591/1112/ TRS
Please describe all sources of funding that have supported your work. A complete funding statement should do the following:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). http://www.capes.gov.br/ TOH TRS

1 ***Lactobacillus rhamnosus* GG Reduces Hepatic Fibrosis in a Model of Chronic**
2 **Cholestatic Liver Disease in Rats**

3

4 Thais Ortiz Hammes^{1,2*}; Renata Leke^{1,3}, Michael Éverton Andrades⁵, Thayssa Dalla Costa
5 Escobar¹, Laisa Beduschi Fracasso¹, Fabiola S. Meyer⁴, Themis Reverbel da Silveira ^{1,2}

6

7 ¹ Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Experimental Research Center. Experimental
8 Laboratory of Hepatology and Gastroenterology. Porto Alegre, RS, Brazil.

9 ² Post Graduate Program: Gastroenterology and Hepatology Sciences. Medical Faculty,
10 Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil.

11 ³ Department of Clinical Neuroscience and Rehabilitation, Institute of Neuroscience and
12 Physiology, Sahlgrenska Academy at the University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden.

13 ⁴ Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Experimental Research Center. Unit of Animal
14 Experimentation. Porto Alegre, RS, Brazil.

15 ⁵ Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Experimental Research Center. Unit of Molecular and
16 Protein Analysis. Porto Alegre, RS, Brazil.

17

18 Corresponding author

19 E-mail: thaisortizhammes@gmail.com (TOH)

20

1

2 **Abstract**

3 Background & Aims: To evaluate the effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) for the
4 treatment of liver fibrosis originated from cholestatic disease, in rats.

5 Methods: Male adult Wistar rats (n = 29) were submitted to common bile duct ligation (BDL),
6 whereas the control group (Ctrl) undergone the manipulation of bile duct without ligation.

7 Two weeks after surgery, each group was randomly divided in another set of groups, resulting
8 in total of four groups. The groups received 1 ml of PBS or PBS containing 2.5×10^7 CFU of
9 LGG through gavages for 14 days. The treatment was followed by a 5-day washout period
10 and the animals were euthanized in day 33. Results: Both BDL groups had an increase of
11 hepatic mRNA expression of *Il-6* when compared to Ctrl, and LGG treatment reduced *Il-6*
12 expression in comparison with BDL. The hepatic mRNA expression of *Tlr4* and *Tgf β* was
13 increased in BDL compared with Ctrl, and LGG administration attenuated this increase. The
14 BDL group showed an increase of oxidative parameters in liver when compared to Ctrl
15 (sulfhydryl levels and SOD/CAT ratio) and this was partially reverted with LGG treatment.
16 The collagen deposition and ductular reaction , evaluated by immunohistochemistry of
17 cytokeratin-7, were significantly higher in BDL groups in comparison to Ctrl group. The
18 treatment with LGG significantly reduced these parameters in comparison to BDL group.
19 Conclusion: Treatment with LGG reduces liver fibrosis, ductular reaction, and hepatic mRNA
20 expression of *Il-6* in a model of chronic cholestatic liver disease in rats.

21

22 **Keywords:** probiotics, liver fibrosis, *Lactobacillus rhamnosus*, bile duct-ligated rats

23

24

1 **Introduction**

2 Liver fibrosis is characterized by excessive accumulation of extracellular matrix, mostly
3 collagen type I, in response to acute or chronic liver injuries (1). The causes of fibrosis
4 include viral hepatitis, steatohepatitis for alcohol or obesity, autoimmune or metabolic
5 disease, drug exposition and others(1). The etiology of liver injury defines the pattern of
6 fibrosis progression and the involvement of the different populations of myofibroblasts (2).

7 Myofibroblasts can be originated from different cells, as periportal fibroblasts or hepatic
8 stellate cell (HSC)(2). Although, portal myofibroblasts are common in biliary fibrosis,
9 myofibroblast originated from HSC activation is also important in that process (3). The
10 activated-HSC is the principal cell involved in collagen production. Its activation results in an
11 intense pro-inflammatory and pro-fibrogenic response, which can be induced by apoptotic
12 bodies, reactive oxygen species (ROS), and bacterial endotoxins (4).

13 Gut-derived bacterial products, like lipopolysaccharides, reach the liver through portal vein
14 and can mediate several immune responses with participation of inflammatory cytokines (5).
15 Bacterial endotoxins can bind to Toll-like receptor 4 (TLR4) present in hepatic cells which
16 trigger the release of $TNF\alpha$, IL-6, IL1 β , and other inflammatory cytokines (5). This signaling
17 promotes production of collagen by activated-HSC, mediated by $Tg\beta$ (6).

18 Because of the importance of gut-liver axis in fibrosis progression, it has been hypothesized
19 that the modulation of intestinal microbiota using probiotics could improve the gut barrier and
20 reduce inflammatory and fibrogenic response in liver disease (7, 8). Probiotics are live micro-
21 organisms that, when consumed in adequate amounts, confer a health benefit on the host (9).

22 The *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) is a commensal bacteria that was patent as probiotic
23 in 1985 with ability to resist to digestive secretions and to attach to the intestinal mucosa (10).

24 The consumption of LGG is safe and studied and many disease like allergy, diarrhea and fatty

1 liver disease (11-13). But, until now, the use of LGG was not tested in hepatic fibrosis.
2 Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG in
3 hepatic fibrosis in a model of chronic cholestatic liver disease in rats.

4

5 **Materials and Methods**

6 **Ethics statement**

7 All procedures were conducted according to the Guide for the Care and Use of Laboratory
8 Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication number 85 – 23,
9 revised 1996) of the National Guidelines on Animal Care. In addition, the experimental
10 protocols were approved by the local Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto
11 Alegre (Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - nº 12
12 0312).

