

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E

HEPATOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RIFAXIMINA NA CARCINOGENESE HEPÁTICA
EXPERIMENTAL SECUNDÁRIA À DOENÇA HEPÁTICA GORDUOSA NÃO
ALCOÓLICA**

JÉSSICA TONIN FERRARI

PORTO ALEGRE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RIFAXIMINA NA CARCINOGENESE HEPÁTICA
EXPERIMENTAL SECUNDÁRIA À DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO
ALCOÓLICA**

JÉSSICA TONIN FERRARI

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

Orientadora: Dra. Carolina Uribe Cruz

PORTO ALEGRE

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Ferrari, Jéssica Tonin

Avaliação do efeito da rifaximina na carcinogênese hepática experimental secundária à doença hepática gordurosa não alcoólica / Jéssica Tonin Ferrari. -- 2018.

66 f.

Orientadora: Carolina Uribe Cruz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. carcinoma hepatocelular. 2. doença hepática gordurosa não alcoólica. 3. rifaximina. 4. dieta hiperlipídica deficiente em colina. 5. dietilnitrosamina. I. Cruz, Carolina Uribe, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Adriane e Jeremias, e meu irmão, Gabriel, por todo suporte e motivação. Obrigada por estarem sempre presentes!

À minha orientadora Dra. Carolina Uribe Cruz pela confiança, paciência e ajuda incondicional em cada momento dessa jornada. Todas as nossas conversas e seus ensinamentos foram fundamentais para meu crescimento profissional e científico. Meu imenso carinho e admiração!

Ao Dr. Mário Reis Álvares da Silva e a Dra. Themis Reverbel da Silveira por todos os ensinamentos transmitidos e pelos inúmeros esclarecimentos e sugestões para o desenvolvimento do estudo.

À Larisse Longo, pela disposição em auxiliar em todas as etapas do estudo, pelo convívio diário e parceria durante a execução dos experimentos.

Aos colegas de laboratório: Gabriel Guerreiro, Ana Carolina Henzel Raymundo, Silvia Bona, Carolina Beskow, Juliana Bruch e Michele Sefarini pelo companheirismo e momentos de descontração, cada um teve uma participação especial nesses anos de laboratório. Agradeço, em especial, a Amanda Pasqualotto, companheira de sempre, que tive o prazer compartilhar bons momentos, e a Raquel Ayres, por todas as conversas e conhecimentos que foram passados em minha iniciação da jornada científica.

Aos meus amigos, agradeço a paciência e compreensão pelos momentos em que não pude estar presente, mas principalmente por todo apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e o Hospital de Clínicas de Porto Alegre

pela oportunidade de desenvolver este estudo. Agradeço também a CAPES e o FIPE/HCPA pelo financiamento desta pesquisa.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional e que fizeram possível o projeto se tornar realidade.

RESUMO/PALAVRAS-CHAVE	7
ABSTRACT/KEYWORDS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
INTRODUÇÃO	14
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica.....	15
Carcinoma hepatocelular	18
Modelos animais de carcinoma hepatocelular.....	23
Rifaximina	26
HIPÓTESE.....	32
OBJETIVO GERAL	33
Objetivos específicos	33
ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....	34
ABSTRACT	36
INTRODUCTION	37
MATERIALS AND METHODS.....	38
Animals	38
Experimental design.....	38
Model of hepatic carcinogenesis secondary to NAFLD and treatment with rifaximin	38

Analysis of biochemical parameters and anatomopathological evaluation	39
Statistical analysis	40
RESULTS	40
Biochemical parameters.....	40
Hepatic histology	41
Degree of fibrosis.....	43
Anatomopathological characterization	44
DISCUSSION.....	47
CONCLUSIONS	49
AUTHOR CONTRIBUTIONS	49
FUNDING.....	50
DISCLOSURE OF INTERESTS	50
CONCLUSÕES.....	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
PERSPECTIVAS	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO.....	65
APÊNDICE	66

RESUMO/PALAVRAS-CHAVE

Introdução: A doença hepática gordurosa não alcoólica, atualmente, é considerada a forma mais comum de hepatopatia crônica, tendo como complicação mais grave o carcinoma hepatocelular. Considerando que a rifaximina é um antibiótico efetivo como tratamento de diversas doenças gastrointestinais e hepáticas, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da rifaximina em um modelo de carcinoma hepatocelular secundário à doença hepática gordurosa não alcoólica.

Métodos: Ratos Sprague-Dawley adultos foram divididos em 3 grupos. 1) grupo CHC: os animais foram alimentados com dieta hiperlipídica deficiente em colina e expostos a dietilnitrosamina (135mg/L) na água de beber; 2) grupo RIF+CHC: os animais receberam a mesma dieta e dietilnitrosamina, no entanto, na 5ª semana receberam 50mg/kg/dia de rifaximina por gavagem; 3) grupo Controle: os animais foram alimentados com dieta e água padrão. Após 16 semanas, os animais foram eutanasiados. Parâmetros bioquímicos séricos de Colesterol Total, HDL, LDL, Triglicerídeos, AST, ALT e Fosfatase Alcalina foram avaliados. O tecido hepático foi avaliado macroscopicamente e amostras foram coradas com Hematoxilina & Eosina e Picrosirius Red. As variáveis histológicas foram pontuadas usando o sistema modificado de Kleiner, *NAFLD activity score* e grau de fibrose. O carcinoma hepatocelular foi classificado de acordo com a graduação de *Edmondson-Steiner*.

Resultados: Os níveis séricos de colesterol total, LDL, AST e fosfatase alcalina foram menores no grupo CHC+RIF quando comparados ao grupo CHC, no entanto a diferença não foi estatisticamente significativa. O escore de *NAFLD activity score* ficou alocado entre 3 e 5 para o grupo CHC, no entanto, para o grupo CHC+RIF permaneceu em grau 3. O grau de câncer foi de 3 e 4 para os grupos CHC+RIF e

CHC, mas curiosamente em 3 animais tratados com Rifaximina não apresentaram câncer.

Conclusão: Estes resultados preliminares mostram que o tratamento com rifaximina parece ter um efeito moderadamente benéfico sobre o desenvolvimento da esteato-hepatite não alcoólica e do carcinoma hepatocelular.

Palavras chave: carcinoma hepatocelular, rifaximina, doença hepática gordurosa não alcoólica, dieta hiperlipídica deficiente em colina, dietilnitrosamina.

ABSTRACT/KEYWORDS

Introduction: Non-alcoholic fatty liver disease is currently considered the most common form of chronic liver disease, with hepatocellular carcinoma being the most serious complication. Considering that rifaximin is a highly effective nonabsorbable antibiotic for the treatment of various gastrointestinal and hepatic diseases, this study aims to evaluate the effects of rifaximin in a model of hepatocellular carcinoma secondary to nonalcoholic fatty liver disease.

Methods: Adult Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups. 1) HCC group: animals were fed a choline-deficient hyperlipid diet and exposed to diethylnitrosamine (135mg/L) in drinking water; 2) RIF+HCC group: animals received the same diet and diethylnitrosamine; however, at week 5, they received 50mg/kg/day of rifaximin by gavage; 3) Control group: the animals were fed standard diet and water. After 16 weeks, the animals were euthanized. Serum biochemical parameters of Total Cholesterol, HDL, LDL, Triglycerides, AST, ALT and Alkaline Phosphatase were evaluated. The liver tissue was macroscopically evaluated, and the samples were stained with Hematoxylin & Eosin and Picrosirius Red. Histological variables were scored using Kleiner's modified system, NAFLD activity score, and degree of fibrosis. Hepatocellular carcinoma was classified according to Edmondson-Steiner.

Results: The serum levels of total cholesterol, LDL, AST and alkaline phosphatase were lower in the CHC+RIF group when compared to the HCC group. The difference, however, was not statistically significant. The NAFLD activity score was allocated between 3 and 5 for the HCC group; however, for the CHC+RIF group, it remained in

grade 3. The degree of cancer was 3 and 4 for the CHC+RIF and HCC groups, but curiously, 3 animals treated with rifaximin did not present cancer.

Conclusion: These preliminary results show that treatment with rifaximin appears to have a moderately beneficial effect on the development of nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, rifaximin, nonalcoholic fatty liver disease, choline-deficient hyperlipid diet, diethylnitrosamine

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT - alanina aminotransferase

AST - aspartato aminotransferase

CHC - carcinoma hepatocelular

DHGNA - doença hepática gordurosa não alcoólica

DEN – dietilnitrosamina

DHDC - dieta hiperlipídica deficiente em colina

DM2 - diabetes mellitus tipo 2

EHNA - esteato-hepatite não alcoólica

ES - esteatose simples

GGT - gamaglutamiltransferase

HE – hematoxilina & eosina

NAS - NAFLD activity score

RIF - rifaximina

SM - síndrome metabólica

VHB - vírus da hepatite B

VHC - vírus da hepatite C

VLDL - lipoproteína de baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - História natural da DHGNA	15
Figura 2 - Representação de uma biópsia hepática de EHNA	18
Figura 3 – Mecanismo de ação da Rifaximina	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de <i>Edmondson-Steiner</i>	21
Tabela 2 - Tratamentos atuais para o CHC	22
Tabela 3 – Modelos animais de CHC secundário à DHGNA	25

INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) representa um amplo espectro de alterações histológicas hepáticas, desde uma esteatose simples (ES) até uma esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), fibrose avançada, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC)¹.

Nos últimos anos o aumento na incidência de CHC tem sido atribuído ao aumento da obesidade, diabetes melitus tipo 2 (DM2) e DHGNA devido, principalmente, a mudança no estilo de vida hábitos alimentares da população².

A rifaximina (RIF) é um antibiótico não absorvível altamente efetivo como tratamento de diversas doenças gastrointestinais e tem sido largamente estudada nas pesquisas biomédicas devido às diversas evidências de ter um papel benéfico em doenças hepáticas^{3; 4}.

Com os avanços na nas pesquisas de novas terapias nas últimas décadas, o CHC passou a ser uma doença que pode ser prevenida e curada, quando detectado em etapas precoces da doença⁵. No entanto, como a sua incidência está aumentando em diversos países, novas pesquisas com medidas preventivas devem ser realizadas na tentativa de minimizar o impacto da doença⁶.

Com base nisso, o objetivo desse estudo foi avaliar o impacto da RIF sobre o fígado de murinos em um modelo de CHC secundário a DHGNA.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

A DHGNA é considerada, atualmente, a forma mais comum de hepatopatia e é reconhecida como importante causa do aumento da morbimortalidade relacionada ao fígado^{7; 8}. A principal característica histológica da DHGNA é o acúmulo de gordura no fígado, principalmente os triglicerídeos, sendo caracterizada histologicamente pela presença de mais de 5% de hepatócitos esteatóticos, na ausência de outras causas etiopatológicas e com consumo alcoólico inferior a 30g/dia em homens e 20g/dia em mulheres⁹.

O seu espectro constitui desde a ES com acúmulo de gordura nos hepatócitos, à EHNA, com componente necroinflamatório com ou sem fibrose, e cirrose, que pode evoluir para o CHC (Figura 1)¹⁰. A EHNA representa a forma inflamatória da doença, com um conjunto de achados histológicos como balonização hepatocelular, infiltrado inflamatório e fibrose perisinusoidal, sendo que pacientes com essa doença apresentam aumento da mortalidade relacionada ao fígado devido à progressão da doença para fibrose, a cirrose e o CHC¹¹. Por ser uma doença de evolução lenta e que pode levar a insuficiência hepática, a EHNA tem se tornado alvo de diversos estudos no mundo todo¹².

