

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

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

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM MODELO DE CARCINOGENESE  
HEPÁTICA SECUNDÁRIA À DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO  
ALCOÓLICA TRATADA COM RIFAXIMINA**

**GABRIEL TAYGUARA SILVEIRA GUERREIRO**

**Dissertação de Mestrado**

**Porto Alegre/RS, Brasil**

**2020**

Tayguara Silvera Guerreiro, Gabriel

AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM MODELO DE CARCINOGENESE HEPÁTICA SECUNDÁRIA A DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA TRATADA COM RIFAXIMINA /

Gabriel Tayguara Silvera Guerreiro. -- 2020.

86 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, 2020.

1. Carcinoma hepatocelular. 2. Doença hepática gordurosa não alcoólica. 3. Esteato-hepatite não alcoólica. 4. Rifaximina. 5. Microbiota intestinal. I. Uribe-Cruz, Carolina, orient.  
II. Título.

CIP - Catalogação na Publicação

Gabriel Tayguara Silveira Guerreiro

Avaliação da microbiota intestinal em modelo de carcinogênese hepática secundária  
à doença hepática gordurosa não alcoólica tratada com rifaximina

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 obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Uribe-Cruz

Porto Alegre/RS, Brasil

2020

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Inacio e Janete, e aos meus irmãos, Bernardo, Inajara e Vanessa, por todo incentivo, amizade, e motivação. Obrigado por estarem sempre presentes.

À minha querida orientadora, Carolina Uribe-Cruz, pela confiança, carinho, disposição, paciência e suporte desde o início. Sua presença foi essencial para o meu crescimento como pesquisador. Meu mais sincero muito obrigado.

À querida amiga e pós-doc, Larisse Longo, por toda a disposição, ensinamentos, presença e convívio dentro e fora da rotina do laboratório. Tanto quanto minha orientadora, sua presença foi essencial para o meu crescimento como pesquisador. Meu imenso carinho e amizade.

À querida professora Valesca Dall Alba, por todo carinho e ensinamentos dentro da área da nutrição. A minha participação no ambulatório e nossas discussões sobre estudos agregaram muito. Aproveito para estender meu agradecimento aos colegas nutricionistas do ambulatório, carinho por nosso grupo.

À pesquisadora Jéssica Ferrari, pela amizade e por ter liderado o experimento, juntamente à Dr. Carolina Uribe e ao Dr. Mário Reis.

Ao Dr. Mário Reis, pela confiança e ensinamentos transmitidos, e ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de aprendizagem como aluno.

À CAPES, pela bolsa de auxílio financeiro, ao qual foi fundamental para a realização de minhas atividades como pesquisador, e ao FIPE/HCPA, ao qual foi o essencial financiamento de nossos estudos.

Aos queridos colegas de laboratório e centro de pesquisa experimental, ao qual alegraram e agregaram em meu convívio diário e momentos de descontração, sendo

nos almoços, *happy hours*, *pool parties* e churrascos. Em especial, ao Nataniel Ludwig e José Assumpção pelas sempre enriquecedoras discussões e conversas.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram ao meu crescimento pessoal e profissional e que fizeram possível a realização deste estudo.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	39
ABSTRACT .....	41
LISTA DE ABREVIATURAS.....	43
LISTA DE FIGURAS .....	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	47
2.1. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Carcinoma Hepatocelular .....	47
2.2. Eixo fígado-intestino: permeabilidade intestinal e microbiota.....	50
2.3. Permeabilidade Intestinal: <i>Tight junctions</i> .....	52
2.4. Microbiota.....	58
2.5. Modelos Animais de Carcinoma Hepatocelular.....	62
2.6. Rifaximina .....	63
3. JUSTIFICATIVA.....	70
4. QUESTÃO DE PESQUISA .....	71
5. HIPÓTESE.....	71
6. OBJETIVOS.....	71
6.1. OBJETIVO GERAL.....	71
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	71
7. ARTIGO ORIGINAL.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
8. CONCLUSÕES.....	72
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73

10.	PERSPECTIVAS .....	74
11.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76

## RESUMO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é uma complicação que pode ocorrer em casos de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Considerando que a rifaximina (RIF) é um antibiótico não absorvível altamente eficaz para o tratamento de várias doenças gastrointestinais e hepáticas, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da RIF em um modelo de CHC secundário à DHGNA. Três grupos de ratos *Sprigüe Dawley* foram analisados (n = 8/grupo); Grupo controle (CON): alimentados com dieta padrão e água; Grupo HCC: alimentados com uma dieta hiperlipídica deficiente em colina (DHDC) e água contendo dietilnitrosamina (DEN) (135 mg/L); e grupo HCC+RIF: alimentados com DHDC mais DEN e tratados com RIF a partir da 5ª semana. Após 16 semanas, os animais foram eutanasiados e suas amostras coletadas. No soro, foram realizadas análises bioquímicas; no tecido hepático, foram realizadas análises anatomopatológicas e de expressão gênica; no tecido intestinal, foram realizadas análises de expressão gênica; nas amostras de fezes, foram realizadas análises de diversidade e composição bacteriana. As expressões gênicas hepáticas de *Tnf- $\alpha$* , *Il10* e *Il1 $\beta$*  não mostraram diferença entre os três grupos, apesar de *Il6* mostrar um aumento significativo no grupo HCC+RIF comparado ao CON. A expressão gênica intestinal das *tight junctions* mostrou uma diminuição no *Ocln*, *F11r* e *Cldn4* no grupo HCC+RIF quando comparado ao CON. Na análise de alfa diversidade da microbiota, o número total de espécies foi semelhante entre os grupos (índice de Shannon), mas os animais do grupo HCC+RIF apresentaram níveis significativamente mais baixos de diversidade, considerando a riqueza baseada na abundância (Chao1). A análise de beta diversidade mostrou que os grupos HCC e HCC+RIF foram distintos do CON. Uma análise de tamanho do efeito

discriminante linear entre HCC e HCC+RIF revelou 12 gêneros diferencialmente abundantes entre eles. A RIF modula a microbiota intestinal, independentemente da permeabilidade intestinal, e isso pode estar relacionado à sua capacidade de atenuar o desenvolvimento de CHC relacionado à DHGNA.

**Palavras-chave:** Carcinoma hepatocelular; Doença hepática gordurosa não alcoólica; Esteato-hepatite não alcoólica; Rifaximina; Microbiota intestinal

## ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a complication that can occur in cases of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Considering that rifaximin (RIF) is a highly effective non-absorbable antibiotic for the treatment of various gastrointestinal and liver diseases, this study aims to evaluate the effects of RIF in a NAFLD-related HCC model. Three groups of Sprigüe Dawley rats were analyzed (n = 8/group); Control group (CON): fed a standard diet and water; HCC group: fed a choline-deficient high fat diet (CDHD) and drinking water containing diethylnitrosamine (DEN) (135 mg/L); and HCC+RIF group: fed with DHDC plus DEN and treated with RIF from the 5<sup>th</sup> week. After 16 weeks, the animals were euthanized and their samples collected. In serum, biochemical analyzes were performed; in liver tissue, anatomopathological and gene expression analyzes were performed; in intestinal tissue, gene expression analyzes were performed; in fecal samples, analyzes of bacterial diversity and composition were performed. The liver gene expressions of *Tnf- $\alpha$* , *Il10* and *Il1 $\beta$*  showed no difference between the three groups, although *Il6* showed a significant increase in the HCC+RIF group compared to the CON. The intestinal gene expression of the tight junctions showed a decrease in *Ocln*, *F11r* and *Cldn4* in the HCC+RIF group when compared to CON. In the analysis of alpha diversity of the microbiota, the total number of species was similar between the groups (Shannon index), but the animals in the HCC+RIF group had significantly lower levels of diversity, considering the richness based on abundance (Chao1). In the beta diversity analysis, the HCC and HCC+RIF groups were different from the CON. A size analysis of the linear discriminating effect between HCC and HCC+RIF revealed 12 differently abundant genera among them. RIF modulates the intestinal microbiota,

regardless of intestinal permeability, and this may be related to its ability to attenuate the development of NAFLD-related HCC.

**Keywords:** Hepatocellular carcinoma; Non-alcoholic fatty liver disease; Non-alcoholic steatohepatitis; Rifaximin; Gut microbiota

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica

EHNA – Esteato-hepatite não alcoólica

CHC – Carcinoma hepatocelular

TJ – do inglês *tight junctions*

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

TLR – do inglês *toll like receptors*

LPS – Lipopolissacarídeo

DEN – Dietilnitrosamina

DHDC – Dieta hiperlipídica deficiente em colina

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - História natural da DHGNA .....	48
Figura 2 – Representação simplificada da permeabilidade da barreira intestinal.....	53
Figura 3 – Esquema das estruturas de proteínas da barreira intestinal .....	54
Figura 4 – Mecanismo de ação da rifaximina .....	65
Figura 5 – Desenho experimental. ....	68

## 1. INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é um espectro de doenças hepáticas crônicas. Compreende desde a esteatose simples até esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), com importante presença de inflamação, podendo evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) (1,2).

O CHC é o sexto tipo de câncer mais prevalente e a terceira causa mais comum de mortalidade relacionada ao câncer no mundo (3,4). Após o desenvolvimento e diagnóstico do CHC, a seleção do tratamento apropriado é crucial para a avaliação da sobrevida do paciente. Existem diversas terapias que são utilizadas na prática clínica, a depender do caso clínico, no entanto a determinação da conduta terapêutica mais adequada é um processo complexo e assunto de controvérsias (5–8).

Microbiota refere-se a toda a população de microrganismos que coloniza um local específico (9). Embora o fígado não esteja em contato direto com a microbiota, ele possui fortes ligações anatômicas com o intestino. Dentro deste eixo fígado-intestino, a permeabilidade intestinal e a microbiota intestinal estão envolvidas em mecanismos pelos quais poderiam iniciar ou influenciar a progressão de doenças hepáticas, incluindo a DHGNA e o CHC (10,11).