13

14 **Animals and study design**

15 Twenty-nine adult male Wistar rats (2 months old, $299.89\text{g} \pm 42.89\text{ g}$) were obtained from the
16 Experimental Animal Unit of Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The
17 rats were allocated four per cage and maintained in a controlled environment (room
18 temperature $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, standard light/dark cycle of 12 h–lights on at 07:00 am). Standard
19 food and water were given *ad libitum*. Animals were randomly distributed into two surgical
20 groups: bile duct-ligated ($n=17$) or sham-operated ($n=12$). The bile duct ligation procedure
21 was conducted as previously described (14). Rats were anaesthetized with ketamine (90
22 mg/kg) and xylazine (12 mg/kg) intraperitoneally. After laparotomy, the bile duct was double
23 ligated with non-absorbent surgical sutures and resected between the two ligatures. The sham-
24 operated rats undergone the same surgical procedure with exception of bile duct ligation and

1 resection. Before returning to home-cages, all animals received a subcutaneous injection of
2 tramadol (5 mg/kg).

3 Two weeks after surgery, the two experimental groups were randomly subdivided into
4 two groups, which received the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (LGG)
5 or phosphate buffered saline (PBS). Six sham-operated (Ctrl-P) and 8 bile duct-operated
6 (BDL-P) rats received 2.5×10^7 colony-forming units of LGG (Culturelle™, Amerifit, EUA)
7 in 1 ml of PBS through gavages (11). The other 6 sham-operated (Ctrl) and 9 bile duct-
8 operated (BDL) rats received gavages containing just 1 ml of PBS.

9 The treatment was performed daily during two weeks (from the second to the fourth week
10 post-surgery) and followed by a 5-day washout period to evaluate if the probiotic effect
11 remains even in the absence of treatment. The animals were euthanized by exsanguination 33
12 days after surgery.

13

14 **Sample collection**

15 Rats were anesthetized as previously described, and blood samples were withdrawn by
16 cardiac puncture from left ventricle, centrifuged for 5 minutes at $5000 \times g$, and plasma was
17 stored at -80°C , until the analysis of biochemical markers of liver dysfunction. Subsequently,
18 rats received 0.1 ml of heparin (5000 U/ml) and were perfused with 50 ml (500 ml/h) of PBS
19 at 4°C , using an infusion pump with cannula inserted into the heart left ventricle. Liver
20 samples were taken from the median lobe (approximately 50 mg each) and stored at -80°C for
21 further investigation of gene expression, oxidative stress and ELISA. The remaining of the
22 liver tissue was stored in a 10% formaldehyde buffered solution for histological examination.

23

1 **Oxidative stress analyses**

2 To determine the reduced thiol (SH) groups present in liver samples the protocol according to
3 Soszynski et al (15) was performed. Briefly, free sulfhydryl groups in the liver samples (40
4 μL) were reacted with 10 μL of 10 mM DTNB (Sigma-Aldrich # D8130) (diluted in ethanol),
5 and the formation of the yellowish 2-nitro-5-thiobenzoate was measured by
6 spectrophotometer, at 412 nm. The concentration of color complex protein was determined
7 using the linear equation obtained with a standard curve of reduced glutathione. Results were
8 presented as nmol of SH/mg of protein.

9 The analysis of catalase (CAT) activity was based on the sample ability in consuming
10 hydrogen peroxide compared to a standard curve built with purified catalase (Sigma-Aldrich,
11 # C9322). The reaction was followed at 240 nm and expressed as $\text{Unit}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ (16). The
12 superoxide dismutase (SOD) catalyzes the reaction of two superoxide anions resulting in the
13 formation of hydrogen peroxide that is less reactive and can be degraded by enzymes such as
14 CAT. The analysis of SOD is based on the ability of the sample to inhibit the superoxide-
15 mediated adrenaline oxidation (17). One unit of SOD activity was defined as the amount of
16 enzyme required to inhibit the reaction of oxidation by 50%, measured by absorbance at 480
17 nm and was expressed as $\text{Unit}\cdot\text{mg protein}^{-1}$. All analyses were normalized by protein content
18 estimated by Bradford methods (Bio-Rad, # 500-0201)(18).

19

20 **Gene expression**

21 Total RNA from liver samples (50 mg) were isolated using TRIzol[®] reagent (Invitrogen,
22 Carlsbad, CA), according to the manufacturer's instruction. First strand cDNA was
23 synthesized from 1.25 μg of total RNA using High Capacity cDNA reverse Transcription Kit
24 (Invitrogen[™], Life Technologies[™], Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's
25 protocol. Gene expression analysis was performed in duplicate, in 48 well StepOne[™] system

1 (Applied Biosystems[®], Life Technologies[™], Carlsbad, CA, USA) using TaqMan[®] Gene
2 Expression Assays (Life Technologies[™], Carlsbad, CA, USA). The following genes were
3 investigated: Tumor Necrosis Factor Alpha (*Tnf-α*: Rn01525859_g1), Interleukin 6 (*Il-*
4 *6*:Rn00561420_m1), Toll like receptor 4 (*Tlr4*: Rn00569848_m1), Transforming growth
5 factor beta (*Tgf-β*: Rn00572010_m1), Matrix Metalloproteinases 2 and 9 (*Mmp2*:
6 Rn01538170_m1; *Mmp9*: Rn00579162_m1), and beta-actin (β-actin: Rn00667869_m1) as
7 endogenous control. Each reaction contained 5 μl of TaqMan[®] Gene Expression PCR Master
8 Mix (Life Technologies[™], CA, USA), 0.5 μL of the probe for each target gene, 2 μl of
9 diluted cDNA (100 ng) in 10 μL of final reaction mixture. The two-step PCR conditions were
10 2 minutes at 50°C, 10 minutes at 95°C, 40 cycles with 10 seconds at 95°C, and 1 minute at
11 60°C. All samples were analyzed in duplicate and gene expression was quantified using the 2⁻
12 $\Delta\Delta C_t$ (threshold cycle) method(19).