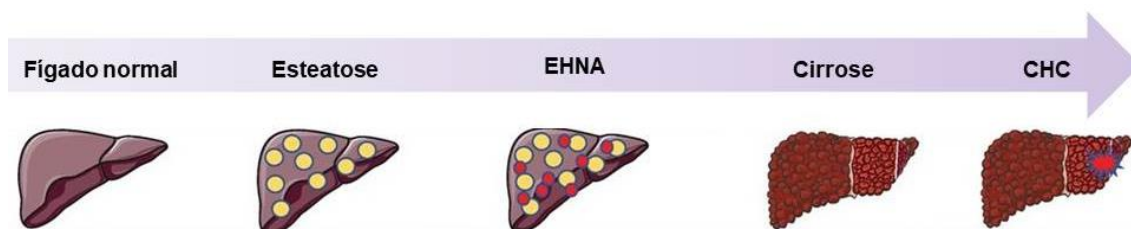


Figura 1 - História natural da DHGNA. A DHGNA se inicia com o desenvolvimento ES, podendo progredir para EHNA, ou até formas mais graves como cirrose e CHC. Adaptado de Maurice e Manousou, 2018¹.

A DHGNA apresenta distribuição mundial com prevalência variada, dependendo da população estudada e do método diagnóstico empregado. Ocorre em indivíduos de todas as idades, entretanto é mais comum nos adultos e tende a aumentar com a idade^{9: 13}. Atualmente, a prevalência de DHGNA é estimada em 20% a 30% nos países ocidentais e 5% a 18% em países asiáticos¹⁴. Uma recente metanálise mostrou que a prevalência da doença na população geral mundial é de 24-25%¹⁵, variando de 13 % na África, 23% na Europa e 32% no Oriente Médio². Já a prevalência da EHNA a nível mundial foi estimada entre 2 e 3 %¹⁰. No Brasil há poucos dados sobre a prevalência da DHGNA na população geral. Em estudo brasileiro, utilizando a ultrassonografia como método diagnóstico, foi encontrada uma prevalência em torno de 20% de DHGNA na população geral¹⁶. Em outro estudo brasileiro realizado com 98 pacientes diabéticos, foi encontrada uma prevalência de 78% de EHNA¹⁷.

A DHGNA vem emergindo como uma das causas mais comuns de doença hepática crônica da última década, podendo se tornar, nos próximos anos, a principal causa de morbi-mortalidade relacionada ao fígado¹⁸. É uma das condições mais prevalentes relacionadas ao fígado devido ao aumento da prevalência de obesidade em todo o mundo, além da mudança do estilo de vida e da alimentação da população ocidental. Do ponto de vista etiológico a obesidade, resistência à insulina, DM2, dislipidemia e síndrome metabólica (SM) são as causas primárias para o desenvolvimento dessa doença¹⁹. Um estudo realizado com 308 pacientes mostrou que a presença de SM foi associada a um maior risco de desenvolvimento de EHNA e fibrose grave. Ainda nesse mesmo estudo, dos 163 casos de biópsia realizados, 120 pacientes foram classificados com EHNA, sendo 88% deles preenchiam critérios da SM, em comparação com 53% dos pacientes com DHGNA²⁰. O surgimento

secundário da DHGNA inclui outros fatores de risco, tais como a exposição à xenobióticos, nutrição parenteral prolongada, uso de substâncias hepatotóxicas, *bypass* jejunoileal, entre outros^{11; 21}.

Em grande parte dos casos a DHGNA é assintomática, embora alguns pacientes possam apresentar sintomas inespecíficos como fadiga, desconforto no abdome e plenitude gástrica provocada por hepatomegalia²². O seu diagnóstico é realizado através de exames bioquímicos alterados, como o aumento moderado das enzimas hepáticas, particularmente da aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT). Além disso, um aumento superior da ALT em comparação a AST (AST/ALT <1) pode indicar a presença de doença hepática. Os níveis de fosfatase alcalina e/ou gamaglutamiltransferase (GGT) podem estar moderadamente elevados e a elevados em fase tardias da doença^{2; 23}.

No diagnóstico imagiológico, a ultrassonografia, a tomografia computadorizada, a ressonância magnética podem auxiliar no diagnóstico da DHGNA, no entanto essas técnicas não diferenciam uma ES da EHNA²². A biópsia hepática é o padrão ouro para a caracterização da histologia hepática em doentes com DHGNA, mas por ser uma técnica invasiva e com riscos associados, deve ser realizada em situações específicas, onde o paciente tem orientação terapêutica e perspectivas prognósticas²⁴.

Os achados histológicos mais comuns na biópsia hepática da DHGNA são esteatose macrovesicular isolada ou esteatose macrovesicular e microvesicular concomitantes. Na EHNA, os achados histológicos incluem: esteatose macrovesicular, balonização hepatocelular, inflamação lobular e corpúsculos e Mallory (Figura 2). Geralmente a fibrose está presente, mas não é um fator necessário para o diagnóstico²⁵.

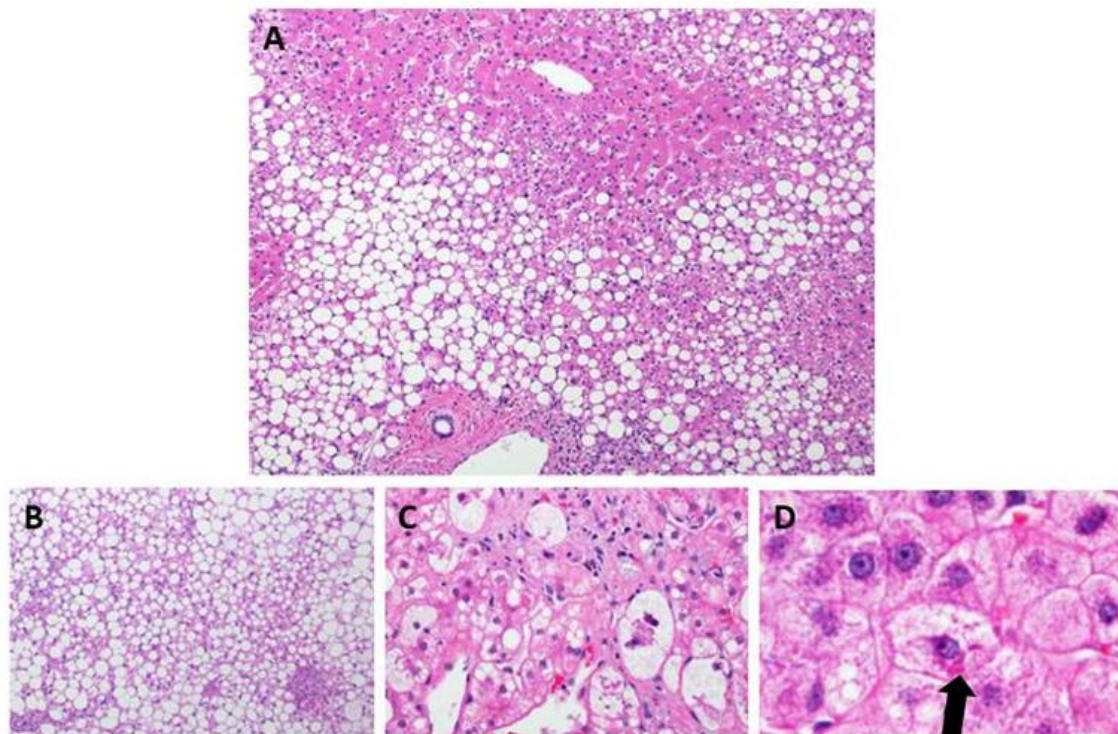


Figura 2 - Representação de uma biópsia hepática de EHNA. A) Características histológicas de EHNA, incluindo esteatose macrovesicular, balonismo e inflamação lobular (4x). B) Esteatose macrovesicular (10x). C) Balonização hepatocelular (40x). D) Corpúsculos de Mallory – seta (60x). Adaptado de Brown e Kleiner²⁵.

Para auxiliar a avaliação da gravidade da DHGNA, em 2002, foi validado um sistema de graduação com as características histológicas da doença, denominado NAFLD Activity Score (NAS). A pontuação é calculada como a soma dos escores para: esteatose (0-3), inflamação lobular (0-3) e balonização hepatocelular (0-2). Os valores maiores ou iguais a 5 correspondem a um diagnóstico definitivo de EHNA, igual a 3 ou 4 diagnóstico provável de EHNA e valores de 1 ou 2 diagnóstico de não EHNA²⁶.

Carcinoma hepatocelular

O CHC representa o tipo mais comum de câncer primário de fígado, sendo o sexto câncer mais prevalente no mundo e a segunda principal causa de morte relacionada ao câncer⁶. A grande variação na incidência do CHC no mundo se deve a grande heterogeneidade com que os fatores de risco se distribuem na população²⁷. Nos

Estados Unidos, a incidência triplicou nas últimas três décadas, com mais de 20.000 casos diagnosticados em 2011²⁸. No Brasil, dados sobre de real incidência do CHC são escassos, visto que poucos estudos multicêntricos foram realizados. Em um estudo de Paranaguá-Vezozzo e colaboradores (2014) foram avaliados 884 pacientes cirróticos, sendo verificada uma incidência de 2,9% de pacientes com CHC²⁹. Outro estudo brasileiro verificou que cerca de 10% de casos de transplante são relacionados ao CHC³⁰. Todos os estudos brasileiros demonstraram que a grande extensão, as variações regionais e a diversidade do país contribuem para que os dados epidemiológicos sobre a doença continuem escassos e discrepantes.

As principais etiologias do CHC incluem a infecção crônica pelo vírus da hepatite B (VHB), hepatite C (VHC) e doença hepática alcoólica. No entanto, com o aprimoramento dos tratamentos curativos para o VHC e desenvolvimento de vacinas eficazes para VHB, o risco de progressão para cirrose e desenvolvimento de CHC secundário a essas doenças diminuiu nos últimos anos⁶. Com o aumento da prevalência da obesidade e SM, a DHGNA se tornou umas das principais etiologias para o desenvolvimento de CHC³¹. O CHC secundário à EHNA tornou-se a segunda etiologia mais comum de CHC, que é levado ao transplante hepático nos EUA³². Um recente estudo multicêntrico brasileiro avaliou as características clínicas de 110 pacientes com diagnóstico de DHGNA e CHC. A obesidade foi observada em 52,7% dos pacientes; DM2 em 73,6%, dislipidemia em 41%; SM em 57,2%; EHNA sem fibrose foi observada em 3,8% dos casos; EHNA com fibrose (graus 1-3) observada em 27%; e cirrose em 61,5%. O diagnóstico do CHC por biópsia foi realizado 47,2% dos pacientes³³. Em 2009, Chagas e colaboradores realizaram um estudo que demonstrou que CHC pode ocorrer em decorrência da EHNA, mesmo com a ausência de cirrose. No estudo, entre 394 pacientes com CHC detectados por

ultrassonografia durante 8 anos foram identificados 7 casos (1,7%) com CHC ocorrendo no cenário de EHNA comprovada por biópsia³⁴.

Na literatura, há controvérsias sobre a evolução da DHGNA para CHC, embora grande parte dos estudos sugira que o mecanismo mais provável envolve o acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos, que desencadeia inflamação e fibrose, decorrente de fatores como a síndrome metabólica, aumento do estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e endotoxemia³⁵. Estudos recentes mostraram o papel importante da disbiose intestinal, que é definida como qualquer alteração na composição da microbiota intestinal, na patogênese várias doenças hepáticas, inclusive evidenciando um papel da microbiota na etiologia e progressão do CHC. Na presença da disbiose e na ruptura da barreira intestinal ocorre um aumento da translocação bacteriana, que interrompe a tolerância imunológica e estimula as células hepáticas para desencadear uma resposta imune através dos receptores *toll like*³⁶.