Por outro lado, a rifaximina é um antibiótico oral de amplo espectro, pouco absorvido e semi-sintético. É eficaz para o tratamento de um vasto número de condições gastrointestinais e hepáticas, como a síndrome do intestino irritável, o supercrescimento bacteriano do intestino delgado e a prevenção de encefalopatia hepática recorrente (12), além de efeito antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas aeróbias e anaeróbias, e um consequente efeito

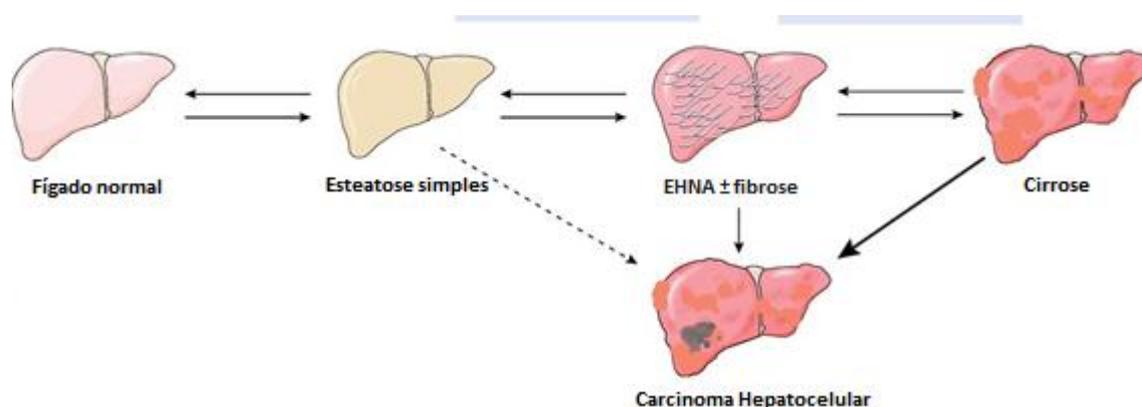
modulador sobre a microbiota intestinal, que poderia proteger contra a progressão da DHGNA e o desenvolvimento do CHC.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Carcinoma Hepatocelular**

A DHGNA é um espectro de doenças hepáticas crônicas, caracterizada histologicamente pela presença de mais de 5% de hepatócitos esteatóticos, com consumo alcoólico inferior a 30 g/dia em homens e 20 g/dia em mulheres (1). Compreende desde a esteatose simples até esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), com importante presença de inflamação, podendo evoluir para cirrose e CHC (13) (Figura 1). Os estádios iniciais da doença podem ocasionar inflamação crônica e reparação compensatória do tecido, onde posteriormente ocorre o acúmulo de colágeno e cicatriz (desenvolvimento de fibrose e/ou cirrose). A cirrose está associada à perda progressiva da função e constitui a base para o desenvolvimento do CHC, sendo um importante fator de risco, apesar de o tumor poder se desenvolver em fígado não cirrótico também (14,15). A DHGNA é assintomática até o surgimento de complicações em seu estágio final, podendo estas alterações se tornarem irreversíveis, quando o transplante hepático passa a ser a única opção terapêutica (16). Assim, a identificação dos fatores de risco, diagnóstico precoce e intervenções são fundamentais para o manejo clínico da doença. Nos últimos anos houve um aumento na prevalência de DHGNA paralelamente ao aumento mundial de diabetes e síndrome metabólica, no entanto esta doença também pode ocorrer em indivíduos magros e não diabéticos (17). A prevalência mundial de DHGNA é estimada em 24%, e na América do Sul em torno de 30,5% (18). Na América do Norte e Europa, a DHGNA geralmente é acompanhada de obesidade central (cerca de 83% dos pacientes), mas na Ásia, há uma porcentagem considerável de pacientes com 'EHNA magra', que têm um índice de massa corporal eutrófico (19).

O tratamento da DHGNA permanece controverso, entretanto está estabelecido que a mudança no estilo de vida, com perda de peso, controle dietético e atividade física, é essencial no controle da doença (16). Atualmente, a DHGNA é considerada uma das formas mais comuns de hepatopatia e reconhecida como importante causa para o aumento das taxas de morbimortalidade relacionada ao fígado (20).



**Figura 1 - História natural da DHGNA.** A doença hepática gordurosa não alcoólica se inicia com o desenvolvimento de esteatose, podendo progredir para esteato-hepatite não alcoólica, ou até formas mais graves como cirrose e carcinoma hepatocelular (21).

O mecanismo detalhado da progressão da DHGNA à EHNA não foi completamente elucidada, mas a “hipótese dos dois *hits*” foi proposta (22). De acordo com essa hipótese, o primeiro *hit* é a resistência à insulina. Esta aumenta a lipólise e o nível de ácidos graxos livres no soro. A elevação destes ácidos graxos livre leva ao fornecimento de triglicerídeos do fígado para os órgãos periféricos, que induzem o aumento da síntese de lipídios. Estes fatores levam ao armazenamento excessivo de lipídios no fígado, estabelecendo a esteatose. Enquanto isso, o acúmulo de triglicerídeos promove o aparecimento do segundo *hit*: estresse oxidativo. Este leva à esteato-hepatite devido ao aumento do nível de oxidação de ácidos graxos. O estresse oxidativo desencadeia peroxidação lipídica, liberação de

citocinas pró-inflamatórias e dano mitocondrial, que são os mecanismos celulares envolvidos na formação de dano hepatocelular, inflamação e fibrose na patologia da EHNA (22–24).

A progressão do CHC relacionado à EHNA é um processo complexo e multifatorial. Inclui vários fatores de risco, como instabilidade genômica, obesidade e/ou diabetes (25). O envolvimento dos mecanismos relacionados a esses fatores parece causar alterações em algumas vias de sinalização comuns que levam à transição de hepatócitos displásicos ao CHC. Atualmente, os mecanismos propostos incluem vias genéticas, metabólicas, imunológicas e endócrinas, que subsequentemente ativam mecanismos oncogênicos (24).

Assim, o CHC é o sexto tipo de câncer mais prevalente e a terceira causa mais comum de mortalidade relacionada ao câncer no mundo (3,4). O oncologista britânico Willis definiu o câncer como “massa anormal de tecido, cujo crescimento ultrapassa e não é coordenado com o dos tecidos normais e persiste da mesma maneira excessiva depois da interrupção dos estímulos que deram origem à mudança” (26). No Brasil, a incidência do CHC varia de 3,3% - 6,0% a cada 100.000 pessoas por ano e este índice é semelhante às taxas de mortalidade, devido ao elevado número de recorrência intra-hepática, metástase à distância e a falta de tratamento efetivo para os casos diagnosticados em estágio avançado (8,27,28). Entre as principais etiologias estão: infecção viral crônica pelo vírus da hepatite B e hepatite C, cirrose, alterações genéticas, EHNA, hemocromatose hereditária e a deficiência de  $\alpha$ 1-antritripsina. Entre os fatores de risco importantes estão o diabetes *mellitus* tipo II, obesidade, síndrome metabólica e DHGNA (8,29).

Quando comparamos os pacientes com CHC relacionado à EHNA, estes são principalmente brancos, masculinos e significativamente mais velhos que pacientes com CHC de outras origens. Além disso, como esperado, pacientes com DHGNA têm aumento de comorbidades cardiovasculares resultantes de síndrome metabólica coexistente e complicações do diabetes em comparação com pacientes com CHC sem DHGNA (30). Como já mencionado, os mecanismos aos quais a doença se manifesta não se limitam só ao fígado, mas podem ser sistêmicos e/ou intestinais também.

## **2.2. Eixo fígado-intestino: permeabilidade intestinal e microbiota**

O intestino e o fígado são órgãos importantíssimos na absorção e metabolismo de nutrientes, sendo que os ácidos biliares, drogas e toxinas sofrem grande circulação êntero-hepática. Dada sua posição anatômica, o fígado recebe aproximadamente 70% de seu fornecimento sanguíneo a partir do intestino através da veia porta, por isso é considerado a primeira linha de defesa contra antígenos derivados do intestino, tais como bactérias e subprodutos bacterianos (31). Assim, há alguns anos, a literatura vem evidenciando a existência de um eixo fígado-intestino (32). Embora o fígado não esteja em contato direto com a microbiota, suas fortes ligações anatômicas com o intestino fazem que esta tenha uma grande influência. O transporte fisiológico do sangue rico em nutrientes do intestino para o fígado é acompanhado pela exposição em baixo grau dos metabólitos e produtos derivados da microbiota intestinal, passando pela barreira intestinal multinível altamente eficiente e seletiva (10). Dentro deste eixo, a permeabilidade intestinal e a microbiota intestinal estão envolvidas em mecanismos pelos quais poderiam iniciar ou influenciar a progressão de doenças hepáticas (11).

Microbiota refere-se a toda a população de microrganismos que coloniza um local específico, como bactérias, vírus e eucariotos unicelulares (9). Em diferentes locais do trato gastrointestinal existem diferentes composições e quantidades de microrganismos, assim no estômago e duodeno se estimam  $10^3$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL, no intestino delgado entre  $10^4$  UFC/mL -  $10^7$  UFC/mL e no intestino grosso entre  $10^{11}$  UFC/mL -  $10^{12}$  UFC/mL, este último onde os níveis mais altos são encontrados (33). Em condições normais, o hospedeiro e a microbiota intestinal se beneficiam um do outro, estado conhecido como simbiose. Por outro lado, um distúrbio na estrutura ou função da microbiota que resulta em uma proporção anormal de espécies bacterianas comensais e patogênicas é chamado de disbiose. Alterações na microbiota intestinal podem ocorrer por diversos fatores como a alimentação, idade, peso corporal, uso de medicamentos, presença de doenças hepáticas, *etc* (11,31,33–35).