13

14 **Enzyme Linked Immune Sorbent Assay (ELISA)**

15 Interleukin 10 and 1β were assessed in the liver homogenate using commercially available
16 ELISA kits (Rat IL-10Quantikine ELISA Kit, #R1000 and Rat IL-1β Quantikine ELISA Kit,
17 # R6000B). Briefly, livers were homogenized in phosphate buffer with 1% Triton (pH 7.2),
18 diluted 5.55 times and assayed following the kit manual. Protein content was determined (18)
19 and results were expressed as picogram of interleukin /mg of protein.

20

21 **Histological and immunohistochemical assessment**

22 Livers were fixed in 10% buffered formalin for 48 hours, paraffin embedded, and sectioned (3
23 μm). Five-micrometer-thick sections were used for both immunohistochemistry and
24 Picrosirius Red staining. To assess biliary ductular reaction, it was performed
25 immunohistochemistry assay to label a cytokeratin 7 (CK7), a marker of biliary epithelium in

1 outlining biliary structures (20). Sections were incubated with mouse anti-CK7 primary
2 antibody (Abcam, Ab9021; dilution 1:100), and immunolabeling was amplified using the
3 avidin-biotin-peroxidase complex, as described previously (21). As secondary antibody, it
4 was used a multispecies reagent (EasyPath; Erviegas Ltd, São Paulo, Brazil). Picrosirius Red
5 was performed in order to evaluate the fibrosis extent.

6 Three images were photographed (at 10-fold magnification) for each liver section
7 using Q Capture Pro Software v.5.1.1.14 (Q Imaging Co. Burnaby, BC, Canada) and were
8 quantified using Adobe® Photoshop® CS3 software. To quantify CK7 presence and collagen
9 deposition, the color depicting positivity (red for Picrosirius staining and brown for CK7
10 immunohistochemistry) was selected. The color representing the liver parenchyma (green or
11 blue for Picrosirius and CK7 immunohistochemistry, respectively) was set as background.
12 Total positivity was calculated by dividing the total pixels for positivity and background by
13 the number of pixels of the color of interest (22).

15 **Sample size calculation and statistical analysis**

16 Sample size calculation was based in collagen quantification in liver using Picrosirius staining
17 in a pilot study. A sample of 5 animals was calculated to detect a reduction of 20% in hepatic
18 content of collagen in BDL-P (1.05) compared to BDL (1.37), considering 80% power and
19 5% significance (Winpepi11.44).

20 Statistical analysis was performed by using Prism 5 (Graph Pad, San Diego, USA).
21 Distributions were first tested for normality using the Shapiro-Wilk test. Multiple
22 comparisons between Gaussian distributions were performed using 1-way ANOVA with
23 Tukey-Kramer post hoc tests. For non-normal distributions, the Kruskal-Wallis test was used
24 with Dunn post hoc tests for multiple comparisons. Data is presented as mean \pm standard
25 deviation. Results with $p < 0.05$ were considered significant.

1 Results

2 LGG do not affect clinical and biochemical parameters of cholestatic disease

3 At the fourth week after surgery, BDL and BDL-P rats exhibited signs of a chronic cholestatic
4 liver disease: hepatic enlarged abdomen, yellowish fur and tail, hepatomegaly and
5 splenomegaly. Plasma biochemical analysis confirmed these findings. Rats submitted to the
6 bile duct ligation, BDL or BDL-P groups, exhibited higher plasma levels of total bilirubin,
7 alkaline phosphatase and gamma glutamyl transferase, accompanied by a reduction of body
8 weight and albumin levels when compared to control groups (Table 1).

9
10 **Table 1. Biochemical Analyses and Body Weight at the End of the Study.**

	Ctrl	Ctrl-P	BDL	BDL-P	P
Weight (g)	413.7 ± 72.8	413.2 ± 25.5	311.23 ± 17.9*#	323.3 ± 27.2*#	< 0.001
Weight gain (g) ^a	93.9 ± 14.5	99.1 ± 12.1	34.0 ± 33.2*#	30.8 ± 29.6*#	< 0.001
Albumin (mg/dL)	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.3	3.1 ± 0.5*#	3.1 ± 0.4*	0.017
Total Bilirubin (mg/dL)	0.3 ± 0	0.3 ± 0	10.1 ± 0.8*#	10.4 ± 0.8*#	< 0.001
Alkaline phosphatase (U/L)	155 ± 33.3	138.4 ± 44.2	275 ± 58.1*#	307.4 ± 61.5*#	< 0.001
Gamma glutamyl transferase (U/L)	1.8 ± 1.6	1.6 ± 1.3	66.4 ± 32.3*#	61.9 ± 28.4*#	< 0.001

11

1 To test differences among groups, ANOVA were used ($P < 0.05$). ^a Weight gain was
2 calculated by a difference between the final weight and the weight at the beginning of the
3 experimental. *Difference versus Ctrl. #Difference versus Ctrl-P.

4

5 **Effect of LGG on oxidative stress parameters**

6 Bile duct ligation induced a significant reduction in CAT activity when compared to the Ctrl
7 ($P < 0.001$, Fig.1) and Ctrl-P ($P < 0.001$) but no difference was detected between BDL and
8 BDL-P. In contrast, no changes were found for SOD activity among the groups ($P = 0.1025$,
9 Fig.1). Increased SOD/CAT ratio can be related to a pro-oxidative status because hydrogen
10 peroxide, the product of SOD reaction, is not fully transformed in H₂O and O₂. The BDL
11 group had higher SOD/CAT ratio when compared to Ctrl ($P < 0.05$) and Ctrl-P ($P < 0.01$,
12 Fig.1). The treatment with LGG promoted a reduction of about 30% in SOD/CAT ratio in
13 comparison to BDL group, albeit not significant. BDL-P had no difference in SOD/CAT ratio
14 in comparison to both control groups. The SH levels were increased in BDL group compared
15 to Ctrl ($P < 0.05$) and Ctrl-P ($P < 0.01$, Fig.1) without any difference between BDL-P in
16 comparison to both control groups.