A sobrevida dos pacientes com CHC é influenciada por fatores como as características próprias do indivíduo e do tumor, a precocidade do diagnóstico e a eficácia da intervenção terapêutica. A grande maioria dos casos de CHC é diagnosticada quando o tumor está avançado e com pouca chance de cura³⁰. O ideal é diagnosticar a doença na fase precoce, quando as possibilidades de tratamento curativo podem ser efetivas. Para o diagnóstico precoce do CHC, os pacientes portadores de cirrose hepática, ou aqueles sem cirrose hepática que apresentam infecção ativa por VHB ou infecção crônica por VHC associadas à fibrose avançada, devem ser monitorados, conforme orientação do EASL–EORTC (*Clinical Practice Guidelines European Association for the Study of the Liver and the*

European Organization for Research and Treatment of Cancer - 2012). O acompanhamento dos indivíduos com fatores de risco favoráveis ao surgimento da doença pode permitir a conduta terapêutica precoce e, conseqüentemente, uma maior sobrevida⁵. Ainda como método diagnóstico, utiliza-se a biópsia hepática com fins de análise histopatológica. No entanto, por ser um método invasivo, só é utilizado em casos onde os métodos não invasivos não foram capazes de definir o diagnóstico de CHC³⁷.

Um dos sistemas de graduação histológicos mais utilizados para diagnosticar o CHC é o de Edmondson-Steiner, uma classificação proposta em 1952 que é utilizada até hoje pelos médicos patologistas. Este sistema classifica o tumor de acordo com o grau de diferenciação das células neoplásicas, existindo 4 níveis: bem diferenciado, moderadamente diferenciado, pouco diferenciado e não diferenciado^{38; 39} (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação de *Edmondson-Steiner*

Grau	Achados histológicos
1 (bem diferenciado)	<ul style="list-style-type: none"> – crescimento em trabéculas finas; – células com maior relação núcleo/citoplasma, citoplasma abundante
2 (moderadamente diferenciado)	<ul style="list-style-type: none"> – crescimento em trabéculas médias; – células com citoplasma amplo e eosinófilo; – núcleos irregulares e nucléolo hiper cromático;
3 (pouco diferenciado)	<ul style="list-style-type: none"> – crescimento em trabéculas largas e pseudoácinos; – células pleomórficas, citoplasma escasso, núcleos angulados;
4 (não diferenciado)	<ul style="list-style-type: none"> – células gigantes e anaplásicas, com graus variáveis de pleomorfismo;

O tratamento do CHC é feito de acordo com o estadiamento, conforme o tamanho do tumor, o número de nódulos, a função hepática e a condição clínica do paciente. Existem diversas terapias que são utilizadas na prática clínica, dentre elas: ressecção cirúrgica, radiofrequência, ablação química, sorafenibe e o transplante hepático, porém o tratamento de CHC continua sendo um desafio para medicina. Na tabela 2 é possível observar a descrição dos principais tratamentos para o CHC ^{37; 40; 41; 42; 43; 44}.

Tabela 2 - Tratamentos atuais para o CHC

Terapêutica	Descrição
Ressecção cirúrgica do nódulo	Potencialmente curativo; indicado em pacientes com função hepática bem preservada.
Transplante hepático	Eficaz para pacientes que não podem ser submetidos à ressecção, mas a escassez de doadores é um grande obstáculo.
Ablação percutânea	Indicada para tumores pequenos, quando não pode indicar o transplante ou a ressecção; realizada através da injeção de álcool diretamente no tumor, guiada por ultrassom.
Quimioembolização transarterial	É paliativo; aumenta a sobrevida do paciente ou atua como adjuvante com outro tipo de tratamento; consiste na infusão intra-arterial de material quimioterápico e embólico, para tratamento local do tumor hepático.
Sorafenibe	Fármaco que mostrou maior eficácia quanto a sobrevida dos pacientes; é um inibidor da tirosina quinase capaz de reduzir proliferação e neovascularização do tumor.

Quando diagnosticado em etapas iniciais, o CHC tem potencial curativo. A busca por novas estratégias de diagnóstico e de terapêuticas propiciam a identificação da doença em fase precoce e a indicação de tratamento mais apropriado para promover uma maior sobrevida do paciente^{5; 45}.

Modelos animais de carcinoma hepatocelular

Modelos animais experimentais de CHC são fundamentais para compreender aspectos do processo de carcinogênese hepática e, principalmente, para testar novas terapêuticas a serem utilizadas na prevenção e no tratamento dessa doença⁴⁶.

Na literatura, existem diversos modelos experimentais em CHC: os modelos por indução química, modelos virais, xenotransplantes, modelos com geneticamente modificados, entre outros^{47; 48; 49; 50}. Os modelos de CHC por indução química se assemelham às etapas da carcinogênese humana, sendo utilizadas substâncias cancerígenas indutoras, como a tiocetamida, tetracloreto de carbono, fenobarbital ou dietilnitrosamina (DEN)⁴⁸. DEN é um potente alquilante do DNA e provoca alterações genéticas profundas nas células hepáticas. No fígado, o DEN é metabolizado no citocromo P450 e lesa proteínas e lipídeos, também afetando o desenvolvimento, crescimento e sobrevivência dos hepatócitos. No entanto, nenhum desses modelos reflete o verdadeiro curso do CHC secundário a DHGNA, devido à diversidade do espectro da doença nos pacientes, além das diferentes características de interações moleculares e características histológicas da doença⁵¹

Espera-se que o modelo ideal de CHC secundário a DHGNA mimetize o que ocorre na doença com os seres humanos: excesso de calorias na alimentação, associado à obesidade, resistência insulínica, dislipidemia⁵². Por isso, diversos modelos experimentais utilizam dietas modificadas para o desenvolvimento das doenças. Na dieta hiperlipídica pura há o consumo de 45% à 75% de calorias provenientes de lipídeos ou colesterol. Já as dietas deficientes em nutrientes são desprovidas de certos nutrientes essenciais, como a metionina e/ou a colina. Esta abordagem

resultou em vários tipos de dieta, como deficiente em colina, deficiente em metionina, deficiente em metionina-colina, dieta hiperlipídica deficiente em colina (DHDC), Todas essas dietas podem variar em teor de gordura e também podem ser incluídas sacarose e frutose⁵². Na dieta deficiente em colina, em especial, ocorre a carência da colina, um nutriente necessário para síntese de fosfolípidios essenciais na composição das membranas celulares e lipoproteínas, como a lipoproteína de baixa densidade (VLDL). Nesta dieta carente em colina há produção deficiente de fosfolípidios essenciais e prejuízo na formação de VLDL. Por sua vez, os hepatócitos exportam ácidos graxos por meio da conversão em VLDL, ocorrendo o acúmulo de triglicerídeos no fígado^{53; 54}.

A principal vantagem do uso de dietas deficientes em nutrientes é a indução de características histológicas da EHNA, incluindo fibrose leve a moderada. No entanto, o desenvolvimento para CHC a partir dessas dietas ocorre de forma lenta, de 3 a 6 meses^{51; 55}. Por isso tem se proposto a associação com carcinógenos para o desenvolvimento mais rápido do CHC^{46; 47; 56}.

Na tabela 3 é possível observar os principais modelos animais de CHC secundário a DHGNA. Adaptado de Wu e colaboradores, 2016⁵¹.

Tabela 3 – Modelos animais de CHC secundário a DHGNA.

Nome	Espécie	Agente	Desenvolvimento
PTEN-nulo	Camundongo AlbCrePtenflox/flox	Formação espontânea	EHNA: 3 meses
			CHC: 9 meses
ALR-nulo	Camundongo AlbCre ALRflox/flox	Formação espontânea	EHNA: 2 meses
			CHC: 12 meses
MC4R-deficiente	Camundongo MC4R-knock-out	Dieta hiperlipídica	EHNA: 5 meses CHC: 12 meses
DIAMOND	Camundongo 12951/SvlmJ + C57BL/6J	Dieta hiperlipídica deficiente em colina	EHNA: 6 meses
			CHC: 13 meses
Dieta HLDC -DM	Camundongo ou rato	Dieta hiperlipídica deficiente em colina e metionina	EHNA: 5 meses
			CHC: 12 meses
STAM	Camundongo	Dieta hiperlipídica	EHNA: 2 meses
		Streptozotocina	CHC: 5 meses
ALIOS	Camundongo	Dieta hiperlipídica e frutose	EHNA: 4 meses
			CHC: 12 meses
Dieta HDC + DEN	Rato	Dieta hiperlipídica deficiente em colina; DEN na água	EHNA: 1 mês
			CHC: 4 meses

Nossos colaboradores da Universidade de São Paulo desenvolveram um modelo experimental de CHC adicionando DEN a uma dieta hiperlipídica deficiente em colina, chamado modelo misto de CHC secundário à DHGNA. Este modelo é ideal para avaliar a hepatocarcinogênese relacionada à DHGNA, visto que apresenta similaridade com os seres humanos, com uma evolução de ES pra EHNA, cirrose e progressão ao CHC⁵⁷.

Em estudo com este modelo, foi observado que após 16 semanas os animais apresentam características de EHNA, incluindo balonização, fibrose, cirrose, além de CHC, com evidência de proliferação celular oval e positividade do marcador

citoqueratina 19⁵⁷. Esta associação entre DEN e dieta hiperlipídica deficiente em colina é relatada na literatura, o que demonstra ser um modelo de indução a CHC devidamente padronizado^{57; 58; 59}. Por exemplo, no estudo de Carvalho e colaboradores, o modelo misto foi desenvolvido com sucesso para avaliar o desempenho diagnóstico da elastografia e ultra-sonografia com contraste para detecção precoce de lesões de CHC⁶⁰.

Rifaximina

A rifaximina (C₄₃H₅₁N₃O₁₁) é um análogo estrutural não sistêmico derivado da rifampicina que age inibindo a síntese de RNA bacteriano através da ligação à subunidade β da RNA polimerase dependente de DNA bacteriano^{4; 61} (Figura 3). A adição de um anel de piridoimidazol à molécula de rifampicina torna a rifaximina um antibiótico insolúvel em água e pouco absorvível (<0,4%). Possui atividade antimicrobiana *in vitro* contra flora gram-positiva e gram-negativa aeróbica e anaeróbica, com baixo risco de desenvolver resistência bacteriana³. Por ser uma terapia oral não absorvível que possui ação antibacteriana de grande espectro, age atuando localmente no trato gastrointestinal, o que contribui para restaurar o desequilíbrio da microflora intestinal. Também está associada a um risco mínimo de toxicidade sistêmica e, por isso, gera efeitos colaterais mínimos^{61; 62; 63}. Outra vantagem é que este fármaco não causa interações medicamentosas⁶⁴.

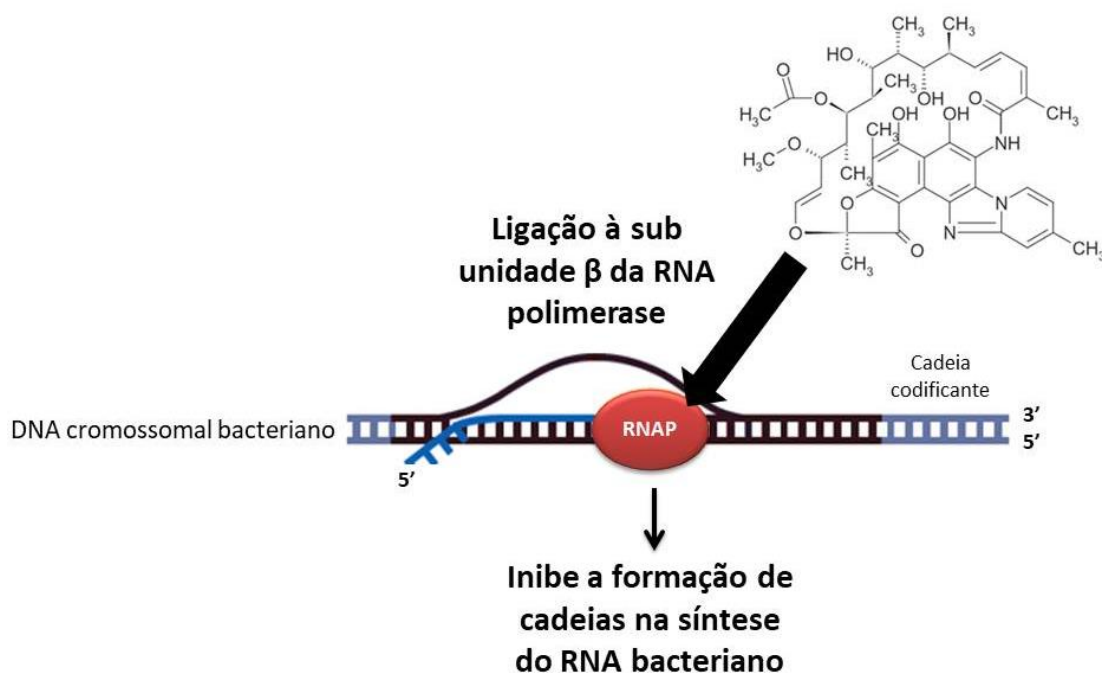


Figura 3 - Mecanismo de ação da Rifaximina⁶⁵. Atua inibindo a síntese de RNA bacteriano através da ligação à subunidade β da RNA polimerase dependente de DNA bacteriano.