A disbiose leva a um aumento na permeabilidade intestinal que resulta na translocação microbiana, que é definida como a migração de microrganismos viáveis ou produtos bacterianos (lipopolissacarídeos bacterianos, peptidoglicanos e lipopeptídeos) do lúmen intestinal para outros locais extra-intestinais. A translocação bacteriana ocorre fisiologicamente e desempenha importante papel na patogênese e progressão das doenças hepáticas crônicas, incluindo a cirrose hepática, através de mecanismos como disbiose intestinal, aumento da permeabilidade intestinal e piora da imunidade intestinal (36–39). O indivíduo saudável, com um sistema imunológico não comprometido, é capaz de eliminar as bactérias translocadas. Já em presença de disbiose intestinal e ruptura da barreira intestinal, ocorre o aumento da translocação e produtos bacterianos, o que acaba interrompendo a tolerância imunológica e estimulando as células hepáticas a desencadear uma resposta imune

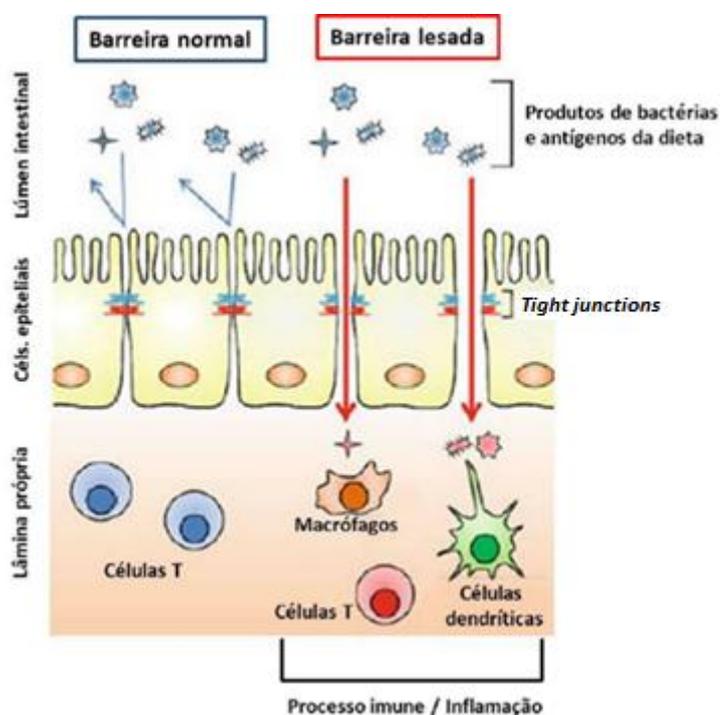
com o objetivo de atuar na eliminação destes produtos. O reconhecimento destes produtos acontece por intermédio dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *patterns recognition receptors*), dentre eles destacam-se os receptores *Toll Like* (TLRs, do inglês *toll like receptors*) e os receptores do tipo NOD (NLRs, do inglês *NOD-like receptors*), responsáveis por respostas imunes inatas e adaptativas que protegem o hospedeiro e mantêm a homeostase intestinal (11).

### **2.3. Permeabilidade Intestinal: *Tight junctions***

Os termos “permeabilidade intestinal” e “barreira intestinal” descrevem dois aspectos diferentes da mesma estrutura anatômica: a parede do epitélio intestinal (40).

Permeabilidade intestinal pode ser definida como uma característica mensurável da barreira intestinal, e diz respeito à entrada de componentes originalmente pertencentes à luz intestinal para dentro da lamina própria do intestino. A regulação da permeabilidade da barreira intestinal possui dois elementos centrais, que estabilizam e mantêm a sua função de barreira epitelial. Primeiro, a capacidade de renovação controlada das células, que é obtida através de um equilíbrio bem regulado entre proliferação celular e apoptose, e em segundo lugar, a presença de junções intercelulares efetivas, que constituem uma complexa arquitetura celular, e interagem com os demais componentes do epitélio intestinal, formando uma barreira semipermeável (40,41). A permeabilidade intestinal normal é definida como uma permeabilidade estável encontrada em indivíduos saudáveis, sem sinais de intoxicação, inflamação ou funções intestinais prejudicadas. Já a permeabilidade intestinal prejudicada é definida como sendo alterada de forma não transitória em

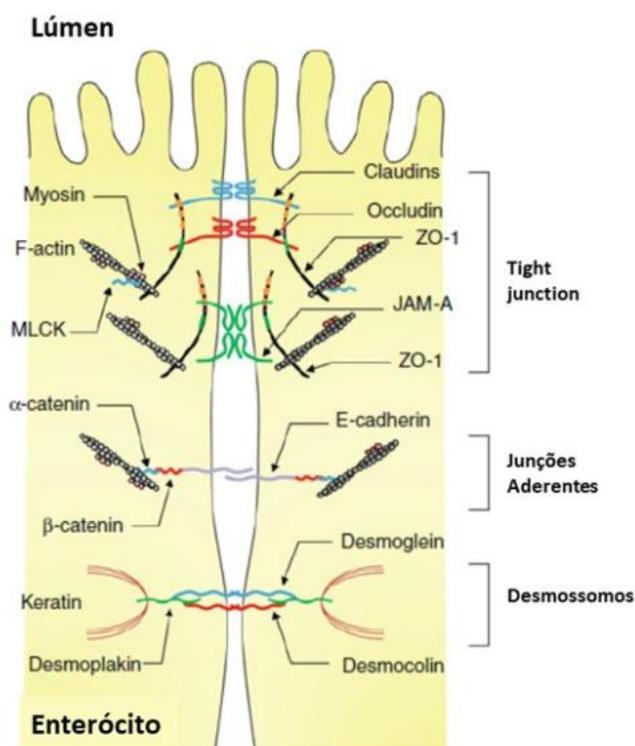
comparação com a permeabilidade normal, levando a uma perda da homeostase intestinal e presença de deficiências funcionais (42) (Figura 2).



**Figura 2 – Representação simplificada da permeabilidade da barreira intestinal.** O epitélio intestinal fornece uma barreira física às bactérias, toxinas e antígenos luminiais. A barreira é organizada por diferentes componentes, incluindo as TJs. As TJs regulam as passagens paracelulares de íons, solutos e água entre as células adjacentes. As macromoléculas nocivas luminiais não conseguem penetrar no epitélio devido à barreira das TJs; no entanto, o comprometimento da barreira das TJs permite a passagem de moléculas nocivas, o que pode induzir a ativação excessiva de células imunes da mucosa e inflamação. Portanto, os defeitos da barreira intestinal estão associados ao início e desenvolvimento de várias doenças intestinais e sistêmicas. Adaptado de (43). TJ – *tight junctions*.

Por sua parte, a barreira intestinal cumpre a função de barreira física e é composta por diversas moléculas: o espaço paracelular é selado por *tight junctions* (TJ), que regulam o fluxo de íons de água e pequenas moléculas através das claudinas e outras proteínas no complexo juncional. Abaixo das TJ estão as junções de aderência, que são importantes na sinalização celular e na restituição epitelial, bem como os desmossomos que suportam a estabilidade epitelial (40) (Figura 3).

Em nível molecular, as TJ são constituídas por grupos de proteínas transmembranas cujos domínios extracelulares formam uma barreira seletiva por interações com as células adjacentes: claudinas, ocludinas, JAM (do inglês, *junctional adhesion molecules*) e a zônula ocludente (ZO) (43).



**Figura 3 – Esquema das estruturas de proteínas da barreira intestinal.** As junções intercelulares das células epiteliais intestinais são seladas por diferentes complexos proteicos, incluindo TJs, junções de aderência e desmossomos. As TJs, complexos de múltiplas proteínas, localizam-se nas extremidades apicais das membranas laterais das células epiteliais intestinais, e consistem em proteínas de estrutura transmembrana e intracelular. As alças extracelulares das proteínas transmembrana (occludina, claudinas, JAMs e tricelulina) criam uma barreira permeável seletiva nas vias paracelulares por meio de interações com células adjacentes. Os domínios intracelulares das proteínas transmembrana interagem com as proteínas do esqueleto intracelular, como as proteínas ZO, que ancoram as proteínas transmembrana ao citoesqueleto de actina. As AJs, juntamente com os desmossomos, fornecem fortes ligações adesivas entre as células epiteliais e também a comunicação intercelular, mas não determinam a permeabilidade paracelular. Adaptado de (43). TJ – Tight Junctions, JAM - do inglês, *junctional adhesion molecules*, ZO - zônula ocludente.

As claudinas medeiam as adesões e vedam os espaços paracelulares (40). São divididas de forma funcional entre claudinas apertadas, com função de vedação como as claudinas-1 e -4; e claudinas gotejantes, com função de regulação da perda

de água e eletrólitos, como a claudina-2. Embora essas distinções tenham sido propostas, a função geral de uma claudina depende do complemento de outras claudinas expressas em uma TJ (44). Já as ocludinas ligam células adjacentes ao citoesqueleto de actina (42). As JAMs pertencem à superfamília das imunoglobulinas. A F11r, do grupo das JAMs, é expressa por diferentes tipos celulares, incluindo as células epiteliais, endoteliais e células do sistema imunológico, como de alguns grupos de leucócitos. Está envolvida em uma variedade de processos fisiológicos, incluindo a regulação da função de barreira epitelial e regulação da homeostase imune e inflamação. (45). As proteínas ZO, entre elas a ZO-1, se conectam com as proteínas transmembranas ao citoesqueleto de actina, sendo esta interação das proteínas TJ com o citoesqueleto necessária para a manutenção da integridade estrutural da função de barreira do epitélio intestinal (46,47). É importante ressaltar que a ausência de proteínas ZO nas células epiteliais resulta na ausência de selo de TJ e possível perda da função de barreira epitelial, o que é atribuído ao seu papel na montagem de claudinas nas TJs para permitir sua interação funcional e formação da cadeia de TJ (48).

Portanto, a função da barreira intestinal é de evitar o acesso de patógenos, toxinas e antígenos a partir do lúmen intestinal para a lâmina própria, atingindo os tecidos da mucosa e corrente sanguínea, ativando moléculas pró-inflamatórias (42). A capacidade de contenção da barreira intestinal é considerada dinâmica, pois pode ser impactada por fatores como dieta, estilo de vida (consumo alcoólico, tabagismo, estresse), doenças (doença inflamatória intestinal, doença celíaca, DHGNA) e uso de medicamentos (49). Como já mencionado, a permeabilidade intestinal alterada, e consequente exposição do fígado a níveis mais altos de produtos inflamatórios bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS) e metabólitos bacterianos tóxicos,

pode estar envolvida na patogênese da DHGNA-EHNA, doenças que podem evoluir ao CHC (36,50).