17

18 **Fig. 1. The Effect of *L.rhamnosus* GG on SOD and CAT Activity, SOD/CAT Ratio, and**

19 **Content of Sulphydryl Groups.** To test differences between groups, ANOVA followed by

20 the Tukey test were used ($P < 0.05$). *Difference versus Ctrl. #Difference versus Ctrl-P.

21

22 **LGG reduces hepatic inflammation**

23 The mRNA expression of *Tnf- α* was higher in both BDL groups in comparison with Ctrl
24 and Ctrl-P ($P < 0.001$, Fig. 2). No difference was observed between BDL and BDL-P. The
25 expression of *Tlr4* was also increased in the BDL group than in Ctrl and Ctrl-P groups ($P <$
26 0.05 , Fig. 2). No difference was found between BDL-P, Ctrl or BDL groups. Both BDL and

1 BDL-P exhibited an increase of *Il-6* mRNA expression when compared to Ctrl and Ctrl-P (P
2 < 0.01 , Fig. 2). The treatment with LGG lead to a reduction in *Il-6* expression in comparison
3 to BDL group ($P < 0.05$). BDL group had an increase expression of *Tgfb* if compared to Ctrl
4 and Ctrl-P ($P < 0.01$, Fig. 2). BDL-P had no difference in *Tgfb* mRNA expression in
5 comparison to Ctrl or BDL group. Both BDL and BDL-P had an increase of *Mmp2* expression
6 when compared control groups (Ctrl: 1.06 ± 0.38 ; Ctrl-P: 1.38 ± 0.11 ; BDL: 3.45 ± 0.87 ;
7 BDL-P: 4.13 ± 1.49 ; $P < 0.05$; S1 Fig.). No difference was observed between BDL and BDL-
8 P. Similar results are found to *Mmp9* expression (Ctrl: 1.14 ± 0.49 ; Ctrl-P: 1.38 ± 0.49 ; BDL:
9 3.89 ± 1.48 ; BDL-P: 4.42 ± 2.44 ; $P < 0.05$; S1 Fig).

10

11 **Fig. 2. The Effect of LGG Treatment on Gene Expression in Hepatic Tissue.** Gene

12 expression was evaluated by qPCR and differences were tested by ANOVA followed by the
13 Tukey ($P < 0.05$). *Difference versus Ctrl. #Difference versus Ctrl-P. &Difference versus BDL.

14

15 The levels of *IL-1 β* in BDL group was significantly higher in comparison to both control
16 groups (Ctrl: 10.84 ± 2.71 ; Ctrl-P: 10.69 ± 4.41 ; BDL: 55.72 ± 22.74 ; BDL-P: 42.77 ± 5.65 ; P
17 < 0.05 ; S2 Fig). The BDL-P *IL-1 β* levels were not different from Ctrl or BDL group. There
18 were no difference in the levels of *IL-10* among the groups ($P = 0.46$; S2 Fig).

19

20 **LGG reduces hepatic collagen depots**

21 The content of collagen was significantly increased in BDL and BDL-P groups in comparison
22 to the Ctrl and Ctrl-P ($P < 0.00$; Fig. 3). The treatment with LGG significantly reduced
23 hepatic collagen deposition in comparison to BDL group ($P < 0.05$). The CK7
24 immunohistochemistry is a marker for early progenitor cell responses in periportal regions
25 and highlights ductular reactions (23). The BDL groups had a higher immunocontent of CK7

1 when compared to Ctrl ($P < 0.001$, Fig. 4) and Ctrl-P ($P < 0.001$; $P < 0.01$, BDL and BDL-P
2 respectively). There was a reduction in CK7 content in BDL-P group in comparison to BDL
3 ($P < 0.05$).

4

5 **Figure 3. The Effect of LGG on Content of Collagen Evaluated by Picrosirius Red.** All
6 images were captured at 400-fold final magnification. To test differences between groups,
7 ANOVA followed by the Tukey test was used ($P < 0.05$). *Difference versus Ctrl. #Difference
8 versus Ctrl-P. &Difference versus BDL.

9

10

11 **Figure 4. The Effect of LGG on Immunocontent of Cytokeratin 7.** All images were
12 captured at 400-fold final magnification. To test differences between groups, ANOVA
13 followed by the Tukey test was used ($P < 0.05$). *Difference versus Ctrl. #Difference versus
14 Ctrl-P. &Difference versus BDL.

15

16 **Discussion**

17 In this study we showed the effects of the LGG treatment on fibrosis progression in a model
18 of cholestatic disease. Our data support the hypothesis that probiotic treatment can reduce the
19 hepatic collagen deposition and biliary reaction, and suggest that it can be mediated by *Il-6*
20 expression in liver.

21 In the BDL model, the proliferation of biliary cells is accompanied by a ductular reaction that
22 results in portal inflammation and fibrosis (24). Because portal fibroblasts are located
23 adjacent to bile duct epithelia, they are mostly implicated in biliary cirrhosis and known as the
24 first cells to respond in this obstructive liver disease (3, 25). Periportal fibroblasts produces
25 and secrete *Tgfb* and inflammatory cytokines that can induce the transdifferentiation of HSC

1 into myofibroblasts, which are responsible for a later cellular response in cholestatic disease
2 (3, 25, 26).

3 In the present study, we investigated the effect of probiotic on an already established
4 cholestatic liver disease. As previously showed by Georgiev et al, liver changes induced by
5 BDL model occurred within the firsts 14 days, with no more significant collagen
6 accumulation after that time, demonstrating that this time period is suitable for the study of
7 cholestatic chronic disease (27). As expected, we found a significant increase in classical
8 markers of cholestasis in rats subjected to the bile duct ligation (27). Nonetheless, the
9 treatment with probiotic did not lead to changes in the overall clinical manifestation or in the
10 biochemical parameters of biliary flow. Zhou et al found a decreased total bilirubin evaluated
11 in portal serum of bile duct-ligated rat after treatment with 2×10^8 CFU/mL of *L. plantarum*
12 (28). However, we evaluated plasma parameters in blood collected by cardiac puncture. The
13 difference in blood collection could explain why we did not find similar results to Zhou et al.