Foi aprovada pela primeira vez na Itália em 1987 e após em inúmeros países para o tratamento de várias doenças gastrointestinais. Em maio de 2004 foi aprovada pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos para o tratamento da diarreia do viajante causada por cepas não invasivas de *Escherichia coli* em pacientes maiores de 12 anos. A partir de 2010 passou a ser largamente utilizada pelos principais países europeus, para redução do risco recidiva de encefalopatia hepática em pacientes com doença hepática avançada^{66; 67}. Atualmente, o medicamento está disponível em 47 países para tratamento de uma variedade de condições incluindo: infecções agudas e crônicas de causas bacterianas, diarreia, síndrome do intestino irritável, encefalopatia hepática, complicações da cirrose e profilaxia pré e pós-cirúrgica⁶⁸.

Os mecanismos propostos para explicar a eficácia clínica indicam que a RIF pode reduzir a patogenicidade bacteriana inibindo a translocação bacteriana através dos epitélios da mucosa intestinal, o que reduz a liberação ou absorção de endotoxinas e metabólitos bacterianos⁶⁹. Outro mecanismo que tem sido estudado é que a RIF também pode atuar modulando a sinalização imune intestinal, reduzindo os níveis de mediadores imunológicos pró-inflamatórios e a resposta pró-inflamatória crônica associada às doenças⁶³. Portanto, a RIF atua como moduladora do microambiente intestinal, atuando no eixo intestino-fígado como moduladora da composição e a função da microbiota intestinal, além de exercer propriedades de citoproteção^{67 70}.

Alguns estudos clínicos foram realizados a fim de testar o uso de RIF em pacientes com DHGNA. Gangarapu e colaboradores avaliaram a administração de RIF, na dose de 1200 mg/dia durante 28 dias, em 42 pacientes com DHGNA comprovada com biópsia. Como resultados, foi observada uma redução do índice de massa corporal, endotoxinas, interleucina-10, ALT, GGT, LDL e ferritina, o que indica que administração em curto prazo da RIF é segura e eficaz⁷¹. Em estudo de Abdel-Razik e colaboradores foram avaliados 50 participantes com EHNA comprovada por biópsia, com tratamento em 1, 3 e 6 meses com RIF na dose de 1100 mg/dia. Após 6 meses de tratamento, os pacientes com EHNA mostraram uma redução significativa nos seguintes parâmetros: ALT, AST, GGT, escore de gordura hepática endotoxinas séricas, citocinas pró-inflamatórias, citoqueratina 18, além de uma melhora na resistência a insulina⁷². Até o presente momento, não foram encontrados estudos clínicos que relacionem o CHC com o uso da RIF. O único estudo encontrado foi de Dapito e colaboradores, que mostrou que a RIF reduziu moderadamente o número de nódulos tumorais em ratos expostos a um modelo químico de DEN e tetracloreto de carbono⁷³.

Apesar do grande número de estudos clínicos utilizando a RIF como terapêutica para doenças hepáticas, os efeitos do fármaco sobre o desenvolvimento do CHC permanecem desconhecidos. Visto a eficácia observada em determinadas condições gastrointestinais e hepáticas e evidências que mostram um papel fundamental do microbioma bacteriano na promoção da progressão da doença hepática até o desenvolvimento do CHC^{36; 74}, o uso da RIF pode ser um potencial candidato para tratamento do CHC secundário à DHGNA.

JUSTIFICATIVA

Considerando a crescente incidência de DHGNA e CHC em todo o mundo e o impacto que essas doenças geram na sobrevida dos pacientes, novas medidas profiláticas e terapêuticas são indispensáveis. Muitos estudos demonstram que a rifaximina, um antibiótico oral não absorvível, tem sido tratamento efetivo de diversas doenças gastrointestinais e hepáticas. Assim, este estudo se justifica por avaliar a intervenção precoce de rifaximina no CHC secundário à DHGNA.

QUESTÃO DE PESQUISA

O tratamento com rifaximina poderia ter efeito na carcinogênese hepática secundária à DHGNA?

HIPÓTESE

A rifaximina tem efeito na carcinogênese hepática experimental secundária à DHGNA.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da rifaximina na carcinogênese hepática experimental secundária à DHGNA.

Objetivos específicos

1. Reproduzir o modelo carcinogênese hepática experimental secundária à DHGNA.
2. Avaliar o efeito da rifaximina em parâmetros bioquímicos séricos.
3. Avaliar o efeito da rifaximina sobre o *NAFLD Activity Score* e grau de fibrose.
4. Avaliar o efeito da rifaximina na progressão do carcinoma hepatocelular.

ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

**EFFECT OF RIFAXIMIN ON AN EXPERIMENTAL MODEL OF
HEPATOCELLULAR CARCINOMA SECONDARY TO NONALCOHOLIC FATTY
LIVER DISEASE**

Artigo científico submetido à *EXPERT REVIEW OF ANTICANCER THERAPY*,
Qualis B1, com um fator de impacto de 2.34.

Effect of rifaximin on an experimental model of hepatocellular carcinoma secondary to nonalcoholic fatty liver disease

Autores: Jéssica Tonin Ferrari^{1,2}, Larisse Longo^{1,2}, Themis Reverbel da Silveira¹, Carlos Thadeu Cerski³, Erica Tozawa³, Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira⁴, Mário Reis Álvares-da-Silva^{1,2,5}, Carolina Uribe-Cruz^{1,2}

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

2 Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

3 Serviço de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

4 Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia, Departamento de Gastroenterologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

5 Serviço de Gastroenterologia, Departamento de Medicina Interna, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

Corresponding author: Carolina Uribe-Cruz. Rua Ramiro Barcelos 2350 - Santa Cecilia, Porto Alegre - RS, 90035-903, Brasil. E-mail: carolinaurib10@yahoo.cnom.ar. Phone: +55 51 3359-8847

Previous presentations:

38ª Semana científica do Hospital De Clínicas De Porto Alegre. Porto Alegre, Brasil. 22-26/10/2018

IV Fórum de Jovens Pesquisadores. São Paulo, Brasil. 16/08/2018

ABSTRACT

Introduction: Hepatocellular carcinoma is a complication associated with advanced nonalcoholic steatohepatitis. Considering that rifaximin is a highly effective nonabsorbable antibiotic for the treatment of various gastrointestinal and hepatic diseases, this study aims to evaluate the preventive effects of rifaximin in a model of hepatocellular carcinoma secondary to nonalcoholic fatty liver disease.

Methods: Adult Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups: HCC group: animals were fed a choline-deficient hyperlipid diet and exposed to diethylnitrosamine in drinking water; RIF+HCC group: animals received the same diet and diethylnitrosamine; however, at week 5, they received 50mg/kg/day of rifaximin by gavage; Control group: the animals were fed standard diet and water. After 16 weeks, the animals were euthanized. Serum biochemical parameters were evaluated. The liver tissue was macroscopically evaluated, and the samples were stained with H&E and Picrosirius Red. Histological variables were scored using Kleiner's modified system, NAFLD activity score, and degree of fibrosis. Hepatocellular carcinoma was classified according to Edmondson & Steiner.

Results: The serum levels of total cholesterol, LDL, AST and alkaline phosphatase were lower in the RIF group when compared to the HCC group. The difference, however, was not statistically significant. The NAFLD activity score was allocated between 3 and 5 for the HCC group; however, for the RIF group, it remained in grade 3. The degree of cancer was 3 and 4 for the RIF and HCC groups, but curiously, 3 animals treated with rifaximin did not present cancer.

Conclusion: These preliminary results show that treatment with rifaximin appears to have a moderately beneficial effect on the development of nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, rifaximin, nonalcoholic fatty liver disease, diethylnitrosamine.

INTRODUCTION

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is considered the most common form of chronic liver disease in Western developed countries, with a prevalence of 6-35% worldwide¹. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) represents the inflammatory form of the disease, which can progress to cirrhosis, its most advanced complication being hepatocellular carcinoma (HCC)^{2; 3}. HCC is the fifth most common malignant neoplasm in the world and is considered the most common form of liver cancer, accounting for 70-85% of the tumors that reach this organ^{4; 5}. Based on the low efficacy and restriction of the available treatments for NASH and HCC, new therapeutic approaches that can prevent the progression of this disease are being studied.

Several authors have shown that antibiotics can be used to treat or prevent various diseases, and that modulation of the intestinal microbiota by these antibiotics may improve endotoxemia, representing a therapeutic strategy to prevent HCC^{6; 7}. In turn, rifaximin is a non-absorbable oral semi-synthetic antibiotic that has broad spectrum antibacterial action. It inhibits bacterial synthesis of RNA by binding to the β -subunit of bacterial DNA-dependent RNA polymerase⁸. It acts locally in the gastrointestinal tract and, because of its low systemic absorption, generates minimal adverse effects⁹. Currently, several studies have shown that the use of rifaximin is effective for the treatment of a large number of gastrointestinal and hepatic conditions¹⁰. Because it is a gut-selective drug, much of its mechanism of action acts on the intestinal microbiota, which can alter its composition, modulate its function and influence the levels of inflammatory mediators^{11; 12}.

Considering the beneficial effects of rifaximin on liver disease, this study aims to evaluate the preventive effects of rifaximin in the early stages of NASH, followed by the development of HCC in a murine model.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Twenty-four male, adult Sprague Dawley rats, with 250-400 g in weight, from the Animal Experiment Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre were used. The animals were housed in boxes with up to 3 animals, with access to food and water *ad libitum*, being kept in a light/dark cycle of 12 hours, with temperature of $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. All procedures were carried out in accordance with the legislation in force in Brazil and approved by the Ethics Committee for the Use of Animals, under number 17-0087.

Experimental design

The animals were randomly divided into three groups (n=8/group): Hepatocellular Carcinoma Group (HCC), which received a choline-deficient hyperlipidemic diet (CDHC) along with diethylnitrosamine (DEN) in water; Hepatocellular Carcinoma Group treated with Rifaximin (HCC+RIF), which received CDHC along with DEN in water, with rifaximin given by gavage from the 5th week; and Control Group (CO), which received standard ration (Nuvilab CR-1, Brazil) and water free of rifaximin. The animals were euthanized at the end of the 16 weeks.

Model of hepatic carcinogenesis secondary to NAFLD and treatment with rifaximin

The animals in the HCC and HCC+RIF groups received the combination of a choline-deficient hyperlipid diet (35% total fat, enriched with 54% trans fatty acids) (Rhooster

Ltda., Brazil) and DEN (Sigma Chemical, United States) at a dose of 135 mg/L in the drinking water of the animals for 16 weeks¹³. Starting in the 5th week, the animals of the HCC+RIF group were treated with rifaximin (Sigma Chemical, United States) at the dose of 50 mg/kg/day by gavage, diluted in distilled water (modified from Dapito et al.)¹⁴. The animals of the CO group and the HCC group received the daily gavage with distilled water only in order to undergo the same stress conditions as the HCC+RIF group.