Em estudos com DHGNA, Miele *et al* investigaram a permeabilidade intestinal em pacientes com DHGNA. Através de teste de imuno-histoquímica da expressão da ZO-1 duodenal, foi demonstrado que pacientes com DHGNA têm menor integridade de barreira intestinal, têm aumento da permeabilidade intestinal avaliada através de teste de excreção de tetraacetato de etileno-diamina e cromo-51, e também prevalência aumentada de supercrescimento bacteriano do intestino delgado conforme o aumento da gravidade da DHGNA em comparação aos controles saudáveis. Estes resultados indicam o importante papel destes mecanismos na patogênese da deposição de gordura hepática (51). Giorgio *et al* avaliaram a permeabilidade intestinal em crianças com DHGNA e crianças controles saudáveis através de teste com lactulose e manitol, onde além de a permeabilidade ser maior no grupo com DHGNA se comparado aos controles saudáveis, foi maior ainda nas crianças com EHNA se comparado às com esteatose, indicando uma correlação entre maior aumento da permeabilidade intestinal e a gravidade da DHGNA (52). Rahman *et al* investigaram tanto um lado experimental quanto um clínico. Camundongos *knock out* para *F11r* e controles sem a mutação foram alimentados com dieta hiperlipídica rica em frutose por 8 semanas, onde os camundongos *knock out* para *F11r* desenvolveram características histológicas e patológicas de EHNA grave, incluindo esteatose, inflamação lobular, balonização hepatocelular e fibrose, enquanto os camundongos controle desenvolveram apenas esteatose moderada, sugerindo que a barreira intestinal prejudicada contribui para a progressão mais rápida da DHGNA. No lado clínico do estudo, foram avaliados tecidos intestinais biopsiados de pacientes com DHGNA e controles saudáveis, e

foram encontrados níveis de JAM-A significativamente mais baixos na mucosa intestinal dos pacientes com DHGNA em comparação aos controles. Esta diminuição da expressão de JAM-A na mucosa intestinal foi correlacionada com o aumento da inflamação da mucosa nestes pacientes com DHGNA. Juntos, esses dados sugerem que a barreira intestinal prejudicada pode desempenhar um importante papel na patogênese da DHGNA (53).

Já em estudos com CHC, Orbán *et al* avaliaram a expressão gênica de ZO-1 e ocludina em tecidos hepáticos de pacientes com CHC e de controles saudáveis, e encontraram menores níveis tanto de ZO-1 quanto de ocludina nos pacientes com CHC comparados aos controles, indicando que alterações na composição das TJ estão correlacionadas com a hepatocarcinogênese (54). Bouchagir *et al* avaliaram algumas *tight junctions* em hepatectomias de pacientes com CHC, onde claudina-4 foi encontrada menor expressa se comparado aos tecidos não neoplásicos e tecidos de controles saudáveis, correlacionada com tumores de alto grau, o que significa que há uma regulação negativa da molécula com uma crescente diferenciação do tumor, além de esta diminuição da claudina-4 estar associada a taxas de recorrência aumentadas e baixas taxas de sobrevida, o que poderia sugerir que a expressão de claudina-4 também pode ser útil como marcador prognóstico para sobrevida global e taxas de recorrência, indicando seu papel importante no desenvolvimento do CHC (55). Nagai *et al* avaliaram tecido hepático de pacientes com CHC submetidos à ressecção cirúrgica, onde demonstraram que a baixa expressão de ZO-1 foi associada à baixa sobrevida em pacientes com CHC após ressecção hepática (56). Quando comparado pacientes com cirrose, com ou sem CHC, e controles saudáveis, Ponziani *et al* encontraram menores níveis séricos de ZO-1 nos pacientes cirróticos

(57). Juntos, estes estudos sugerem um papel patogênico da ruptura das proteínas TJ também no CHC (58).

#### **2.4. Microbiota**

A disbiose e o aumento da permeabilidade intestinal ocasionam maior exposição hepática a microrganismos e produtos microbianos que impulsionam os danos através da interface do eixo fígado-intestino (36). A disbiose altera inúmeros processos que afetam a progressão das doenças hepáticas crônicas e consequente desenvolvimento de CHC, como inflamação, fibrogênese, regeneração e imunidade, tanto em modelos experimentais quanto em pacientes (10,34,59–62). Estes estudos nos indicam que a gravidade da DHGNA está associada à disbiose intestinal, e a análise da microbiota intestinal pode ser uma forma interessante de prever e tratar DHGNA.

Quando falamos em estudos que avaliam a microbiota intestinal em doenças hepáticas, a maioria são estudos com não mais de 100 pacientes (34,35,60,62–64) e que como grupo controle, utilizam indivíduos saudáveis ou pacientes com alguma doença hepática similar ou em estágio inferior do que os pacientes alvos do estudo. A avaliação é feita através de amostras de fezes, onde o DNA bacteriano é extraído, e uma região conservada do gene 16S rRNA bacteriano é amplificada, e sequenciada. Os dados de sequenciamento são processados e as análises da diversidade bacterianas são baseadas no grau de similaridade entre sequências do gene 16S rRNA, as quais são agrupadas em unidades taxonômicas operacionais através da bioinformática. Os níveis de classificação biológica estudados geralmente são filo, família e gênero.

Em estudos clínicos, Zhu *et al.* relataram que a microbiota rica no gênero *Escherichia*, responsável pela produção de etanol, podem ser um fator de risco para progressão da EHNA, sugerindo importante conexão entre a microbiota e a saúde hepática (35). Por sua parte, Shen *et al.* encontraram que pacientes com DHGNA tinham menor diversidade de microbiota intestinal e menor abundância de *Prevotella* se comparado aos controles saudáveis, o que poderia levar a uma produção menor de ácidos graxos de cadeia curta no intestino, tornando a mucosa intestinal mais suscetível a danos pelos metabólitos de bactérias patogênicas em adultos. Posteriormente, eles investigaram subgrupos de pacientes com EHNA e observam que apresentaram maior abundância do gênero *Blautia* e família *Lachnospiraceae*, gêneros envolvidos com inflamação intestinal. Outro subgrupo de pacientes com EHNA e com fibrose significativa apresentou maior abundância do gênero *Escherichia Shigella*, gênero produtor de etanol, o que pode levar ao enfraquecimento da barreira intestinal, e família *Enterobacteriaceae* em comparação com aqueles com fibrose F0/F1. Os resultados indicam que alterações em alguns microrganismos específicos da microbiota intestinal podem estar envolvidas na progressão da DHGNA (60). Boursier *et al.* avaliaram pacientes com DHGNA, com ou sem EHNA, estratificados em fibrose F0/F1 ou  $F \geq 2$ , encontrando que a abundância de *Bacteroides* e *Ruminococcus* foram associadas independentemente em pacientes com EHNA com fibrose  $F \geq 2$ . Ou seja, a gravidade da DHGNA está associada à disbiose intestinal e a uma mudança na função metabólica da microbiota intestinal, adicionando informações aos preditores clássicos de gravidade da DHGNA e sugerindo um possível novo alvo para terapias (62).

Quando olhamos especificamente ao CHC, também encontramos estudos associando a disbiose à hepatocarcinogênese. Realizando uma revisão de estudos

que utilizaram modelos animais, encontramos que Loo *et al.* induziram hepatocarcinogênese em camundongos com modelo misto utilizando dieta hiperlipídica e dimetilbenz [a] antraceno (DMBA) para avaliar a microbiota, e relataram que a translocação hepática do ácido lipoteicóico, produto microbiano intestinal induzido pela obesidade, cria um microambiente promotor de tumor para o CHC. Esse resultado indicou a importância da microbiota intestinal no desenvolvimento de CHC associado à obesidade (65). Zhang *et al* avaliaram as diferenças na abundância de alguns gêneros e espécies em um modelo de disbiose intestinal e os resultados indicaram que a manutenção de um equilíbrio da microbiota intestinal e a proteção da mucosa intestinal pode ser benéfica na prevenção do desenvolvimento de CHC (66). Yoshimoto *et al*, em modelo de CHC, relataram que a dieta rica em gordura alterava a composição da microbiota intestinal, resultando em aumento da produção de ácido desoxicólico, um ácido biliar secundário e subproduto metabólico da microbiota intestinal conhecida por causar danos ao DNA. A circulação entero-hepática do ácido desoxicólico provocou aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e fatores promotores de tumores no fígado que promovem o CHC por exposição a um carcinogênico químico (DMBA). A redução de bactérias intestinais e consequente diminuição da produção do ácido desoxicólico evitam com eficiência o desenvolvimento de CHC em camundongos obesos, sugerindo importante papel da microbiota na hepatocarcinogênese (67). Yamada *et al* induziram CHC somente com dieta hiperlipídica, e trataram alguns animais com antibióticos, suprimindo sua microbiota intestinal e reduzindo o acúmulo de ácidos biliares secundários sugerindo o papel da microbiota intestinal na conversão de ácidos biliares primários em ácidos biliares secundários, e consequentemente na hepatocarcinogênese (68).

Ainda revisando os estudos de microbiota e CHC, mas agora em pacientes, pesquisadores avaliaram a microbiota intestinal de pacientes cirróticos com ou sem CHC, e relataram que o grupo cirrose com CHC apresenta maior crescimento da espécie *Escherichia coli*, sendo este microrganismo associado aos efeitos pró-inflamatórios do LPS no fígado, desta forma contribuindo à hepatocarcinogênese (63). Gêneros microbianos produtores de butirato, importante regulador do metabolismo energético bacteriano e de saúde intestinal, se encontram diminuídos em pacientes cirróticos com CHC. Já os gêneros que produzem LPS, associado com maior produção de citocinas inflamatórias e dano inflamatório e oxidativo no fígado, se encontram aumentados nos pacientes cirróticos com CHC em comparação ao controle (69). Ponziani *et al* avaliaram a microbiota de pacientes com cirrose com ou sem CHC, e o grupo com CHC apresentou maior abundância do filo *Bacteroidetes*, das famílias *Bacteroidaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Gemellaceae*, dos gêneros *Phascolarctobacterium*, *Enterococo*, *Streptococcus*, *Gemella*, *Bilophila* e menor abundância das famílias *Verrucomicrobiaceae* e *Bifidobacteriaceae* e dos gêneros *Akkermansia*, *Bifidobacterium*, *Dialister*, *Collinsella* e *Adlercreutzia* em comparação ao grupo com cirrose, mas sem CHC. Estes resultados sugerem que em pacientes com DHGNA e cirrose, o perfil da microbiota intestinal está significativamente correlacionado e pode contribuir no processo de hepatocarcinogênese (64). Estas alterações características da microbiota intestinal no CHC, indicam alguns candidatos bacterianos cruciais que podem contribuir para o desenvolvimento à hepatocarcinogênese, e sugerindo que a investigação da microbiota pode melhorar ainda mais o valor diagnóstico desta doença.