14 According to Lee *et al*, damages in hepatocyte or biliary epithelium is a *sine qua non*
15 condition to the development of a chronic hepatic disease that is followed by an intense
16 inflammatory and fibrogenic response (1). The persistence of inflammatory signaling plays an
17 important role in driving fibrogenesis (1, 2). Myofibroblasts can directly contribute to the
18 persisting inflammation by releasing pro-inflammatory mediators or acting as a target of
19 ROS, cytokines or endotoxins (2). In our study, both groups subjected to a BDL procedure
20 have increased oxidative stress - as seen by reduction of CAT activity and SH content. CAT is
21 an enzyme that degrade hydrogen peroxide - a ROS that is product of catalytic reaction of
22 dismutation of a two superoxide anions. SOD and CAT act coordinately to control ROS levels
23 and the SOD/CAT activity ratio gives an idea of enzymatic antioxidant equilibrium (29). BDL
24 group had an SOD/CAT ratio five times higher than control groups, showing a potentially
25 oxidative environment, as confirmed by the decrease in SH levels. LGG treatment presented a

1 slight improvement in SOD/CAT ratio, which can be related to the decrease of activated
2 inflammatory cells.

3 Intestinal dysbiosis and bacterial overgrowth are common in chronic liver disease and can
4 contribute to inflammatory response by activation of *Tlr* family, especially by
5 lipopolysaccharides (1). D'Argenio et al found a down-regulation in hepatic mRNA
6 expression of *Tnfa*, *Il-10*, and *Trl4* with symbiotic treatment in CCl₄ induced-fibrosis in rats
7 but no difference in expression of *Il-1β* (30). In accordance to the previous study, Liu et al
8 found a reduction in hepatic gene expression of *Tnfa* and *Il-6* in the similar model, in which
9 the animals received selenium-enriched probiotics (31). Rashid et al, showed a reduction in
10 plasma TNF α and IL-1 α levels by bile duct ligation with administration of probiotic VSL#3
11 (50 billion bacteria/kg of body weight/day) (32). It is important to note that these studies
12 started probiotic treatment together with the disease induction while, in our study, treatment
13 with LGG was started after a previously established liver disease. This strategy may have lead
14 to a more subtle response, as observed in IL-1 β and *Tlr4*.

15 Furthermore, it has been shown that probiotics were able to reduce *Il-6* in model of liver
16 fibrosis induced by CCl₄ (31, 33). In the BDL model, periportal fibroblasts and Kupffer cells
17 can release specifically *Il-6* that acts modulating the myofibroblasts differentiation (2, 27, 34).
18 Kupffer cells in the periportal region constitutes the first cells to come in contact with
19 bacterial product derived from gut via the portal vein releasing *Il-6* in response to *Tlr*
20 stimulation and can promote HSC activation (35-37). It is possible that LGG treatment can
21 reduce the gut delivered endotoxins, decreasing an activation of Kupffer cells and
22 consequently, reducing *Il-6* expression. Nonetheless, *Il-6* has a controversial role in fibrosis.
23 Although serum and hepatic levels of *Il-6* are increased in patients and animals with acute or
24 chronic liver disease, this cytokine has been associated with protective functions during
25 hepatic fibrogenesis (38). That idea is supported by studies where *Il-6*-deficient animals

1 present an uncommon higher liver fibrosis, which is restored after *Il-6* administration(37).
2 However, in humans with biliary fibrosis, *Il-6* mediates the ductular reaction and is released
3 specifically by biliary ductal epithelia and portal fibroblasts in contrast to other forms of
4 fibrosis (3). In addition, *in vitro* experiments found that *Il-6* derived from Kupffer cells
5 promotes survival and proliferation of HSC, followed by enhancing liver fibrosis (39, 40).
6 Wang et al (39) suggested that *Il-6* can positively or negatively regulate liver fibrosis via
7 targeting different types of liver cells, since *Il-6* receptors are broadly expressed in hepatic
8 cells. Despite of that, in the present study, the reduction of *Il-6* gene expression in BDL-P
9 group was accompanied of a decrease in collagen deposition and ductular reaction, indicating
10 that this cytokine is likely playing a detrimental effect in this model and the treatment with
11 probiotic attenuated its effect.

12 Myofibroblasts are the major cell responsible for excess deposition of extracellular matrix as
13 a response to *Tgfb* released by Kupffer cells and HSC (2). Other fibrogenic signals also
14 participate in this process, such as ROS and lipopolysaccharides (2). In our study, we showed
15 that a treatment with LGG reduced the collagen deposition and ductular reaction. As
16 expected, BDL model have an intense ductular reaction, accompanied by a higher CK7
17 positivity in comparison to Ctrl. The reduction in CK7 content with probiotic treatment
18 indicate a decrease in bile duct proliferation (23). It is known that damage in bile ducts and
19 cells involved in the ductular reaction in human chronic biliary diseases can express *Tgfb*
20 (23). We showed that BDL groups had an increase of about 75% in *Tgfb* expression in
21 comparison to control. In addition, treatment with LGG promoted a 25% reduction in *Tgfb*
22 expression in comparison to BDL group, albeit not statically significant. Biliary cells injury
23 leads to an initial differentiation of portal fibroblasts in myofibroblasts which release high
24 levels of *Tgfb*. This cytokine perpetuate this process since it is required to portal fibroblasts
25 differentiation in myofibroblasts (3). Together, these results indicate that LGG is beneficial for

1 the treatment of fibrosis in a model of cholestatic liver disease in rats. The mechanism by
2 which LGG diminished ductular reaction and collagen deposition is not completely
3 understood, but it could be related to the effect of probiotic in decreasing inflammatory
4 response via *Il-6*. This cytokine might be acting by reducing the hyper-proliferation of bile
5 duct epithelia, myofibroblasts differentiation and *Tgfb* secretion and, consequently collagen
6 deposition.