Analysis of biochemical parameters and anatomopathological evaluation

After 16 weeks, all animals were fasted for 8 hours, anesthetized with isoflurane (BioChimico, Brazil) at a concentration of 5% diluted in 100% oxygen and euthanized by transcardial exsanguination. The blood was collected, and the serum was isolated for biochemical analyses of Total Cholesterol, HDL, LDL, Triglycerides, AST, ALT and Alkaline Phosphatase, which were performed in routine automated equipment at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Siemens Advia 1800 Chemistry System).

After collection of the livers, counting of the number and measurement of visible tumors were performed. Part of the liver tissue was stored in 10% formaldehyde (Synth, Brazil) and cut to a thickness of 3- μ m. The sections were stained with Hematoxylin & Eosin and Picrosirius Red. The blades were evaluated by two blinded experienced pathologists. Microphotographs of the slides were performed using an optical microscope.

Histological variables were evaluated using a modified Kleiner (2005) system: steatosis (0-3), lobular inflammation (0-3), hepatocellular ballooning (0-2), and fibrosis (0-4). After graduation, was obtained the NAFLD activity score (NAS), in which values greater than or equal to 5 correspond to definitive NASH diagnosis;

values of 3 or 4 correspond to probable diagnosis; and values of 1 or 2 correspond to the non-presence of NASH¹⁵. The degree of fibrosis was evaluated on the blades stained with Picrosirius Red, and the degree of cancer was graded according to the Edmondson & Steiner classification, in grades 1 to 4¹⁶.

Statistical analysis

For the symmetric variables, the Tukey test (described by mean \pm standard deviation) was used, and for the asymmetric variables, the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn test (described by median and minimum-maximum) were used. The chi-square test complemented by the analysis of adjusted residuals was performed to obtain the percentage data. The analyses were performed using the statistical package PASW Statistics, version 18.0. (SPSS Inc, Chicago, United States). The p value was considered statistically significant when ≤ 0.05 .

RESULTS

In the HCC and HCC+RIF groups, one animal died in each group at the 15th week. These animals were eliminated from the study. In the CO group, no death was reported during the experiment period.

Biochemical parameters

Serum biochemical analyses indicated that total cholesterol, LDL, AST and alkaline phosphatase levels were significantly higher in the HCC group compared to the CO group. The levels of these parameters for the HCC+RIF group were lower when compared with the HCC group, although no significant statistical difference was observed. On the other hand, values of triglycerides, HDL and ALT were not statistically different between the groups (Table 1).

Table 1. Biochemical parameters

Variable*	CO (n=8)	HCC (n=7)	HCC+RIF (n=7)	p
Total cholesterol	98,4 ± 19,3 ^a	167,8 ± 23,1 ^b	139,4 ± 33,5 ^b	<0,001
Triglycerides	80,5 ± 21,8	94,2 ± 42,8	67 ± 20,7	0,266
HDL	76,3 ± 12,4	89,5 ± 9,9	79,4 ± 16,9	0,205
LDL	5 (0-17,8) ^a	62,1 (31,4-85,4) ^b	47 (18-79) ^b	0,001
ALT	45,5 (42-56)	47,5 (37 -71)	47 (37-169)	0,939
AST	71,5 (48-81) ^a	125,5 (92-184) ^b	101 (80-370) ^b	0,001
Alkaline phosphatase	60,3 ± 4,8 ^a	128,7 ± 27,3 ^b	124 ± 24,1 ^b	<0,001

* Described by mean ± standard deviation or median (minimum-maximum); a, b Equal letters do not differ by the Tukey test (symmetric distribution) or Kruskal-Wallis test followed by the Dunn test (asymmetric distribution). CG: Control Group, HCC: Hepatocellular Carcinoma Group, HCC+RIF: Rifaximin Treatment Group.

Hepatic histology

When evaluating the steatosis score, it was observed that most of the animals in the HCC group had a score of 2 and that all the animals treated with rifaximin had a steatosis score of 1. The HCC and HCC+RIF groups had the highest percentage of animals with a score of 1 for lobular inflammation. In the hepatocellular ballooning classification, it was observed that in the HCC group, the animals were allocated to grade 1 and 2, but the HCC+RIF group had all animals only in grade 1 (Table 2). Concerning the NAS, the HCC group had a grade between 3 to 5, which indicates probable steatohepatitis and definitive steatohepatitis, respectively. Nevertheless, 100% of the animals treated with rifaximin remained in grade 3 of the NAS classification, which means that all animals had a probable steatohepatitis diagnosis, suggesting a moderate efficacy of rifaximin treatment (Table 2 and Figure 1). For all the parameters described above, the CO group allocated 100% of the animals at grade zero.

Table 2. Distribution of histological findings of steatosis score, lobular inflammation, hepatocellular ballooning, and NAS

Variable	CO (n=8) %	HCC (n=7) %	HCC+RIF (n=7) %	p
Steatosis				<0,001
0	8 (100)*	0 (0,0)	0 (0,0)	
1	0 (0,0)	3 (42,9)	7 (100)*	
2	0 (0,0)	4 (57,1)*	0 (0,0)	
Lobular inflammation				<0,001
0	8 (100)*	0 (0,0)	0 (0,0)	
1	0 (0,0)	6 (85,7)*	7 (100)*	
2	0 (0,0)	1 (14,3)	0 (0,0)	
Hepatocellular ballooning				<0,001
0	8 (100)*	0 (0,0)	0 (0,0)	
1	0 (0,0)	5 (71,4)*	7 (100)*	
2	0 (0,0)	2 (28,6)	0 (0,0)	
NAS				<0,001
0	8 (100)*	0 (0,0)	0 (0,0)	
1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
2	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
3	0 (0,0)	3 (42,9)	7 (100)*	
4	0 (0,0)	1 (14,3)	0 (0,0)	
5	0 (0,0)	3 (42,9)*	0 (0,0)	

* Statistically significant association by Adjusted Residuals test. CO: Control Group, HCC: Hepatocellular Cancer Group, HCC+RIF: Rifaximin Treatment Group.

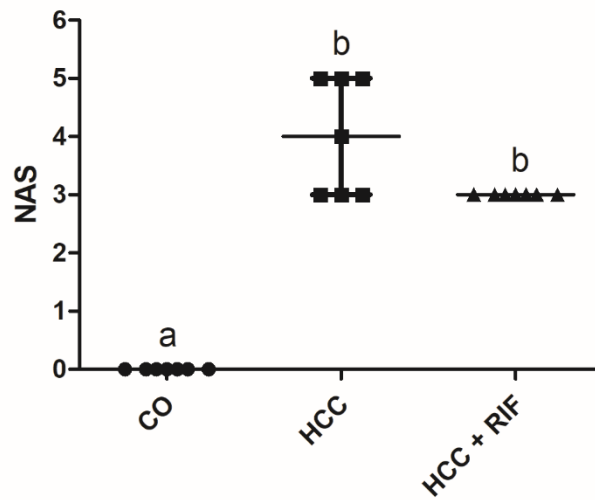


Figure 1. Histological scores of the NAS. The HCC and HCC+RIF groups had an increase when compared to the CO group, but the difference between the groups was not statistically significant. Data described by mean \pm standard deviation using the Tukey test; a, b Equal letters do not differ.

Degree of fibrosis

When performing the evaluation of fibrosis by staining with Picrosirius Red, it was observed that the HCC and HCC+RIF groups presented areas of fibrosis and were distinct in relation to the CO group (Figure 2).

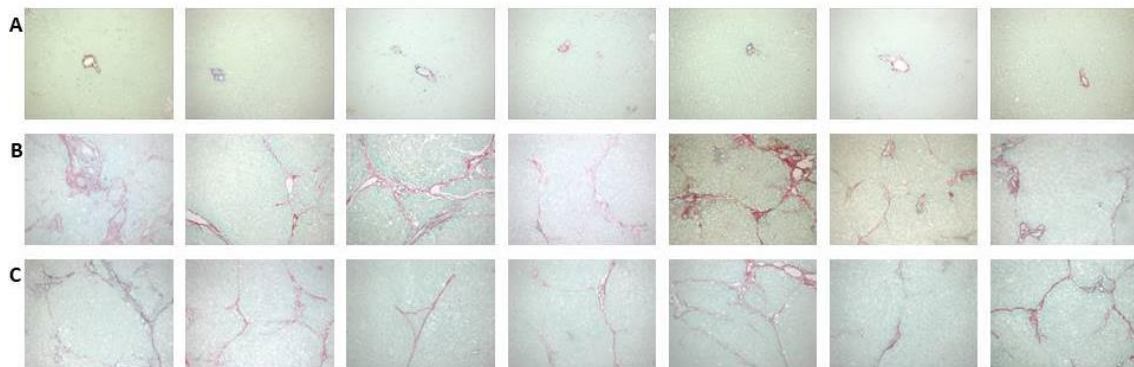


Figure 2. Micrographs of liver sections with Picrosirius Red staining. A) CO group: normal hepatic parenchyma. B) HCC group: presents areas of fibrosis, as does the HCC+RIF group (C). Increase: 200x

The results for the fibrosis grade score that was evaluated by pathologists are shown in Table 3. In the HCC and HCC+RIF groups, 42.9% and 57.1% of the animals are

allocated in the 1/2 and 3/4 grade, respectively. In the control group, all the animals had a score of 0 (100%).

Table 3. Distribution of the histological findings of the fibrosis score

Variable	CO (n=8) %	HCC (n=7) %	HCC+RIF (n=7) %	p
Fibrosis				<0,001
0	8 (100)*	0 (0,0)	0 (0,0)	
1/2	0 (0,0)	3 (42,9)	3 (42,9)	
3/4	0 (0,0)	4 (57,1)	4 (57,1)	

* Statistically significant association by Adjusted Residual test. CO: Control Group, HCC: Hepatocellular Cancer Group, HCC+RIF: rifaximin Treatment Group.

Anatomopathological characterization

In the macroscopic assessment of livers after 16 weeks of induction with CDHC and DEN, hepatic lesions were observed in the HCC group. The rifaximin-treated group, however, appears to have decreased the amount of apparent hepatic damage. As expected, no lesions were observed in the CO group (Figure 3A-C).



Figure 3. Illustration of macroscopic findings. A) CO group, liver with normal appearance. B) HCC group, liver with steatotic aspect with various hepatic nodules. C) HCC+RIF group, liver with steatotic aspect lower than the HCC group and with few hepatic nodules.

Table 4 shows the description of macroscopic and microscopic lesions. In general, in the HCC group, all animals (100%) presented some type of lesion: five rats had macroscopic lesions and six had microscopic lesions. In the HCC+RIF group, 57.1%

of the animals presented lesions: two had only macroscopic lesions and four had microscopic lesions. It should be noted that in this group, three animals did not present any type of lesion (42.9%). No lesions were observed in the CO group. The number and size of lesions can be seen in Table 4.

Table 4. Description of hepatic injuries

Group	rat N°	Macroscopic Lesions		Microscopic Lesions	
		N°	cm	N°	Cm
CO	1-8	NP	NP	NP	NP
HCC	9	1	0,5	>10	<0,1
HCC	10	2	0,5	>10	<0,1
HCC	11	NP	NP	>10	<0,1
HCC	12	1	0,3	>10	<0,1
HCC	13	1	1,6	>10	<0,1
HCC	15	1	2	-	-
HCC	16	NP	NP	>10	<0,1
HCC+RIF	17	1	1,5	>10	<0,1
HCC+RIF	19	NP	NP	NP	NP
HCC+RIF	20	NP	NP	>10	<0,1
HCC+RIF	21	NP	NP	NP	NP
HCC+RIF	22	1	2,8	>10	<0,1
HCC+RIF	23	NP	NP	>10	<0,1
HCC+RIF	24	NP	NP	NP	NP

NP: Not Present. CO: Control Group, HCC: Hepatocellular Carcinoma Group, HCC+RIF: Rifaximin Treatment group.

Degree of cancer

Histological analysis showed that all animals in the HCC group had an altered parenchyma, while treatment with rifaximin appears to decrease the degree of lesion. No evidence of hepatic tumor injury was observed in the CO group (Figure 4).