## 2.5. Modelos Animais de Carcinoma Hepatocelular

As pesquisas experimentais contribuem muito para o entendimento dos mecanismos pelos quais as doenças se manifestam e para os testes com possíveis tratamentos para estas doenças.

Os modelos experimentais para o desenvolvimento do CHC incluem a utilização de agentes hepatotóxicos, tipos específicos de dieta ou um modelo misto com a combinação de ambos. Os modelos de CHC por indução química se assemelham às etapas da carcinogênese humana, sendo utilizadas substâncias cancerígenas indutoras, dentre os principais utilizados estão o tetracloreto de carbono (70) e a dietilnitrosamina (DEN) (71). A DEN é um potente alquilante do DNA e provoca alterações genéticas profundas nas células hepáticas. No fígado, a DEN é metabolizada 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 à DHGNA, devido à diversidade do espectro da doença nos pacientes, além das diferentes características de interações moleculares e características histológicas da doença (72,73).

Dentre os modelos dietéticos, são comumente utilizadas: dieta rica em frutose (74), dieta hiperlipídica (75) e dieta hiperlipídica deficiente em colina (76). Este último modelo de desenvolvimento do CHC, requer um período relativamente longo para produzir a doença, cerca de 50 semanas (77). Espera-se que o modelo ideal de CHC secundário à DHGNA mimetize o que ocorre na doença com os seres humanos: excesso de calorias na alimentação, associado à obesidade, resistência à insulina e dislipidemia, como o modelo demonstrado por Asgharpour *et al.* (78). Na dieta hierlipídica pura, há o consumo de 45% a 75% de calorias provenientes de

lipídeos ou colesterol. 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 e dieta hiperlipídica deficiente em colina (DHDC). Todas essas dietas podem variar em teor de gordura e também podem ter nutrientes enriquecidos, como sacarose e frutose (79). 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, podendo chegar a modelos de 12 meses (72,80). Buscando um modelo de CHC secundário à DHGNA em um período mais curto de indução, um grupo de pesquisa da Universidade de São Paulo desenvolveu 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 esteatose simples para EHNA, cirrose e progressão ao CHC, num período de 16 semanas (81,82). Em Stefano *et al*, foi relatado que em 6 semanas de modelo com DHDC e DEN em ratos *Sprague Dawley* já há desenvolvimento de EHNA com fibrose (83).

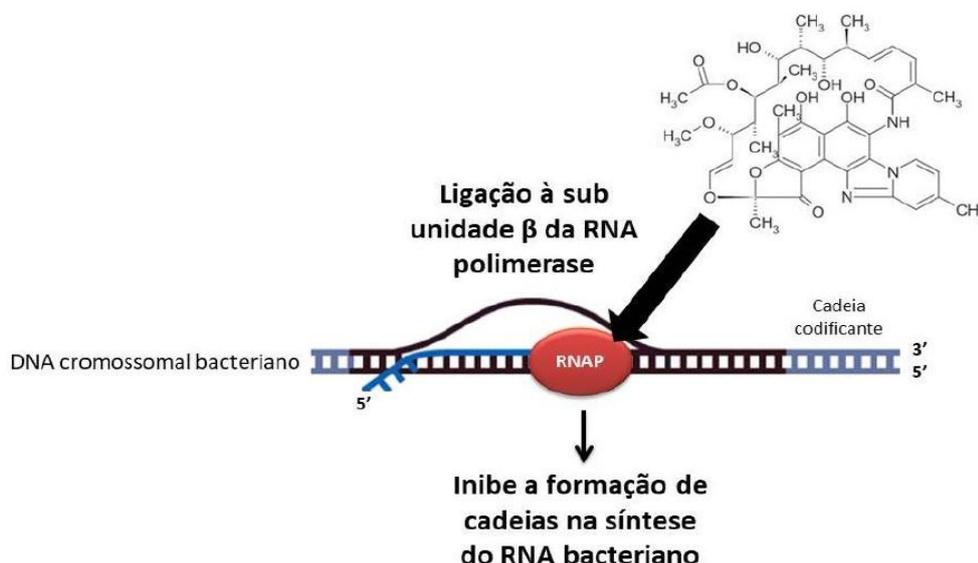
## **2.6. Rifaximina**

Após o desenvolvimento e diagnóstico do CHC, a seleção do tratamento apropriado é crucial para a avaliação da sobrevida do paciente. Existem diversas terapias que são utilizadas na prática clínica, a depender do caso clínico, considerando fatores como a extensão do tumor, presença de comorbidades,

gravidade da disfunção hepática e a disponibilidade de opções de tratamento entre os centros médicos. Dentre estas terapias estão: ressecção cirúrgica, radiofrequência, ablação química, sorafenib e o transplante hepático. No entanto, a determinação da conduta terapêutica mais adequada é um processo complexo, assunto de controvérsias (5–8), e ainda necessário mais estudos com intervenções. Entre estas possíveis intervenções, estão os antibióticos.

Além do efeito sobre cepas bacterianas específicas, o tratamento com antibióticos diminui a riqueza taxonômica, a diversidade e a uniformidade da comunidade microbiana intestinal, produzindo uma mudança para um estado alternativo diferente do estado inicial. Essas alterações parecem se recuperar após o final da administração dos antibióticos, no entanto, a composição microbiana intestinal não retorna exatamente para a condição de antes do tratamento, sendo então uma microbiota semelhante, mas não idêntica à original (84). Portanto, duas propriedades principais dos antibióticos devem ser reconhecidas: o efeito clássico contra determinados microrganismos e patógenos, que é a principal indicação para uso na prática clínica, e a modulação da microbiota intestinal comensal, o que acaba sendo um efeito colateral. Embora as consequências dessa última característica no hospedeiro ainda não sejam claras, a redução de bactérias benéficas pode causar a perda da influência favorável exercida pela microbiota intestinal na saúde humana. Logo, se suporia um efeito prejudicial dos antibióticos na ecologia intestinal. No entanto, este não é o caso de todos os antibióticos: descobertas recentes apontaram que a rifaximina pode modular positivamente a microbiota intestinal. Essa característica peculiar poderia diferenciar a rifaximina de outros antibióticos sistêmicos (85).

Por sua parte, a rifaximina é um antibiótico oral de amplo espectro, pouco absorvido e semi-sintético, proveniente da rifamicina, que surgiu na Itália no ano de 1987. Teve aprovação pela *Food and Drug Administration* em 2004 e entrou no mercado americano direcionado ao tratamento da diarreia, sendo que a partir do ano seguinte começou a atuar também no tratamento da encefalopatia hepática. Seu mecanismo de ação se resume em inibir a síntese de RNA pela ligação à subunidade  $\beta$  da RNA polimerase dependente de DNA bacteriano (12,86) (Figura 4).



**Figura 4 – Mecanismo de ação da rifaximina.** Atua inibindo a síntese de RNA bacteriano através da ligação à subunidade  $\beta$  da RNA polimerase dependente de DNA bacteriano (22, traduzido).

Uma revisão relatou que a rifaximina é eficaz para o tratamento de um vasto número de condições gastrointestinais e hepáticas, como a diarreia do viajante, o inchaço funcional, a síndrome do intestino irritável, o supercrescimento bacteriano do intestino delgado e a prevenção de encefalopatia hepática recorrente, e concluiu que a absorção sistêmica extremamente baixa, o excelente perfil de segurança e a resistência cruzada limitada são vantagens distintas deste medicamento, além da

eficácia comprovada em várias condições gastrointestinais e hepáticas (12). Em pacientes cirróticos, o tratamento com rifaximina foi significativamente associado com sobrevida global prolongada e redução dos riscos de peritonite bacteriana espontânea, sangramento de varizes e encefalopatia hepática recorrente (88,89). A rifaximina tem um forte efeito antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas aeróbias e anaeróbias, incluindo vários patógenos como *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae* e *Clostridium difficile* (90), logo é de se esperar que ela tenha algum impacto sobre a microbiota intestinal.

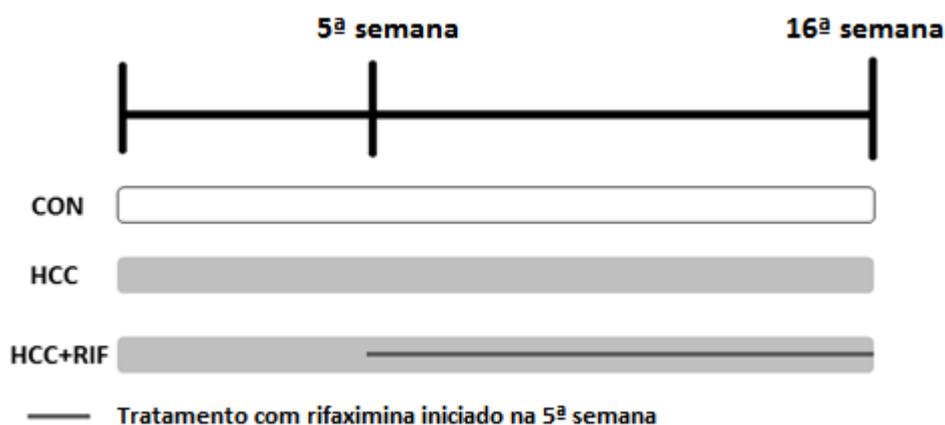
Tanto em estudos experimentais quanto clínicos, está descrito que há uma modulação potencialmente positiva da microbiota intestinal após o tratamento com rifaximina em doenças gastrointestinais, como a doença inflamatória intestinal e a síndrome do intestino irritável (91–94).