7 In conclusion, in the present study we demonstrated that LGG administration was effective in
8 attenuating fibrosis and ductular reaction in cholestatic liver disease in rats. The reduction in
9 pro-inflammatory cytokine *Il-6* observed in the animals that received probiotics might be
10 related to the mechanisms by which probiotics exert their beneficial effects. However, further
11 investigation is necessary to better understand these pathways. Based on our results, we
12 suggest that *Lactobacillus rhamnosus* GG is a promising therapy for adjuvant treatment of
13 hepatic fibrosis.

14

15 **Acknowledgments**

16 We thank Ana Helena da Rosa Paz, Carolina Uribe Cruz and Martine Elisabeth Kienzle
17 Hagen for their technical reviewing of the manuscript.

18 **References**

- 19 1. Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational
20 success story. *Gut*. 2015 Feb 13.
- 21 2. Forbes SJ, Parola M. Liver fibrogenic cells. *Best Practice & Research Clinical*
22 *Gastroenterology*. 2011 Apr;25(2):207-17.
- 23 3. Dranoff JA, Wells RG. Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary
24 fibrosis. *Hepatology*. 2010 Apr;51(4):1438-44.
- 25 4. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008
26 May;134(6):1655-69.
- 27 5. Seki E, Schnabl B. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis:
28 crosstalk between the liver and gut. *J Physiol*. 2012 Feb 1;590(Pt 3):447-58.
- 29 6. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, et al. TLR4
30 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nature Medicine*. 2007 Nov;13(11):1324-
31 32.

- 1 7. Szabo G, Bala S, Petrasek J, Gattu A. Gut-liver axis and sensing microbes. *Digestive*
2 *Disease*. 2010;28(6):737-44.
- 3 8. Sommacal HM, Bersch VP, Vitola SP, Osvaldt AB. Perioperative synbiotics decrease
4 postoperative complications in periampullary neoplasms: a randomized, double-blind clinical
5 trial. *Nutr Cancer*. 2015 Apr;67(3):457-62.
- 6 9. Pithva S, Shekh S, Dave J, Vyas BR. Probiotic attributes of autochthonous
7 *Lactobacillus rhamnosus* strains of human origin. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014
8 May;173(1):259-77.
- 9 10. Hibberd PL, Kleimola L, Fiorino AM, Botelho C, Haverkamp M, Andreyeva I, et al.
10 No evidence of harms of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 in healthy
11 elderly-a phase I open label study to assess safety, tolerability and cytokine responses. *PLoS*
12 *One*. 2014;9(12):e113456.
- 13 11. Forsyth CB, Farhadi A, Jakate SM, Tang Y, Shaikh M, Keshavarzian A. *Lactobacillus*
14 GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver
15 injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol (Fayetteville, NY)*. 2009
16 Mar;43(2):163-72.
- 17 12. Vajro P, Mandato C, Licenziati MR, Franzese A, Vitale DF, Lenta S, et al. Effects of
18 *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. *Journal of*
19 *pediatric gastroenterology and nutrition*. 2011 Jun;52(6):740-3.
- 20 13. Szajewska H, Skorka A, Rusczyński M, Gieruszczak-Bialek D. Meta-analysis:
21 *Lactobacillus* GG for treating acute diarrhoea in children. *Alimentary Pharmacology &*
22 *Therapeutics*. 2007 Apr 15;25(8):871-81.
- 23 14. Leke R, Oliveira DL, Forgiarini LF, Escobar TD, Hammes TO, Meyer FS, et al.
24 Impairment of short term memory in rats with hepatic encephalopathy due to bile duct
25 ligation. *Metab Brain Dis*. 2013 Jun;28(2):187-92.
- 26 15. Soszynski M, Bartosz G. Decrease in accessible thiols as an index of oxidative
27 damage to membrane proteins. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(3):463-9.
- 28 16. Li Y, Schellhorn HE. Rapid kinetic microassay for catalase activity. *J Biomol Tech*.
29 2007 Sep;18(4):185-7.
- 30 17. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine
31 and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972 May 25;247(10):3170-5.
- 32 18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
33 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May
34 7;72:248-54.
- 35 19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time
36 quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- 37 20. Santos JL, Kieling CO, Meurer L, Vieira S, Ferreira CT, Lorentz A, et al. The extent
38 of biliary proliferation in liver biopsies from patients with biliary atresia at portoenterostomy
39 is associated with the postoperative prognosis. *J Pediatr Surg*. 2009 Apr;44(4):695-701.
- 40 21. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in
41 immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP)
42 procedures. *J Histochem Cytochem*. 1981 Apr;29(4):577-80.
- 43 22. Vercelino R, Crespo I, de Souza GF, Cuevas MJ, de Oliveira MG, Marroni NP, et al.
44 S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in cirrhotic rats. *J Mol Med (Berl)*. 2010
45 Apr;88(4):401-11.
- 46 23. Bateman AC, Hubscher SG. Cytokeratin expression as an aid to diagnosis in medical
47 liver biopsies. *Histopathology*. 2010 Mar;56(4):415-25.
- 48 24. Starkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res*
49 *Clin Gastroenterol*. 2011 Apr;25(2):319-33.