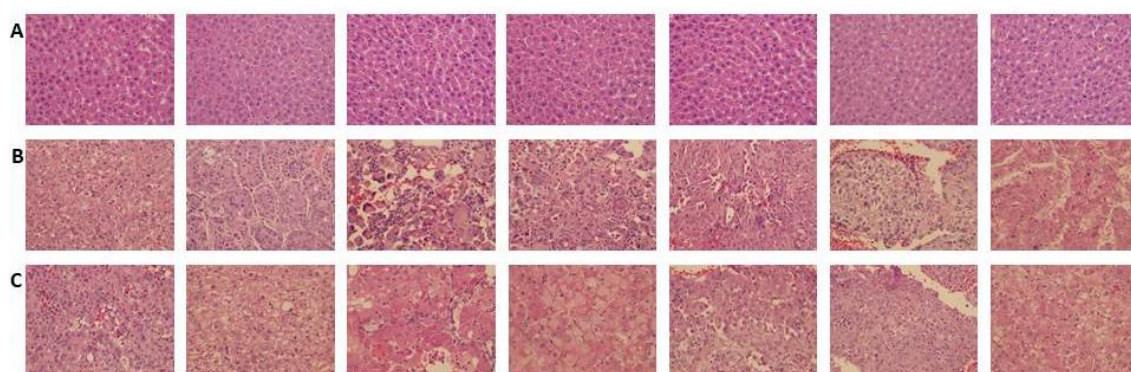


Figure 4. Micrographs of liver sections with Hematoxylin and Eosin staining. A) CO group: normal hepatic parenchyma; B) HCC group: presence of neoplastic cells with marked atypia; C) HCC+RIF group: only three animals with presence of neoplastic cells. The other animals showed no evidence of cancer, but mild steatosis. Increase: 400x.

When evaluating the degree of cancer by the Edmondson-Steiner score, it was observed that in the HCC group, all animals had grade 3 and 4, corresponding to low-differentiated and undifferentiated cancer, respectively. In the HCC+RIF group, some animals were also allocated in grade 3 and 4, but 3 animals did not present cancer (42.9%) (Table 5 and Figure 5).

Table 5. Distribution of the histological findings of the degree of cancer

Variable	CO (n=8) %	HCC (n=7) %	HCC+RIF (n=7) %	P
Tumor grade				0,004
0	8 (100)*	0 (0,0)	3 (42,9)	
1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
2	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
3	0 (0,0)	4 (57,1)	2 (28,6)	
4	0 (0,0)	3 (42,9)	2 (28,6)	

* Statistically significant association by the Adjusted Residuals Test. CO: Control Group, HCC: Hepatocellular Cancer Group, HCC+RIF: Rifaximin Treatment group.

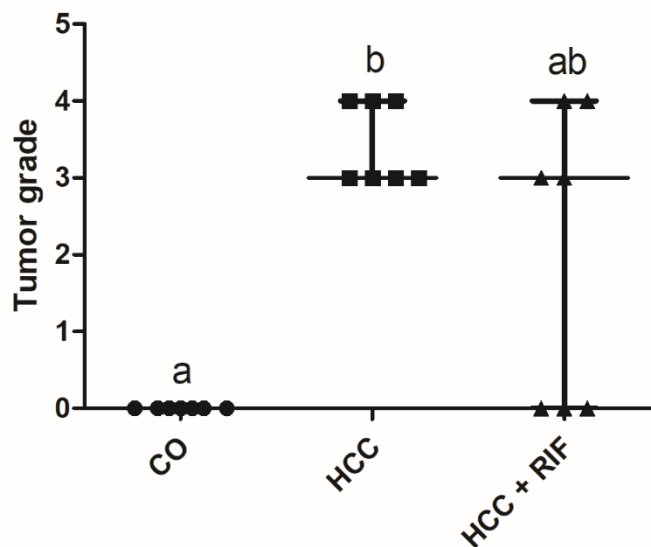


Figure 5. Histological scores of the degree of cancer. The HCC and HCC+RIF groups did not present a statistically significant difference, but the HCC+RIF group also showed no difference compared to the CO group. Data described by mean \pm standard deviation using the Tukey test; a, b Equal letters do not differ.

DISCUSSION

In this study, it was shown that treatment with rifaximin appears to improve the histological scores of NAS and degree of cancer.

Steatosis and steatohepatitis are the initial spectra of NAFLD, the major complication being the development of HCC, which is the second most common cancer-related cause of death worldwide. At present, several therapies are available that are used in clinical practice, including surgical resection, radiofrequency, chemical ablation, sorafenib and liver transplantation. HCC treatment, however, remains a challenge for medicine^{18; 19; 20; 21; 22}. Thus, new therapeutic interventions capable of stopping the progression of the disease are crucial in global healthcare^{19; 23}. This study sought to evaluate the preventive effect of rifaximin in the early stages of NAFLD in a model that attempts to replicate the natural history stages of the disease with the subsequent development of HCC, mimicking the Western lifestyle using CDHC in conjunction with DEN.

Treatment with rifaximin seems to decrease the values of the biochemical parameters, although they are not statistically significant. Although the values of the HCC group are expected for an HCC model, currently, no data are found in the literature regarding the biochemical parameters of this experimental model, and our study was the first to describe them.

In the evaluation of steatosis, lobular inflammation and hepatocellular ballooning, none of the animals treated with rifaximin reached a high score. The major effect of rifaximin appears to be on steatosis, which is reflected in the NAS score, in which 100% of the animals had a probable case of NASH. Nevertheless, in the HCC group, higher values were observed for all scores, and consequently, the animals were found with a definitive diagnosis of NASH. In our study, rifaximin appeared to have no effect on hepatic fibrosis, but data in the literature remain contradictory^{24,25}.

In the HCC group, the animals had medium and well-differentiated degrees of cancer, indicating that the animal model used is efficient. Although all animals in the HCC+RIF group showed advanced liver disease, the number of animals allocated to the average and well differentiated degree of cancer was lower than in the HCC group. Interestingly, 42.9% of the animals treated with rifaximin did not show any degree of cancer. This allows us think that rifaximin has some degree of preventive effect on the progression of NAFLD to HCC. Although this percentage is not statistically significant, the variable effectiveness of rifaximin is known in studies on small intestinal bacterial overgrowth²⁶ and irritable bowel syndrome²⁷. In turn, several studies indicate that the mechanism of action of this antibiotic is by modulation of the intestinal microbiota^{28; 29} but there is still controversy³⁰. Therefore, further studies are needed to determine the mechanism by which rifaximin had a preventative effect in part of the animals in the HCC+RIF group.

CONCLUSIONS

In conclusion, our preliminary results indicate that treatment with rifaximin during the defined period was able to moderately reduce the development of NASH and HCC.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in the conception/design, advisory board conducting, literature selection, data interpretation, manuscript writing, and final approval of manuscript.

FUNDING

This study was supported by the Research Incentive Fund – Hospital de Clínicas de Porto Alegre. J.T.F is a recipient of the Coordination of Improvement of Higher Level Personnel.

DISCLOSURE OF INTERESTS

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties. Peer reviewers on this manuscript have no relevant financial or other relationships to disclose.

REFERENCE

- 1 BELLENTANI, S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*, v. 37 Suppl 1, p. 81-84, Jan 2017. ISSN 1478-3231. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28052624> >.
- 2 THAN, N. N.; NEWSOME, P. N. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*, v. 239, n. 1, p. 192-202, Mar 2015. ISSN 1879-1484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25617860> >.
- 3 LEWIS, J. R.; MOHANTY, S. R. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci*, v. 55, n. 3, p. 560-78, Mar 2010. ISSN 1573-2568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20101463> >.
- 4 GOMES, M. A. et al. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. *Rev Assoc Med Bras (1992)*, v. 59, n. 5, p. 514-24, 2013 Sep-Oct 2013. ISSN 1806-9282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24041910> >.
- 5 TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, v. 65, n. 2, p. 87-108, Mar 2015. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25651787> >.
- 6 RODERBURG, C.; LUEDDE, T. The role of the gut microbiome in the development and progression of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Gut Microbes*, v. 5, n. 4, p. 441-5, Jul 2014. ISSN 1949-0984. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25006881> >.

- 7 TAO, X.; WANG, N.; QIN, W. Gut Microbiota and Hepatocellular Carcinoma. *Gastrointest Tumors*, v. 2, n. 1, p. 33-40, May 2015. ISSN 2296-3774. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26673641> >.
- 8 PIMENTEL, M. Review of rifaximin as treatment for SIBO and IBS. *Expert Opin Investig Drugs*, v. 18, n. 3, p. 349-58, Mar 2009. ISSN 1744-7658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19243285> >.
- 9 SHAYTO, R. H.; ABOU MRAD, R.; SHARARA, A. I. Use of rifaximin in gastrointestinal and liver diseases. *World J Gastroenterol*, v. 22, n. 29, p. 6638-51, Aug 2016. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27547007> >.
- 10 DUPONT, H. L. Biologic properties and clinical uses of rifaximin. *Expert Opin Pharmacother*, v. 12, n. 2, p. 293-302, Feb 2011. ISSN 1744-7666. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21226639> >.
- 11 RIVKIN, A.; GIM, S. Rifaximin: new therapeutic indication and future directions. *Clin Ther*, v. 33, n. 7, p. 812-27, Jul 2011. ISSN 1879-114X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21741091> >.
- 12 OJETTI, V. et al. Rifaximin pharmacology and clinical implications. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, v. 5, n. 6, p. 675-82, Jun 2009. ISSN 1744-7607. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442033> >.
- 13 DE LIMA, V. M. et al. A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, v. 49, n. 6, p. 1055-61, Dec 2008. ISSN 0168-8278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18929425> >.
- 14 DAPITO, D. H. et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell*, v. 21, n. 4, p. 504-16, Apr 2012. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22516259> >.
- 15 KLEINER, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, v. 41, n. 6, p. 1313-21, Jun 2005. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15915461> >.
- 16 EDMONDSON, H. A.; STEINER, P. E. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer*, v. 7, n. 3, p. 462-503, May 1954. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13160935> >.
- 17 LLOVET, J. M. et al. Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era. *Nat Rev Clin Oncol*, v. 12, n. 7, p. 408-24, Jul 2015. ISSN 1759-4782. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26054909> >.
- 18 NIU, L. et al. New insights into sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: Responsible mechanisms and promising strategies. *Biochim Biophys Acta*, v. 1868, n. 2, p. 564-570, 12 2017. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29054475> >.