Em estudo experimental com modelo de CHC induzido por DEN e tetracloreto de carbono, Dapito *et al.* induziram a esterilização intestinal com um coquetel de antibióticos, e notaram uma diminuição importante no número e tamanho dos tumores quando comparado ao grupo que não recebeu a esterilização de sua microbiota, sugerindo a importância da microbiota intestinal para o desenvolvimento de CHC e possível uso de antibióticos como tratamento (95). Em estudos clínicos com doenças hepáticas, no estudo piloto com 15 pacientes com EHNA confirmados por biópsia e aminotransferases elevadas, o tratamento com rifaximina em dose de 400 mg duas vezes ao dia por 6 semanas não demonstrou diferença para nível de alanina aminotransferase, citocinas inflamatórias, captação periférica de glicose, sensibilidade insulínica hepática e conteúdo lipídico hepático. Mas há de se destacar que quando avaliada a microbiota destes pacientes, houve diferença significativa para alguns gêneros (embora não tenham sido comuns a todos os pacientes), mas

não houve diferença na abundância relativa de filos (96). Em pacientes com cirrose descompensada com encefalopatia hepática, o tratamento com rifaximina foi associado à melhora da função cognitiva e endotoxemia, que foi relacionada com uma diminuição significativa da família *Veillonellaceae* e aumento na abundância da família *Eubacteriaceae* (97). Ponziani *et al* avaliaram a microbiota intestinal de pacientes tratados com rifaximina em doses de 400 mg três vezes ao dia por 10 dias com diferentes doenças hepáticas e gastrointestinais, incluindo cirrose com encefalopatia hepática, retocolite ulcerativa, doença de Crohn e diverticulose. Eles encontraram aumento de *Lactobacillus* tanto imediatamente ao final dos 10 dias de tratamento, quanto 1 mês após o fim do tratamento, sugerindo que esta alteração se manteve com o passar do tempo. Também foi observada uma diminuição na abundância de *Roseburia*, *Haemophilus*, *Veillonella* e *Streptococcus*, bem como uma redução na *Roseburia* e *Collinsella* juntamente com um aumento no *Ruminococcus* (98). Em conclusão, a rifaximina é capaz de aumentar a abundância de bactérias intestinais potencialmente benéficas, mantendo estável a composição geral da comunidade microbiana intestinal.

Com base nisto, nosso grupo realizou um estudo intitulado: **“AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RIFAXIMINA NA CARCINOGENESE HEPÁTICA EXPERIMENTAL SECUNDÁRIA À DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA”** (GPPG/HCPA nº 17-0087) que gerou uma dissertação de mestrado neste PPG (99). Neste estudo foi avaliado o efeito terapêutico da rifaximina em um modelo animal de CHC padronizado por pesquisadores da Universidade de São Paulo (81). Para isto, os animais foram divididos em 3 grupos (n = 8/grupo). No grupo carcinoma hepatocelular (HCC), os animais foram induzidos com uma dieta hiperlipídica deficiente em colina (DHDC) mais DEN adicionado na água de beber (135 mg/L). No

grupo tratado com rifaximina (HCC+RIF), os animais foram induzidos com DHDC mais DEN e a partir da 5ª semana tratados com RIF na dose de 50 mg/kg/dia administrada por gavagem. O início do tratamento na 5ª semana foi baseado em estudo com este modelo que relata que na 6ª semana os animais já tinham características histológicas de EHNA (83). Como grupo controle (Grupo CON), os animais foram alimentados com dieta e água padrão, sem a DEN. O desenho experimental está ilustrado na figura 5.



**Figura 5 – Desenho experimental.** CON – Grupo Controle; HCC – Grupo Carcinoma Hepatocelular; HCC+RIF – Grupo Carcinoma Hepatocelular tratado com rifaximina.

Foram realizadas avaliações bioquímicas no soro e anatomopatológicas no fígado (*NAS score*, grau de fibrose e grau de câncer). Os dados preliminares sugerem que a rifaximina parece ter reduzido moderadamente o desenvolvimento da EHNA e o desenvolvimento do CHC (dados não publicados até o momento, mas descritos no artigo científico apresentado nesta dissertação). Com o intuito de entender melhor os mecanismos envolvidos na ação da rifaximina neste modelo de CHC, o presente estudo avaliou a permeabilidade intestinal e a microbiota intestinal destes animais. Assim os resultados obtidos neste estudo serão apresentados como

parte de um artigo, no qual também contém resultados obtidos na primeira parte deste projeto.

### **3. JUSTIFICATIVA**

Considerando a crescente incidência da DHGNA e do CHC em todo o mundo e o impacto que estas doenças podem gerar na sobrevivência dos pacientes, novas medidas profiláticas e terapêuticas são indispensáveis. Sabe-se que nestas doenças ocorre um supercrescimento bacteriano que quando associada à ruptura da barreira intestinal promove o aumento da translocação de bactérias e subprodutos bacterianos através da circulação portal. Durante este processo pode ocorrer ativação de vias inflamatórias através de diversos mecanismos os quais estão relacionados ao agravamento dos danos hepatocelulares. A intervenção precoce com uso de um antibiótico oral não absorvível pode ter impacto positivo na prevenção do CHC.

Dados preliminares de nosso grupo sugerem que a rifaximina, um antibiótico oral de amplo espectro pouco absorvido, parece ter reduzido moderadamente o desenvolvimento da EHNA e o desenvolvimento do CHC em um modelo animal. Embora os resultados pareçam promissores, os mecanismos pelos quais a rifaximina possa ter reduzido alguns parâmetros ainda não estão claros. Assim, este estudo tem o propósito de avaliar a microbiota intestinal em um modelo animal de CHC tratado com rifaximina.

#### **4. QUESTÃO DE PESQUISA**

A rifaximina tem efeito sobre a microbiota intestinal em animais com CHC?

#### **5. HIPÓTESE**

Os animais com CHC que receberam tratamento com rifaximina apresentarão diferenças na microbiota intestinal em relação aos animais com CHC sem o tratamento.

#### **6. OBJETIVOS**

##### **6.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito da rifaximina na microbiota intestinal de ratos submetidos ao modelo misto de CHC tratados ou não com rifaximina.

##### **6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Avaliar a expressão gênica das citocinas inflamatórias *Tnf- $\alpha$* , *Il-1 $\beta$* , *Il10*, *Il6* no tecido hepático dos grupos em estudo.
2. Avaliar a expressão gênica das *tight junctions* *F11r*, *Zo-1*, *Ocln*, *Cldn-1*, *Cldn -2* e *Cldn -4* no tecido intestinal dos grupos em estudo.
3. Avaliar e comparar a diversidade e composição da microbiota intestinal nos grupos em estudo.

## 7. CONCLUSÕES

- Não houve diferença de expressão gênica das citocinas pró e anti-inflamatórias entre os grupos em estudo.
- O grupo HCC teve uma tendência à diminuição na expressão gênica das *tight junctions* quando comparado ao CON, indicando um possível aumento da permeabilidade intestinal. Por outro lado, o grupo HCC+RIF não foi distinto do grupo HCC.
- A microbiota intestinal dos animais dos grupos HCC e HCC+RIF apresentaram diferenças na composição quando comparado ao grupo CON, indicando que a microbiota intestinal possivelmente se encontra envolvida nos mecanismos da DHGNA e CHC.
- O tratamento com rifaximina alterou a composição da microbiota intestinal dos animais do grupo HCC+RIF quando comparados com o grupo HCC, podendo este efeito estar associado com a melhora observada nas avaliações anatomopatológicas encontradas nos fígados dos animais tratados.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como considerações finais, podemos citar alguns pontos positivos e algumas limitações do presente estudo.

- Este estudo se destaca pela inclusão de diversas técnicas para avaliações bioquímicas, histológicas, e moleculares, além do uso de NGS. Outro destaque é o fato da avaliação da expressão gênica de *tight junctions* e da microbiota intestinal neste modelo de CHC secundário a DHGNA ser original na literatura.
- Dentro das limitações, podemos a ausência de avaliação da microbiota no tempo inicial do estudo (semana 1), para diminuirmos os fatores de confusão relacionados às alterações na microbiota entre os grupos em estudo. Outro fator é que 3 dos animais do grupo HCC+RIF não apresentaram lesões de câncer, o que nos leva a pensar que um n amostral maior por grupo poderia ter refinado as análises estatísticas, em especial para expressão gênica e avaliações da microbiota intestinal. Por último, a resolução taxonômica limitada da região hipervariável V4 utilizada, que permite a classificação de filo, família e gênero, onde mesmo em nível de gênero, há alguns táxons não classificados, e não conseguindo classificar em nível de espécie.

## 9. PERSPECTIVAS

Alguns questionamentos foram gerados a partir dos dados obtidos e por isso como principal perspectiva do presente trabalho podemos mencionar:

- Com base nos resultados obtidos neste trabalho, poderemos focar em responder questões mais específicas relacionadas em como os marcadores inflamatórios e de permeabilidade do hospedeiro (i.e. citocinas inflamatórias do fígado e *tight junctions* do intestino) estão associados entre si, e com determinados táxons do microbioma, e como a rifaximina influencia estas relações. Uma melhor compreensão sobre essas associações irá fornecer uma visão mais refinada dos mecanismos subjacentes que levam ao desenvolvimento de EHNA e CHC. Para tal, correlações entre as variáveis moleculares (marcados) e microbianas (táxons) serão calculadas em matrizes de correlação com base no teste de Spearman e através de redes de interação. As matrizes e redes de interação serão calculadas usando pipelines em R.
- Além disso, através de análises de predição metabólica com base nos dados do microbioma, será possível caracterizar quais rotas metabólicas bacterianas estão presentes nos grupos e quais são diferencialmente abundantes entre eles. Estes resultados fornecerão informações essenciais para se compreender quais rotas metabólicas estão relacionadas ao desenvolvimento de EHNA e CHC, e quais dessas rotas são influenciadas pela rifaximina. Dessa forma, novos alvos metabólicos poderão ser identificados, o que irá contribuir para direcionar e otimizar futuros estudos clínicos e pré-clínicos relacionados à compreensão do metabolismo do câncer de fígado.

- A avaliação de diferentes doses e diferentes tempos de início do tratamento também poderia nos ajudar a entender melhor a ação da rifaximina no CHC secundário à EHNA. Pensando nisso, será realizado um novo estudo onde o início do tratamento com rifaximina se dará junto ao início da indução do modelo, ou seja, a partir da 1ª semana, o que difere de nosso estudo em questão onde o início do tratamento se deu na 5ª semana de indução.