- 1 25. Ramadori G, Saile B. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest.* 2004
2 Feb;84(2):153-9.
- 3 26. Wells RG, Kruglov E, Dranoff JA. Autocrine release of TGF-beta by portal fibroblasts
4 regulates cell growth. *FEBS Lett.* 2004 Feb 13;559(1-3):107-10.
- 5 27. Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, et al.
6 Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg.* 2008
7 May;95(5):646-56.
- 8 28. Zhou YK, Qin HL, Zhang M, Shen TY, Chen HQ, Ma YL, et al. Effects of
9 *Lactobacillus plantarum* on gut barrier function in experimental obstructive jaundice. *World J*
10 *Gastroenterol.* 2012 Aug 14;18(30):3977-91.
- 11 29. Hammes TO, Pedroso GL, Hartmann CR, Escobar TD, Fracasso LB, da Rosa DP, et
12 al. The effect of taurine on hepatic steatosis induced by thioacetamide in zebrafish (*Danio*
13 *rerio*). *Dig Dis Sci.* 2012 Mar;57(3):675-82.
- 14 30. D'Argenio G, Cariello R, Tuccillo C, Mazzone G, Federico A, Funaro A, et al.
15 Symbiotic formulation in experimentally induced liver fibrosis in rats: intestinal microbiota as
16 a key point to treat liver damage? *Liver Int.* 2013 May;33(5):687-97.
- 17 31. Liu Y, Liu Q, Ye G, Khan A, Liu J, Gan F, et al. Protective Effects of Selenium-
18 Enriched Probiotics on Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in Rats. *J Agric Food*
19 *Chem.* 2014 Dec 31.
- 20 32. Rashid SK, Khodja NI, Auger C, Alhosin M, Boehm N, Oswald-Mammosser M, et al.
21 Probiotics (VSL#3) prevent endothelial dysfunction in rats with portal hypertension: role of
22 the angiotensin system. *PLoS One.* 2014;9(5):e97458.
- 23 33. Moratalla A, Gomez-Hurtado I, Moya-Perez A, Zapater P, Peiro G, Gonzalez-Navajas
24 JM, et al. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 promotes a TLR2-dependent anti-
25 inflammatory response in intestinal lymphocytes from mice with cirrhosis. *Eur J Nutr.* 2015
26 Feb 6.
- 27 34. Xu J, Liu X, Koyama Y, Wang P, Lan T, Kim IG, et al. The types of hepatic
28 myofibroblasts contributing to liver fibrosis of different etiologies. *Front Pharmacol.*
29 2014;5:167.
- 30 35. Aoyama T, Paik YH, Seki E. Toll-like receptor signaling and liver fibrosis.
31 *Gastroenterol Res Pract.* 2010;2010.
- 32 36. Nakamoto N, Kanai T. Role of toll-like receptors in immune activation and tolerance
33 in the liver. *Front Immunol.* 2014;5:221.
- 34 37. Gehring S, Dickson EM, San Martin ME, van Rooijen N, Papa EF, Harty MW, et al.
35 Kupffer cells abrogate cholestatic liver injury in mice. *Gastroenterology.* 2006
36 Mar;130(3):810-22.
- 37 38. Hammerich L, Tacke F. Interleukins in chronic liver disease: lessons learned from
38 experimental mouse models. *Clin Exp Gastroenterol.* 2014;7:297-306.
- 39 39. Wang H, Lafdil F, Kong X, Gao B. Signal transducer and activator of transcription 3
40 in liver diseases: a novel therapeutic target. *Int J Biol Sci.* 2011;7(5):536-50.
- 41 40. Nieto N. Oxidative-stress and IL-6 mediate the fibrogenic effects of rodent Kupffer
42 cells on stellate cells. *Hepatology.* 2006 Dec;44(6):1487-501.