- 19 CRISSIEN, A. M.; FRENETTE, C. Current management of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, v. 10, n. 3, p. 153-61, Mar 2014. ISSN 1554-7914. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24829542> >.
- 20 FORNER, A.; LLOVET, J. M.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, v. 379, n. 9822, p. 1245-55, Mar 2012. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22353262> >.
- 21 ARAVALLI, R. N.; CRESSMAN, E. N.; STEER, C. J. Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. *Arch Toxicol*, v. 87, n. 2, p. 227-47, Feb 2013. ISSN 1432-0738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23007558> >.
- 22 PASCUAL, S.; HERRERA, I.; IRURZUN, J. New advances in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*, v. 8, n. 9, p. 421-38, Mar 2016. ISSN 1948-5182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27028578> >.
- 23 LLOVET, J. M. et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*, v. 2, p. 16018, Apr 2016. ISSN 2056-676X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27158749> >.
- 24 SHIN, S. K. et al. Effect of Rifaximin on Hepatic Fibrosis in Bile Duct-ligated Rat Model. *Korean J Gastroenterol*, v. 70, n. 5, p. 239-246, Nov 2017. ISSN 2233-6869. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29161793> >.
- 25 ZHU, Q. et al. Intestinal decontamination inhibits TLR4 dependent fibronectin-mediated cross-talk between stellate cells and endothelial cells in liver fibrosis in mice. *J Hepatol*, v. 56, n. 4, p. 893-9, Apr 2012. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173161> >.
- 26 PITTMAN, N. et al. Treatment of small intestinal bacterial overgrowth in systemic sclerosis: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)*, Jul 2018. ISSN 1462-0332. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29982822> >.
- 27 SCHMULSON, M. et al. Microbiota, gastrointestinal infections, low-grade inflammation, and antibiotic therapy in irritable bowel syndrome: an evidence-based review. *Rev Gastroenterol Mex*, v. 79, n. 2, p. 96-134, 2014 Apr-Jun 2014. ISSN 0375-0906. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24857420> >.
- 28 COBBOLD, J. F. L. et al. Rifaximin in non-alcoholic steatohepatitis: An open-label pilot study. *Hepatol Res*, v. 48, n. 1, p. 69-77, Jan 2018. ISSN 1386-6346. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28425154> >.
- 29 GANGARAPU, V. et al. Efficacy of rifaximin on circulating endotoxins and cytokines in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, v. 27, n. 7, p. 840-5, Jul 2015. ISSN 1473-5687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26043290> >.
- 30 KAJI, K. et al. Rifaximin ameliorates hepatic encephalopathy and endotoxemia without affecting the gut microbiome diversity. *World J Gastroenterol*, v. 23, n. 47, p. 8355-8366, Dec 2017. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

CONCLUSÕES

1. Foi possível reproduzir o modelo de carcinogênese hepática experimental secundária à DHGNA e avaliar novos parâmetros bioquímicos no modelo animal que ainda não foram descritos na literatura.
2. O tratamento com rifaximina melhora os valores séricos bioquímicos, mas sem significância estatística.
3. O tratamento com rifaximina promoveu uma discreta melhora no *NAFLD Activity Score*, mas sem significância estatística e não teve efeito benéfico sobre o grau de fibrose.
4. O tratamento com rifaximina parece reduzir o número e tamanho dos tumores hepáticos, assim como teve um efeito na progressão no CHC em alguns animais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como considerações finais são possíveis mencionar as originalidades e limitações do presente estudo.

A originalidade consiste na avaliação do efeito da rifaximina em um modelo CHC que utiliza a DHDC para mimetizar o estilo de vida ocidental, juntamente ao DEN, recriando as etapas da história natural da DHGNA com progressão ao CHC. Até o momento, apenas um estudo avaliou o tratamento com rifaximina. No entanto, foi utilizado um modelo químico de CHC⁷³.

Um questionamento em nosso estudo é a dose de rifaximina utilizada. A escolha de 50mg/kg/dia foi baseada no estudo de Dapito e colaboradores, no qual foi analisado o efeito da rifaximina após o desenvolvimento do CHC. Contudo, nosso estudo avalia um tratamento preventivo, administrando a rifaximina nas etapas iniciais de EHNA. Há na literatura outros estudos que avaliam o efeito da rifaximina em outras doenças gastrointestinais e hepáticas, que utilizam doses que de 25 a 250 mg/kg/dia, com tempo de tratamento entre 3 e 21 dias ^{75; 76; 77; 78; 79}. Estes estudos indicam que seria possível aumentar a dose de rifaximina e, assim, avaliar se ocorreria um melhor efeito do medicamento sobre o CHC.

Por outra parte, nossos achados mostraram que três dos sete animais que receberam rifaximina não apresentaram progressão para CHC. Sabemos que a rifaximina tem um efeito sobre a microbiota³ e que esta tem um papel fundamental no desenvolvimento do CHC⁸⁰. Assim, uma hipótese possível é que rifaximina possa ter modificado a microbiota dos animais e, como consequência, possa ter evitado a progressão da doença. Para podermos confirmar nossa hipótese seria interessante analisar a microbiota dos animais.

Uma das limitações deste estudo foi a falta de um grupo experimental com a finalidade de verificar em que etapa da doença os animais estariam quando iniciado o tratamento com rifaximina. Já foi descrito na literatura que os animais desenvolvem EHNA na 5ª semana, de acordo com o estudo realizado por Stefano e colaboradores (2015) que utilizaram o mesmo modelo experimental⁸¹.

Considerando que a rifaximina parece ter um efeito na progressão do CHC, novos estudos podem ser realizados, sendo possível avaliar novas doses, modificar o tempo de tratamento bem como o momento de início.

PERSPECTIVAS

Diversos questionamentos foram gerados a partir dos dados obtidos e, por isso, como principais perspectivas do presente trabalho temos:

- a) Avaliar doses maiores de rifaximina.
- b) Avaliar diferentes tempos de tratamento, com administração da rifaximina em tempos anteriores ao que já foi testado.
- c) Realizar biópsias do fígado nos animais no momento de início do tratamento, para verificar a etapa da doença ou realizar um grupo experimental para verificar a etapa da doença dos animais quando iniciado o tratamento com rifaximina.
- d) Realizar a avaliação de marcadores inflamatórios dos animais.
- e) Realizar um grupo experimental controle somente com a administração de rifaximina, para verificar a ação do fármaco no organismo dos animais saudáveis no tempo de estudo.
- f) Avaliar se houve modificação da microbiota, permeabilidade intestinal endotoxemia dos animais.

REFERÊNCIAS

- 1 MAURICE, J.; MANOUSOU, P. Non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Med (Lond)**, v. 18, n. 3, p. 245-250, Jun 2018. ISSN 1473-4893. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29858436> >.
- 2 YOUNOSSI, Z. M. et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 73-84, 07 2016. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26707365> >.
- 3 SHAYTO, R. H.; ABOU MRAD, R.; SHARARA, A. I. Use of rifaximin in gastrointestinal and liver diseases. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 29, p. 6638-51, Aug 2016. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27547007> >.
- 4 PONZIANI, F. R. et al. Effect of rifaximin on gut microbiota composition in advanced liver disease and its complications. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 43, p. 12322-33, Nov 2015. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26604640> >.
- 5 LLOVET, J. M. et al. Hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, p. 16018, Apr 2016. ISSN 2056-676X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27158749> >.
- 6 CHOLANKERIL, G. et al. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Current knowledge and implications for management. **World J Hepatol**, v. 9, n. 11, p. 533-543, Apr 2017. ISSN 1948-5182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28469809> >.
- 7 THAN, N. N.; NEWSOME, P. N. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. **Atherosclerosis**, v. 239, n. 1, p. 192-202, Mar 2015. ISSN 1879-1484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25617860> >.
- 8 CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. **Hepatology**, v. 55, n. 6, p. 2005-23, Jun 2012. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22488764> >.
- 9 BRUNT, E. M.; TINIAKOS, D. G. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 42, p. 5286-96, Nov 2010. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21072891> >.
- 10 SATAPATHY, S. K.; SANYAL, A. J. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Semin Liver Dis**, v. 35, n. 3, p. 221-35, Aug 2015. ISSN 1098-8971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26378640> >.
- 11 ARAB, J. P.; ARRESE, M.; TRAUNER, M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Annu Rev Pathol**, v. 13, p. 321-350, Jan 2018. ISSN 1553-4014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29414249> >.

- ¹² LEWIS, J. R.; MOHANTY, S. R. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. **Dig Dis Sci**, v. 55, n. 3, p. 560-78, Mar 2010. ISSN 1573-2568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20101463> >.
- ¹³ CORTE, C. D. et al. Epidemiology and Natural History of NAFLD. **J Med Biochem**, v. 34, n. 1, p. 13-17, Jan 2015. ISSN 1452-8258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28356818> >.
- ¹⁴ BENEDICT, M.; ZHANG, X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. **World J Hepatol**, v. 9, n. 16, p. 715-732, Jun 2017. ISSN 1948-5182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28652891> >.
- ¹⁵ ARAÚJO, A. R. et al. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. **Liver Int**, v. 38 Suppl 1, p. 47-51, Feb 2018. ISSN 1478-3231. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29427488> >.
- ¹⁶ COTRIM, H. P. et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. **Ann Hepatol**, v. 10, n. 1, p. 33-7, 2011 Jan-Mar 2011. ISSN 1665-2681. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21301007> >.
- ¹⁷ LEITE, N. C. et al. Histopathological stages of nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: prevalences and correlated factors. **Liver Int**, v. 31, n. 5, p. 700-6, May 2011. ISSN 1478-3231. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21457442> >.
- ¹⁸ MOHAMAD, B. et al. Characterization of hepatocellular carcinoma (HCC) in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients without cirrhosis. **Hepatol Int**, v. 10, n. 4, p. 632-9, Jul 2016. ISSN 1936-0541. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26558795> >.
- ¹⁹ PAPANDREOU, D.; ANDREOU, E. Role of diet on non-alcoholic fatty liver disease: An updated narrative review. **World J Hepatol**, v. 7, n. 3, p. 575-82, Mar 2015. ISSN 1948-5182. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25848481> >.
- ²⁰ MARCHESINI, G. et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. **Hepatology**, v. 37, n. 4, p. 917-23, Apr 2003. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668987> >.
- ²¹ SEO, S. et al. De novo nonalcoholic fatty liver disease after liver transplantation. **Liver Transpl**, v. 13, n. 6, p. 844-7, Jun 2007. ISSN 1527-6465. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17029282> >.
- ²² AHMED, A.; WONG, R. J.; HARRISON, S. A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Review: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 13, n. 12, p. 2062-70, Nov 2015. ISSN 1542-7714. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26226097> >.
- ²³ SPENGLER, E. K.; LOOMBA, R. Recommendations for Diagnosis, Referral for Liver Biopsy, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. **Mayo Clin Proc**, v. 90, n. 9, p. 1233-46, Sep 2015. ISSN 1942-5546. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26219858> >.

- ²⁴ COTRIM, H. P. et al. NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE BRAZILIAN SOCIETY OF HEPATOLOGY CONSENSUS. **Arq Gastroenterol**, v. 53, n. 2, p. 118-22, 2016 Apr-Jun 2016. ISSN 1678-4219. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27305420> >.
- ²⁵ BROWN, G. T.; KLEINER, D. E. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. **Metabolism**, v. 65, n. 8, p. 1080-6, 08 2016. ISSN 1532-8600. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26775559> >.
- ²⁶ KLEINER, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-21, Jun 2005. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15915461> >.
- ²⁷ KIKUCHI, L. et al. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. **Antivir Ther**, v. 18, n. 3 Pt B, p. 445-9, 2013. ISSN 2040-2058. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23793796> >.
- ²⁸ DHANASEKARAN, R.; LIMAYE, A.; CABRERA, R. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis, and therapeutics. **Hepat Med**, v. 4, p. 19-37, May 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24367230> >.
- ²⁹ PARANAGUÁ-VEZOZZO, D. C. et al. Epidemiology of HCC in Brazil: incidence and risk factors in a ten-year cohort. **Ann Hepatol**, v. 13, n. 4, p. 386-93, 2014 Jul-Aug 2014. ISSN 1665-2681. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24927609> >.
- ³⁰ BRUIX, J.; GORES, G. J.; MAZZAFERRO, V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. **Gut**, v. 63, n. 5, p. 844-55, May 2014. ISSN 1468-3288. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24531850> >.
- ³¹ MARGINI, C.; DUFOUR, J. F. The story of HCC in NAFLD: from epidemiology, across pathogenesis, to prevention and treatment. **Liver Int**, v. 36, n. 3, p. 317-24, Mar 2016. ISSN 1478-3231. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26601627> >.
- ³² WONG, R. J.; CHEUNG, R.; AHMED, A. Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S. **Hepatology**, v. 59, n. 6, p. 2188-95, Jun 2014. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24375711> >.
- ³³ COTRIM, H. P. et al. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: Brazilian survey. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 71, n. 5, p. 281-4, May 2016. ISSN 1980-5322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27276398> >.
- ³⁴ CHAGAS, A. L. et al. Does hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis exist in cirrhotic and non-cirrhotic patients? **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 10, p. 958-62, Oct 2009. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19787150> >.