## 10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2010;16(42):5286–96. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v16/i42/5286.htm>
2. Satapathy S, Sanyal A. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis* [Internet]. 2015 Sep 17;35(03):221–35. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0035-1562943>
3. Kimura H, Ohkawa K, Miyazaki M, Sakakibara M, Imanaka K, Tamura T, et al. Subclassification of patients with intermediate-stage (Barcelona Clinic Liver Cancer stage-B) hepatocellular carcinoma using the up-to-seven criteria and serum tumor markers. *Hepatol Int* [Internet]. 2017 Jan 20;11(1):105–14. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12072-016-9771-0>
4. Scaffaro LA. Survival rates according to barcelona clinic liver cancer sub-staging system after transarterial embolization for intermediate hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* [Internet]. 2015;7(3):628–32. Available from: <http://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v7/i3/628.htm>
5. Biolato M, Gallusi G, Iavarone M, Cabibbo G, Racco S, Santis A De, et al. Prognostic ability of BCLC-B Subclassification in Patients with Hepatocellular Carcinoma Undergoing Transarterial Chemoembolization. *Ann Hepatol* [Internet]. 2018 Jan;17(1):110–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1665268119301140>
6. Zhaohui Z, Shunli S, Bin C. Hepatic Resection Provides Survival Benefit for Selected Intermediate-Stage (BCLC-B) Hepatocellular Carcinoma Patients. *Cancer Res Treat* [Internet]. 2018; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29510616>
7. Zhong JH, Peng NF, You XM, Ma L, Xiang X, Wang YY, et al. Tumor stage and primary treatment of hepatocellular carcinoma at a large tertiary hospital in China: A real-world study. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Mar 14;8(11):18296–302. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.15433>
8. Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2019 Oct 22;16(10):589–604. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41575-019-0186-y>
9. Sekirov I, Russell SL, Caetano M, Antunes L, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* [Internet]. 2010 Jul;90(3):859–904. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00045.2009>
10. Schwabe RF, Greten TF. Gut microbiome in HCC – Mechanisms, diagnosis and therapy. *J Hepatol* [Internet]. 2020 Feb;72(2):230–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827819304830>
11. Zhang X, Ji X, Wang Q, Li JZ. New insight into inter-organ crosstalk contributing to the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Protein Cell* [Internet]. 2018 Feb 22;9(2):164–77. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13238-017-0436-0>
12. Shayto RH, Abou Mrad R, Sharara AI. Use of rifaximin in gastrointestinal and liver diseases. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2016;22(29):6638–51. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v22/i29/6638.htm>

13. Satapathy S, Sanyal A. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis* [Internet]. 2015 Sep 17;35(3):221–35. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0035-1562943>
14. Cobbina E, Akhlaghi F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) – pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Rev* [Internet]. 2017 Apr 3;49(2):197–211. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03602532.2017.1293683>
15. Arab JP, Arrese M, Trauner M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2018;13(1):321–50. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-020117-043617>
16. Marchesini G, Day CP, Dufour JF, Canbay A, Nobili V, Ratziu V, et al. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* [Internet]. 2016 Jun;64(6):1388–402. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827815007345>
17. Neuschwander-Tetri BA. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med* [Internet]. 2017 Dec 28;15(1):45. Available from: <http://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-017-0806-8>
18. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2018 Jan 20;15(1):11–20. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrgastro.2017.109>
19. Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2013 Nov 17;10(11):686–90. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrgastro.2013.171>
20. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* [Internet]. 2018 Jan;67(1):123–33. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.29466>
21. Fan JG, Kim SU, Wong VWS. New trends on obesity and NAFLD in Asia. *J Hepatol* [Internet]. 2017 Oct;67(4):862–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827817320731>
22. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two “Hits”? *Gastroenterology* [Internet]. 1998 Apr;114(4):842–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508598705992>
23. Ma C, Zhang Q, Greten TF. Nonalcoholic fatty liver disease promotes hepatocellular carcinoma through direct and indirect effects on hepatocytes. *FEBS J* [Internet]. 2018 Feb;285(4):752–62. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.14209>
24. Kutlu O, Kaleli HN, Ozer E. Molecular Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis-(NASH-) Related Hepatocellular Carcinoma. *Can J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2018 Aug 29;2018:1–9. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/cjgh/2018/8543763/>
25. Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Tamimi TAR, Feldstein AF, Zein NN. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* [Internet]. 2010 Jun;51(6):1972–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.23527>

26. Kumar V, Abbas A, Fausto N. Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 7<sup>a</sup>. Elsevier, editor. 2005. 968 p.
27. Karvellas CJ, Cardoso FS, Senzolo M, Wells M, Alghanem MG, Handou F, et al. Clinical Impact of Portal Vein Thrombosis Prior to Liver Transplantation: A Retrospective Cohort Study. *Ann Hepatol* [Internet]. 2017 Mar;16(2):255–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1665268119303874>
28. Zhong JH, Xiang B De, Gong WF, Ke Y, Mo QG, Ma L, et al. Comparison of Long-Term Survival of Patients with BCLC Stage B Hepatocellular Carcinoma after Liver Resection or Transarterial Chemoembolization. Avila MA, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jul 9;8(7):e68193. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0068193>
29. Mazzanti R. Hepatocellular carcinoma: Where are we? *World J Exp Med* [Internet]. 2016;6(1):21. Available from: <http://www.wjgnet.com/2220-315X/full/v6/i1/21.htm>
30. Degasperis E, Colombo M. Distinctive features of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease. *Lancet Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2016 Oct;1(2):156–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468125316300188>
31. Saltzman ET, Palacios T, Thomsen M, Vitetta L. Intestinal Microbiome Shifts, Dysbiosis, Inflammation, and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Microbiol* [Internet]. 2018/01/30. 2018;9:61. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29441049>
32. Tripathi A, Debelius J, Brenner DA, Karin M, Loomba R, Schnabl B, et al. The gut-liver axis and the intersection with the microbiome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2018 Jul 10;15(7):397–411. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41575-018-0011-z>
33. Jandhyala SM. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2015;21(29):8836–47. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i29/8787.htm>
34. Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, Fischer SE, et al. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* [Internet]. 2013 Jul;58(1):120–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.26319>
35. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhoury R, Baker RD, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* [Internet]. 2013 Feb;57(2):601–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.26093>
36. Pinzone MR, Celesia BM, Di Rosa M, Cacopardo B, Nunnari G. Microbial Translocation in Chronic Liver Diseases. *Int J Microbiol* [Internet]. 2012;2012:1–12. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2012/694629/>
37. Cirera I, Martin Bauer T, Miguel N, Vila J, Grande L, Taurá P, et al. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol* [Internet]. 2001 Jan;34(1):32–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827800000131>
38. Teltschik Z, Wiest R, Beisner J, Nuding S, Hofmann C, Schoelmerich J, et al. Intestinal bacterial translocation in rats with cirrhosis is related to compromised paneth cell antimicrobial host defense. *Hepatology* [Internet]. 2012 Apr;55(4):1154–63. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.24789>

39. Ponziani FR, Zocco MA, Cerrito L, Gasbarrini A, Pompili M. Bacterial translocation in patients with liver cirrhosis: physiology, clinical consequences, and practical implications. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2018 Jul 3;12(7):641–56. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17474124.2018.1481747>
40. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, et al. Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2014 Dec 18;14(1):189. Available from: <https://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12876-014-0189-7>
41. Manresa MC, Taylor CT. Hypoxia Inducible Factor (HIF) Hydroxylases as Regulators of Intestinal Epithelial Barrier Function. *Cmgh* [Internet]. 2017 May;3(3):303–15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352345X17300358>
42. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, et al. Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*. 2014.
43. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2013 Feb 11;70(4):631–59. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-012-1070-x>
44. Garcia-Hernandez V, Quiros M, Nusrat A. Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2017 Jun;1397(1):66–79. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/nyas.13360>
45. Steinbacher T, Kummer D, Ebnet K. Junctional adhesion molecule-A: functional diversity through molecular promiscuity. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2018 Apr 14;75(8):1393–409. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-017-2729-0>
46. Hervé JC, Derangeon M, Sarrouilhe D, Bourmeyster N. Influence of the scaffolding protein Zonula Occludens (ZOs) on membrane channels. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2014 Feb;1838(2):595–604. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000527361300240X>
47. Ooshio T, Kobayashi R, Ikeda W, Miyata M, Fukumoto Y, Matsuzawa N, et al. Involvement of the interaction of afadin with ZO-1 in the formation of tight junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Feb 12;285(7):5003–12. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M109.043760>
48. Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, et al. ZO-1 and ZO-2 Independently Determine Where Claudins Are Polymerized in Tight-Junction Strand Formation. *Cell* [Internet]. 2006 Aug;126(4):741–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406009603>
49. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2017 Sep 2;11(9):821–34. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17474124.2017.1343143>
50. Chu H, Williams B, Schnabl B. Gut microbiota, fatty liver disease, and hepatocellular carcinoma. *Liver Res* [Internet]. 2018 Mar;2(1):43–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2542568418000041>
51. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* [Internet]. 2009 Jun;49(6):1877–87. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.22848>

52. Giorgio V, Miele L, Principessa L, Ferretti F, Villa MP, Negro V, et al. Intestinal permeability is increased in children with non-alcoholic fatty liver disease, and correlates with liver disease severity. *Dig Liver Dis* [Internet]. 2014 Jun;46(6):556–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1590865814002424>
53. Rahman K, Desai C, Iyer SS, Thorn NE, Kumar P, Liu Y, et al. Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol. *Gastroenterology* [Internet]. 2016 Oct;151(4):733-746.e12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508516346790>
54. Orbán E, Szabó E, Lotz G, Kupcsulik P, Páska C, Schaff Z, et al. Different Expression of Occludin and ZO-1 in Primary and Metastatic Liver Tumors. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2008 Sep 2;14(3):299–306. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12253-008-9031-2>
55. Bouchagier KA, Assimakopoulos SF, Karavias DD, Maroulis I, Tzelepi V, Kalofonos H, et al. Expression of claudins-1, -4, -5, -7 and occludin in hepatocellular carcinoma and their relation with classic clinicopathological features and patients' survival. *In Vivo (Brooklyn)* [Internet]. 2014;28(3):315–26. Available from: <http://iv.iijournals.org/content/28/3/315.long>
56. Nagai T, Arai T, Nishio K, Matsumoto K, Hagiwara S, Sakurai T, et al. Impact of Tight Junction Protein ZO-1 and TWIST Expression on Postoperative Survival of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis* [Internet]. 2016;34(6):702–7. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/448860>
57. Ponziani FR, Bhoori S, Castelli C, Putignani L, Rivoltini L, Del Chierico F, et al. Hepatocellular Carcinoma Is Associated With Gut Microbiota Profile and Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* [Internet]. 2019 Jan;69(1):107–20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.30036>
58. Roehlen N, Suarez AAR, El Saghire H, Saviano A, Schuster C, Lupberger J, et al. Tight junction proteins and the biology of hepatobiliary disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020.
59. Jiang J-W, Chen X-H, Ren Z-G, Zheng S-S. Gut microbial dysbiosis associates hepatocellular carcinoma via the gut-liver axis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* [Internet]. 2018 Nov; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1499387218302601>
60. Shen F, Zheng RD, Sun XQ, Ding WJ, Wang XY, Fan JG. Gut microbiota dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* [Internet]. 2017 Aug;16(4):375–81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1499387217600195>
61. 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. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2011;52(6):740–3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21505361>
62. Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F, et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* [Internet]. 2016 Mar;63(3):764–75. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.28356>
63. Grał M, Wronka KM, Krasnodębski M, Masiór, Lewandowski Z, Kosińska I, et al. Profile of Gut Microbiota Associated With the Presence of Hepatocellular Cancer in