43
44

Fig 1

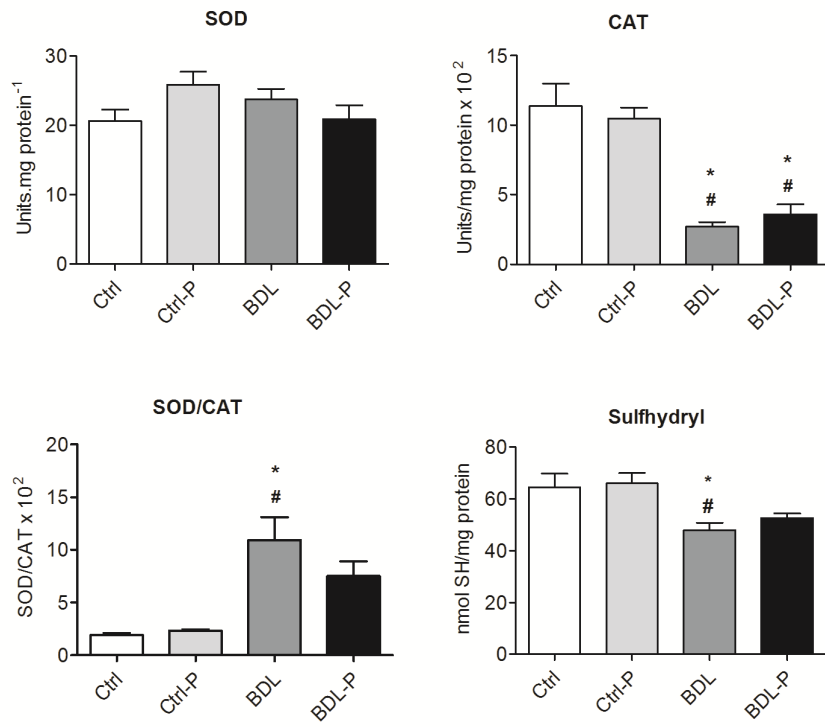


Fig 2

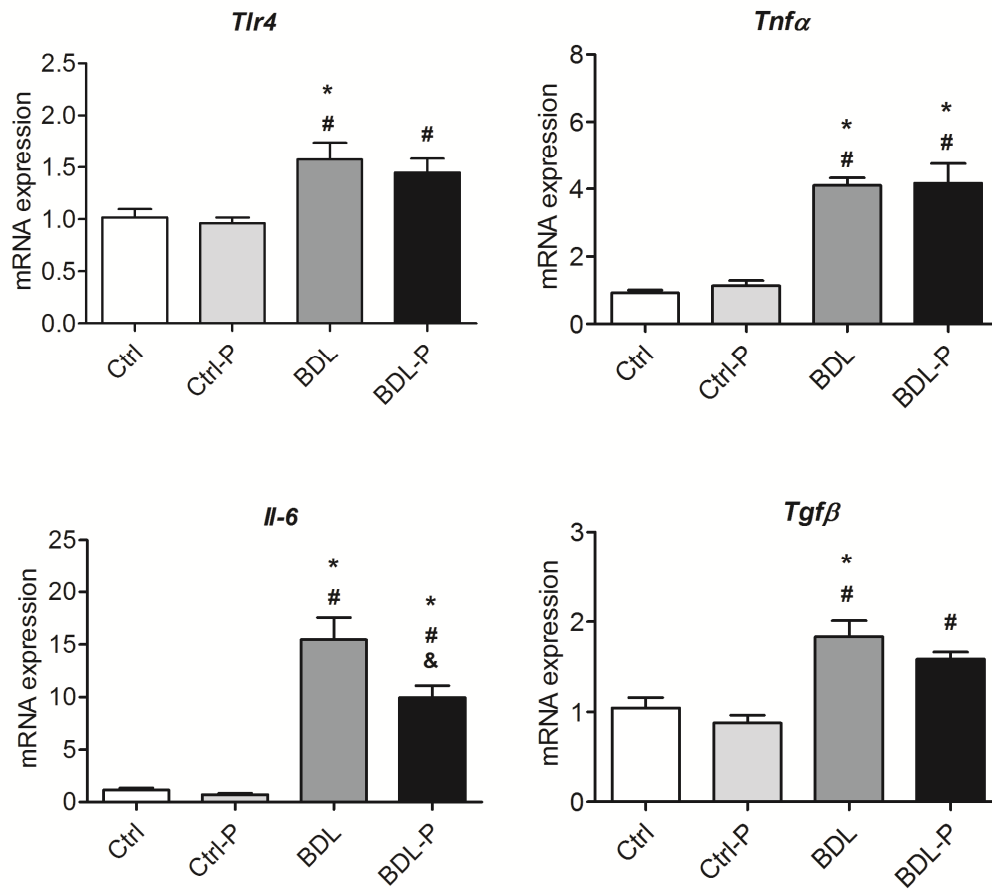


Fig 3

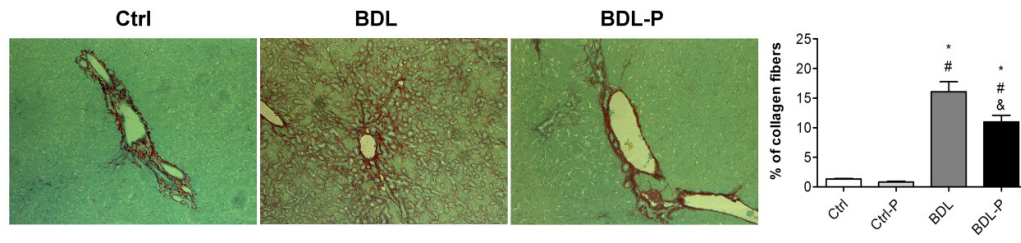
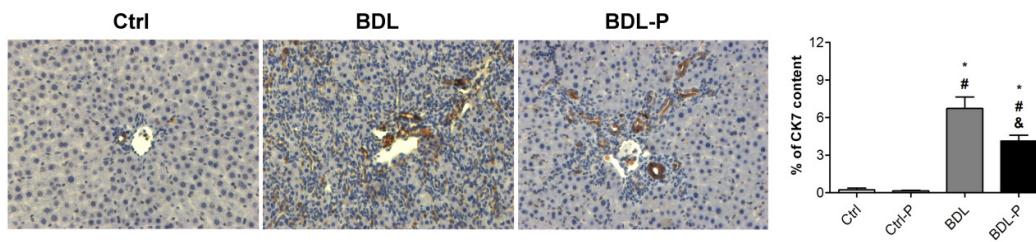
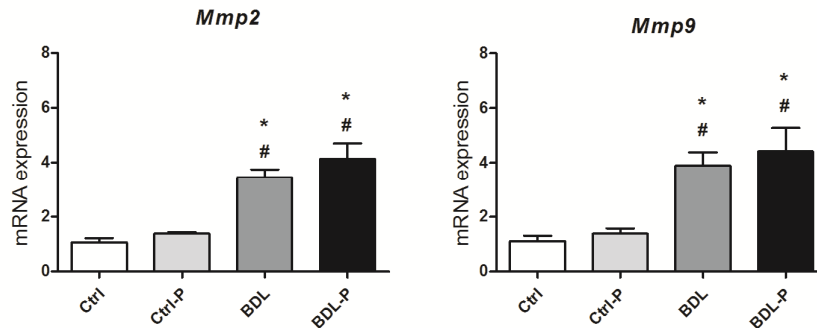


Fig 4

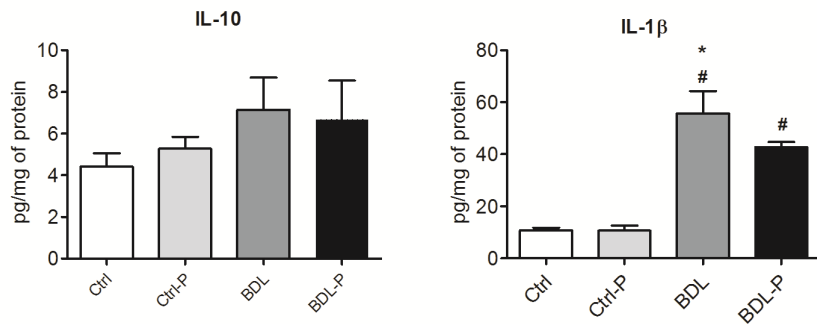


Supporting Information



S1 Figure. The Effect of LGG Treatment on Gene Expression of Matrix

Metalloproteinases in Hepatic Tissue. Gene expression was evaluated by qPCR and differences were tested by ANOVA followed by the Tukey ($P < 0.05$). *Difference versus Ctrl. #Difference versus Ctrl-P.



S2 Figure. The Effect of LGG Treatment on content of IL-1β and IL-10 in Hepatic

Tissue. ELISA technique was used to determining of hepatic content of IL-1β and IL-10 and differences were tested by Kruskal-Wallis followed by the Dunn's test ($P < 0.05$). *Difference versus Ctrl. #Difference versus Ctrl-P.