- ³⁵ SAID, A.; GHUFRAN, A. Epidemic of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. **World J Clin Oncol**, v. 8, n. 6, p. 429-436, Dec 2017. ISSN 2218-4333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29291167> >.
- ³⁶ PONZIANI, F. R. et al. Hepatocellular Carcinoma is Associated with Gut Microbiota Profile and Inflammation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Hepatology**, Apr 2018. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29665135> >.
- ³⁷ CRISSIEN, A. M.; FRENETTE, C. Current management of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterol Hepatol (N Y)**, v. 10, n. 3, p. 153-61, Mar 2014. ISSN 1554-7914. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24829542> >.
- ³⁸ SCHLAGETER, M. et al. Histopathology of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 43, p. 15955-64, Nov 2014. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25473149> >.
- ³⁹ EDMONDSON, H. A.; STEINER, P. E. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. **Cancer**, v. 7, n. 3, p. 462-503, May 1954. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13160935> >.
- ⁴⁰ NIU, L. et al. New insights into sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: Responsible mechanisms and promising strategies. **Biochim Biophys Acta**, v. 1868, n. 2, p. 564-570, 12 2017. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29054475> >.
- ⁴¹ FORNER, A.; LLOVET, J. M.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1245-55, Mar 2012. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22353262> >.
- ⁴² ARAVALLI, R. N.; CRESSMAN, E. N.; STEER, C. J. Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. **Arch Toxicol**, v. 87, n. 2, p. 227-47, Feb 2013. ISSN 1432-0738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23007558> >.
- ⁴³ PASCUAL, S.; HERRERA, I.; IRURZUN, J. New advances in hepatocellular carcinoma. **World J Hepatol**, v. 8, n. 9, p. 421-38, Mar 2016. ISSN 1948-5182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27028578> >.
- ⁴⁴ CHEDID, M. F. et al. HEPATOCELLULAR CARCINOMA: DIAGNOSIS AND OPERATIVE MANAGEMENT. **Arq Bras Cir Dig**, v. 30, n. 4, p. 272-278, 2017 Oct-Dec 2017. ISSN 2317-6326. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29340553> >.
- ⁴⁵ HARTKE, J.; JOHNSON, M.; GHABRIL, M. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. **Semin Diagn Pathol**, v. 34, n. 2, p. 153-159, Mar 2017. ISSN 0740-2570. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28108047> >.

- ⁴⁶ BAKIRI, L.; WAGNER, E. F. Mouse models for liver cancer. **Mol Oncol**, v. 7, n. 2, p. 206-23, Apr 2013. ISSN 1878-0261. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23428636> >.
- ⁴⁷ FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S. Mouse models of hepatocellular carcinoma. **Semin Liver Dis**, v. 30, n. 1, p. 87-98, Feb 2010. ISSN 1098-8971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20175036> >.
- ⁴⁸ LI, Y.; TANG, Z. Y.; HOU, J. X. Hepatocellular carcinoma: insight from animal models. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 1, p. 32-43, Oct 2011. ISSN 1759-5053. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22025031> >.
- ⁴⁹ DE MINICIS, S. et al. Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. **Dig Liver Dis**, v. 45, n. 6, p. 450-9, Jun 2013. ISSN 1878-3562. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23177172> >.
- ⁵⁰ TOLBA, R. et al. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. **Lab Anim**, v. 49, n. 1 Suppl, p. 59-69, Apr 2015. ISSN 1758-1117. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25835739> >.
- ⁵¹ WU, J. Utilization of animal models to investigate nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 42762-42776, Jul 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27072576> >.
- ⁵² ASGHARPOUR, A. et al. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. **J Hepatol**, v. 65, n. 3, p. 579-88, Sep 2016. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27261415> >.
- ⁵³ GRATAGLIANO, I. et al. Starvation impairs antioxidant defense in fatty livers of rats fed a choline-deficient diet. **J Nutr**, v. 130, n. 9, p. 2131-6, Sep 2000. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10958803> >.
- ⁵⁴ RAUBENHEIMER, P. J.; NYIRENDA, M. J.; WALKER, B. R. A choline-deficient diet exacerbates fatty liver but attenuates insulin resistance and glucose intolerance in mice fed a high-fat diet. **Diabetes**, v. 55, n. 7, p. 2015-20, Jul 2006. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16804070> >.
- ⁵⁵ HEINDRYCKX, F.; COLLE, I.; VAN VLIERBERGHE, H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. **Int J Exp Pathol**, v. 90, n. 4, p. 367-86, Aug 2009. ISSN 1365-2613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19659896> >.
- ⁵⁶ SANCHES, S. C. et al. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual Animal Models. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 574832, 2015. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26064924> >.
- ⁵⁷ DE LIMA, V. M. et al. A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**, v. 49, n. 6, p. 1055-61, Dec

2008. ISSN 0168-8278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18929425> >.

⁵⁸ KISHIDA, N. et al. Development of a novel mouse model of hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis using a high-fat, choline-deficient diet and intraperitoneal injection of diethylnitrosamine. **BMC Gastroenterol**, v. 16, n. 1, p. 61, Jun 2016. ISSN 1471-230X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27296438> >.

⁵⁹ MAZO, D. F. et al. S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in experimental nonalcoholic steatohepatitis. **Drug Des Devel Ther**, v. 7, p. 553-63, 2013. ISSN 1177-8881. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23843692> >.

⁶⁰ CARVALHO, C. F. et al. Elastography and Contrast-enhanced Ultrasonography in the Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in an Experimental Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. **J Clin Exp Hepatol**, v. 3, n. 2, p. 96-101, Jun 2013. ISSN 0973-6883. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25755482> >.

⁶¹ DUPONT, H. L. Biologic properties and clinical uses of rifaximin. **Expert Opin Pharmacother**, v. 12, n. 2, p. 293-302, Feb 2011. ISSN 1744-7666. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21226639> >.

⁶² SCARPIGNATO, C.; PELOSINI, I. Rifaximin, a poorly absorbed antibiotic: pharmacology and clinical potential. **Chemotherapy**, v. 51 Suppl 1, p. 36-66, 2005. ISSN 0009-3157. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855748> >.

⁶³ DUPONT, H. L. Therapeutic Effects and Mechanisms of Action of Rifaximin in Gastrointestinal Diseases. **Mayo Clin Proc**, v. 90, n. 8, p. 1116-24, Aug 2015. ISSN 1942-5546. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26162610> >.

⁶⁴ TRAPNELL, C. B. et al. Absence of effect of oral rifaximin on the pharmacokinetics of ethinyl estradiol/norgestimate in healthy females. **Ann Pharmacother**, v. 41, n. 2, p. 222-8, Feb 2007. ISSN 1542-6270. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17284510> >.

⁶⁵ <http://www.targaxan.co.uk/targaxan/moa/#>.

⁶⁶ ADACHI, J. A.; DUPONT, H. L. Rifaximin: a novel nonabsorbed rifamycin for gastrointestinal disorders. **Clin Infect Dis**, v. 42, n. 4, p. 541-7, Feb 2006. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16421799> >.

⁶⁷ BAJAJ, J. S. Review article: potential mechanisms of action of rifaximin in the management of hepatic encephalopathy and other complications of cirrhosis. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 43 Suppl 1, p. 11-26, Jan 2016. ISSN 1365-2036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26618922> >.

⁶⁸ STERN, E. K.; BRENNER, D. M. Gut Microbiota-Based Therapies for Irritable Bowel Syndrome. **Clin Transl Gastroenterol**, v. 9, n. 2, p. e134, Feb 2018. ISSN 2155-384X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29446765> >.

- ⁶⁹ KOO, H. L.; DUPONT, H. L. Rifaximin: a unique gastrointestinal-selective antibiotic for enteric diseases. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 26, n. 1, p. 17-25, Jan 2010. ISSN 1531-7056. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19881343> >.
- ⁷⁰ DUPONT, H. L. Review article: the antimicrobial effects of rifaximin on the gut microbiota. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 43 Suppl 1, p. 3-10, Jan 2016. ISSN 1365-2036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26618921> >.
- ⁷¹ GANGARAPU, V. et al. Efficacy of rifaximin on circulating endotoxins and cytokines in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 27, n. 7, p. 840-5, Jul 2015. ISSN 1473-5687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26043290> >.
- ⁷² ABDEL-RAZIK, A. et al. Rifaximin in nonalcoholic fatty liver disease: hit multiple targets with a single shot. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 30, n. 10, p. 1237-1246, 10 2018. ISSN 1473-5687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30096092> >.
- ⁷³ DAPITO, D. H. et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. **Cancer Cell**, v. 21, n. 4, p. 504-16, Apr 2012. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22516259> >.
- ⁷⁴ YU, L. X.; SCHWABE, R. F. The gut microbiome and liver cancer: mechanisms and clinical translation. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 14, n. 9, p. 527-539, Sep 2017. ISSN 1759-5053. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28676707> >.
- ⁷⁵ MA, X. et al. Rifaximin is a gut-specific human pregnane X receptor activator. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 322, n. 1, p. 391-8, Jul 2007. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442842> >.
- ⁷⁶ JIN, Y. et al. Beneficial effects of Rifaximin in post-infectious irritable bowel syndrome mouse model beyond gut microbiota. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 33, n. 2, p. 443-452, Feb 2018. ISSN 1440-1746. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28573746> >.
- ⁷⁷ ODENA, G. et al. Rifaximin, but not growth factor 1, reduces brain edema in cirrhotic rats. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 17, p. 2084-91, May 2012. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22563196> >.
- ⁷⁸ TAMAOKI, S. et al. Development of an experimental rat model of hyperammonemic encephalopathy and evaluation of the effects of rifaximin. **Eur J Pharmacol**, v. 779, p. 168-76, May 2016. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26980242> >.
- ⁷⁹ ZHU, Q. et al. Intestinal decontamination inhibits TLR4 dependent fibronectin-mediated cross-talk between stellate cells and endothelial cells in liver fibrosis in mice. **J Hepatol**, v. 56, n. 4, p. 893-9, Apr 2012. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173161> >.

⁸⁰ TAO, X.; WANG, N.; QIN, W. Gut Microbiota and Hepatocellular Carcinoma. **Gastrointest Tumors**, v. 2, n. 1, p. 33-40, May 2015. ISSN 2296-3774. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26673641> >.

⁸¹ STEFANO, J. T. et al. Sorafenib prevents liver fibrosis in a non-alcoholic steatohepatitis (NASH) rodent model. **Braz J Med Biol Res**, v. 48, n. 5, p. 408-14, May 2015. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714891> >.

ANEXO

Composição da dieta hiperlipídica deficiente em colina:

RHOSTER



Dieta Hiperlipídica M deficiente em Colina

RH19576

Perfil Calórico	%	% kcal
Proteína	15,03	13,99
Carboidrato	58,5	54,49
Gordura	15,04	31,52
Dieta 4,3kcal/g	***	***

*Dieta Purificada para Indução de Obesidade e Esteatose Hepática.

*Produzida em Pellet macio - pacotes de 1kg

*Quantidade mínima 3kg

*Prazo de Entrega: 15 dias úteis

Ingredientes

Caseína Láctea, Amido de Milho, Amido Dextrinizado, Óleo de Soja, Gordura Animal, Colesterol Sigma, Celulose, Mix Mineral RH9502*, Mix Vitaminico RH9503**, Sacarose P.A., Tert-Butilhidroquinona (TBHQ) Sigma-Aldrich.

Mais Informações

*Mix Mineral AIN-93M

**Mix Vitaminico AIN-93

***Resultados calculados a partir da análise de um determinado lote fabricado.

Produzida em pellet ou pó

RHOSTER INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA.

APÊNDICE

Artigo científico produzido e publicado durante o período do mestrado:

Tonin Ferrari, J.; Ayres, R.; Ortiz Hammes, T.; Reverbel da Silveira, T.; & Uribe-Cruz, C. Experimental model of hepatic steatosis by fructose in adult zebrafish: A pilot study. *Clinical & Biomedical Research*, 38(2) (2018). Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/hcpa/article/view/77997>.