- Patients With Liver Cirrhosis. *Transplant Proc* [Internet]. 2016 Jun;48(5):1687–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041134516003389>
64. Ponziani FR, Bhoori S, Castelli C, Putignani L, Rivoltini L, Del Chierico F, et al. Hepatocellular Carcinoma Is Associated With Gut Microbiota Profile and Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* [Internet]. 2019 Jan;69(1):107–20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.30036>
  65. Loo TM, Kamachi F, Watanabe Y, Yoshimoto S, Kanda H, Arai Y, et al. Gut microbiota promotes obesity-associated liver cancer through pge2-mediated suppression of antitumor immunity. *Cancer Discov* [Internet]. 2017 May;7(5):522–38. Available from: <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2159-8290.CD-16-0932>
  66. Zhang HL, Yu LX, Yang W, Tang L, Lin Y, Wu H, et al. Profound impact of gut homeostasis on chemically-induced pro-tumorigenic inflammation and hepatocarcinogenesis in rats. *J Hepatol* [Internet]. 2012 Oct;57(4):803–12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827812004370>
  67. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* [Internet]. 2013 Jul 26;499(7456):97–101. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature12347>
  68. Yamada S, Takashina Y, Watanabe M, Nagamine R, Saito Y, Kamada N, et al. Bile acid metabolism regulated by the gut microbiota promotes non-alcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma in mice. *Oncotarget* [Internet]. 2018 Feb 9;9(11):9925–39. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.24066>
  69. Ren Z, Li A, Jiang J, Zhou L, Yu Z, Lu H, et al. Gut microbiome analysis as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for early hepatocellular carcinoma. *Gut* [Internet]. 2019 Jun;68(6):1014–23. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2017-315084>
  70. Uehara T, Pogribny IP, Rusyn I. The DEN and CCl<sub>4</sub> -Induced Mouse Model of Fibrosis and Inflammation-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Curr Protoc Pharmacol* [Internet]. 2014 Sep 2;2014(1):14.30.1-14.30.10. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471141755.ph1430s66>
  71. TRAVIS C. Diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats: A theoretical study\*1. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 1991 Jun;109(2):289–304. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0041008X9190176F>
  72. Wu J. Utilization of animal models to investigate nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Jul 5;7(27):42762–76. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/8641>
  73. Santos NP, Colaço AA, Oliveira PA. Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: A Review. *Tumor Biol* [Internet]. 2017 Mar 28;39(3):101042831769592. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1010428317695923>
  74. Ozawa T, Maehara N, Kai T, Arai S, Miyazaki T. Dietary fructose-induced hepatocellular carcinoma development manifested in mice lacking apoptosis inhibitor of macrophage (AIM). *Genes to Cells* [Internet]. 2016 Dec;21(12):1320–32. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/gtc.12446>
  75. Hill-Baskin AE, Markiewski MM, Buchner DA, Shao H, Desantis D, Hsiao G, et al. Diet-induced hepatocellular carcinoma in genetically predisposed mice. *Hum Mol*

- Genet [Internet]. 2009 Aug 15;18(16):2975–88. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddp236>
76. Kishida N, Matsuda S, Itano O, Shinoda M, Kitago M, Yagi H, 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* [Internet]. 2016 Dec 13;16(1):61. Available from: <http://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12876-016-0477-5>
  77. Raubenheimer PJ, Nyirenda MJ, Walker BR. A Choline-Deficient Diet Exacerbates Fatty Liver but Attenuates Insulin Resistance and Glucose Intolerance in Mice Fed a High-Fat Diet. *Diabetes* [Internet]. 2006 Jul 1;55(7):2015–20. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/db06-0097>
  78. Asgharpour A, Cazanave SC, Pacana T, Seneshaw M, Vincent R, Banini BA, et al. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J Hepatol* [Internet]. 2016 Sep;65(3):579–88. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827816301908>
  79. Jahn D, Kircher S, Hermanns HM, Geier A. Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2019 May;1865(5):943–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092544391830228X>
  80. Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int J Exp Pathol* [Internet]. 2009 Aug;90(4):367–86. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2613.2009.00656.x>
  81. de Lima VMR, Oliveira CPMS, Alves VAF, Chammas MC, Oliveira EP, Stefano JT, et al. A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* [Internet]. 2008 Dec;49(6):1055–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016882780800562X>
  82. Levy CDS, De Barros Costa FG, Faria DDP, Stefano JT, Cogliati B, Oliveira CP. 18F-FDG PET/CT as an assessment tool of hepatocellular carcinoma secondary to non-alcoholic fatty liver disease development in experimental model. *Arq Gastroenterol* [Internet]. 2019 Mar;56(1):45–50. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-28032019000100045&tIng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032019000100045&tIng=en)
  83. Stefano JT, Pereira IVA, Torres MM, Bida PM, Coelho AMM, Xerfan MP, et al. Sorafenib prevents liver fibrosis in a non-alcoholic steatohepatitis (NASH) rodent model. *Brazilian J Med Biol Res* [Internet]. 2015 May;48(5):408–14. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2015000500408&tIng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2015000500408&tIng=en)
  84. Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011 Mar 15;108(SUPPL. 1):4554–61. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1000087107>
  85. Ponziani FR, Zocco MA, D'Aversa F, Pompili M, Gasbarrini A. Eubiotic properties of rifaximin: Disruption of the traditional concepts in gut microbiota modulation. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2017;23(25):4491. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v23/i25/4491.htm>
  86. Scarpignato C, Pelosini I. Rifaximin, a Poorly Absorbed Antibiotic: Pharmacology and Clinical Potential. *Chemotherapy* [Internet]. 2005;51(SUPPL. 1):36–66. Available from:

<https://www.karger.com/Article/FullText/81990>

87. Targaxan. Mode of action - Rifaximin [Internet]. [cited 2019 Feb 6]. Available from: <http://www.targaxan.co.uk/targaxan/moa/#>
88. Kang SH, Lee YB, Lee J-H, Nam JY, Chang Y, Cho H, et al. Rifaximin treatment is associated with reduced risk of cirrhotic complications and prolonged overall survival in patients experiencing hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2017 Nov;46(9):845–55. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/apt.14275>
89. Vlachogiannakos J, Viazis N, Vasianopoulou P, Vafiadis I, Karamanolis DG, Ladas SD. Long-term administration of rifaximin improves the prognosis of patients with decompensated alcoholic cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2013 Mar;28(3):450–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jgh.12070>
90. Marchese A, Salerno A, Pesce A, Debbia EA, Schito GC. In vitro activity of rifaximin, metronidazole and vancomycin against *Clostridium difficile* and the rate of selection of spontaneously resistant mutants against representative anaerobic and aerobic bacteria, including ammonia-producing species. *Chemotherapy* [Internet]. 2000;46(4):253–66. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/7297>
91. Maccaferri S, Vitali B, Klinder A, Kolida S, Ndagijimana M, Laghi L, et al. Rifaximin modulates the colonic microbiota of patients with Crohn's disease: an in vitro approach using a continuous culture colonic model system. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2010 Dec;65(12):2556–65. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkq345>
92. Brigidì P, Swennen E, Rizzello F, Bozzolasco M, Matteuzzi D. Effects of rifaximin administration on the intestinal microbiota in patients with ulcerative colitis. *J Chemother* [Internet]. 2002 Jan 18;14(3):290–5. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/joc.2002.14.3.290>
93. Soldi S, Vasileiadis S, Uggeri F, Campanale M, Morelli L, Fogli MV, et al. Modulation of the gut microbiota composition by rifaximin in non-constipated irritable bowel syndrome patients: A molecular approach. *Clin Exp Gastroenterol* [Internet]. 2015 Dec;8:309–25. Available from: <https://www.dovepress.com/modulation-of-the-gut-microbiota-composition-by-rifaximin-in-non-const-peer-reviewed-article-CEG>
94. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux J-J, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2008 Oct 28;105(43):16731–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804812105>
95. 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* [Internet]. 2012 Apr;21(4):504–16. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610812000724>
96. Cobbold JFL, Atkinson S, Marchesi JR, Smith A, Wai SN, Stove J, et al. Rifaximin in non-alcoholic steatohepatitis: An open-label pilot study. *Hepatol Res* [Internet]. 2018 Jan;48(1):69–77. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/hepr.12904>
97. Bajaj JS, Heuman DM, Sanyal AJ, Hylemon PB, Sterling RK, Stravitz RT, et al. Modulation of the Metabiome by Rifaximin in Patients with Cirrhosis and Minimal Hepatic Encephalopathy. Sookoian SC, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Apr 2;8(4):e60042. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0060042>
98. Ponziani FR, Scaldaferri F, Petito V, Paroni Sterbini F, Pecere S, Lopetuso LR, et al.

- The Role of Antibiotics in Gut Microbiota Modulation: The Eubiotic Effects of Rifaximin. *Dig Dis* [Internet]. 2016;34(3):269–78. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/443361>
99. Ferrari TJ, Uribe-Cruz C. Avaliação do efeito da rifaximina na carcinogênese hepática experimental secundária à doença hepática gordurosa não alcoólica. *Lume UFRGS*. 2018;Ciências d(PPG Gastroenterologia e Hepatologia UFRGS).
  100. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2009 Dec 1;75(23):7537–41. Available from: <https://aem.asm.org/content/75/23/7537>
  101. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* [Internet]. 2016 Oct 18;2016(10):e2584. Available from: <https://peerj.com/articles/2584>
  102. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2013 Nov 27;41(D1):D590–6. Available from: <http://academic.oup.com/nar/article/41/D1/D590/1069277/The-SILVA-ribosomal-RNA-gene-database-project>