

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

Desenvolvimento de um modelo experimental de doença hepática alcoólica  
em ratos Wistar: da lesão hepática à disbiose intestinal

RUTIANE ULLMANN THOEN

Tese de Doutorado

PORTO ALEGRE, BRASIL

2022

Rutiane Ullmann Thoen

Desenvolvimento de um modelo experimental de doença hepática alcoólica  
em ratos Wistar: da lesão hepática à disbiose intestinal

Tese de doutorado 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 Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva

Coorientadora: Dra. Larisse Longo

PORTO ALEGRE, BRASIL

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Ullmann Thoen, Rutiane

Desenvolvimento de um modelo experimental de doença hepática alcoólica em ratos Wistar: da lesão hepática à disbiose intestinal / Rutiane Ullmann Thoen. -- 2022.

100 f.

Orientador: Mário Reis Álvares-da-Silva.

Coorientadora: Larisse Longo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Doença Hepática Alcoólica. 2. Pesquisa Experimental. 3. Microbiota Intestinal. I. Reis Álvares-da-Silva, Mário, orient. II. Longo, Larisse, coorient. III. Título.

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

## Dedicatória

A concretização deste trabalho resulta de muito apoio e atenção, portanto, retorno meu conhecimento, dedicando a

Edeltraud e Ernani, meus pais, pelo amor incondicional, pela compreensão, pela educação, por todos os abraços e palavras sábias nos momentos convividos e, em especial, por serem meus pais que eu amo.

Isaías, meu irmão, pelo estímulo constante, por sempre acreditar em mim, sempre me ajudar, querer o meu melhor e ser a minha estrela guia. Enzo, meu sobrinho, por trazer diversão e esperança.

Bernardo e Isabela, meus filhos caninos, por trazer alegria e amor na minha vida.

Em especial, ao meu amor, Gabriel, por ser como é, por querer sempre o meu bem, por fazer sempre o que é certo e por ser o amor da minha vida.

## Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva, meu orientador, o grande idealizador deste trabalho, por ser uma pessoa única e sábia. Agradeço à excelente orientação, o incentivo constante, a coragem, o apoio e as oportunidades.

À Dra. Larisse Longo, pessoa ímpar, inteligente, sensível e especial. Agradeço os ensinamentos constantes, o apoio, o carinho e o ombro amigo.

Aos amigos e colegas do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia, agradeço a amizade, a ajuda imparcial e a dedicação em todos os momentos desse trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	01
ABSTRACT .....	03
LISTA DE ABREVIATURAS.....	05
LISTA DE FIGURAS.....	07
LISTA DE QUADROS .....	08
1. INTRODUÇÃO .....	09
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	12
2.1 Transtorno por uso de álcool.....	12
2.2 Doença Hepática Alcoólica.....	13
2.2.1 Diagnóstico e Tratamento da Doença Hepática Alcoólica.....	17
2.2.2 Fisiopatologia da Doença Hepática Alcoólica.....	20
2.2.3 Nutrição na Doença Hepática Alcoólica .....	26
2.3 Microbiota Intestinal.....	29
2.3.1 Microbiota intestinal na Doença Hepática Alcoólica.....	30
2.4 Modelos Experimentais de Doença Hepática Alcoólica .....	34
3. JUSTIFICATIVA .....	39
4. QUESTÕES DE PESQUISA .....	40
5. HIPÓTESES .....	41
6. OBJETIVOS .....	42
6.1 Objetivo Geral.....	42
6.2 Objetivos específicos.....	42
7. ARTIGOS ORIGINAIS EM INGLÊS .....	43
7.1 Artigo I .....	43
8. CONCLUSÃO.....	62
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
ANEXO A .....	89
ANEXO B .....	97

## RESUMO

**Introdução:** A doença hepática alcoólica (DHA) embora seja a principal causa hepática de internação e óbito, ainda recebe pouca atenção. Ademais, exceto a abstenção alcoólica, não há tratamento farmacológico estabelecido. A disbiose intestinal está associada à DHA, e é um alvo terapêutico a ser explorado. Modelos experimentais são úteis para testar novas alternativas, mas os modelos de DHA são difíceis de reproduzir e onerosos. **Objetivos:** Desenvolver modelo experimental de DHA que seja reprodutível e de baixo custo, avaliar a indução de disbiose intestinal, através da análise da composição e diversidade da microbiota entérica, e estimar sua relação com a lesão hepática. **Métodos:** Foram randomizados 24 ratos *Wistar* machos em três grupos experimentais: controle (CONT; n=8), alimentados com ração padrão e água com 0,05% de sacarina sódica *ad libitum* por 4 semanas; álcool 4 (ALC4; n=8), que receberam semente de girassol e etanol a 10% com 0,05% de sacarina sódica *ad libitum* por 4 semanas; e álcool 8 (ALC8; n=8) que receberam semente de girassol e etanol a 10% com 0,05% de sacarina sódica *ad libitum* por 8 semanas. Os animais dos grupos ALC4 e ALC8 receberam, por gavagem, 9 horas antes da eutanásia, sobrecarga alcoólica (5g/kg); os animais do grupo CONT receberam água estéril pela mesma via. Foram coletados dados de ingestão alimentar, peso e altura dos animais para avaliação de consumo alimentar e cálculo do índice de *Lee*; soro e fígado para avaliação bioquímica e de marcadores inflamatórios; e fezes para análise da microbiota intestinal. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais do HCPA (n° 2018-0257). **Resultados:** Todos os animais completaram o período de experimentação antes da sobrecarga alcoólica. O consumo total de calorias, líquidos, alimentos sólidos, carboidratos e proteínas foi menor nos grupos ALC4 e ALC8 que nos animais CONT ( $p < 0,01$  para todos). O índice de *Lee* foi

menor no grupo ALC 8 em relação a ALC 4 ( $p < 0,01$ ) e CONT ( $p < 0,01$ ), enquanto o consumo de etanol e lipídios foi superior nos grupos ALC4 e ALC8 ( $p < 0,01$  para ambos) em relação ao CONT. Os animais do grupo ALC4 apresentaram níveis mais elevados de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e colesterol total (CT) e mais baixos de albumina que os animais CONT ( $p < 0,03$  para todos). No grupo ALC8, glicemia, AST, ALT e FA foram mais elevados que nos CONT ( $p < 0,03$  para todos), ao mesmo tempo em que houve redução de CT, HDL colesterol e albumina ( $p < 0,03$  para todos). A deposição hepática de triglicerídeos (TG), CT e gorduras totais variou de forma decrescente entre os grupos ALC8, ALC4 e CONT ( $p < 0,05$ ). Animais dos grupos ALC4 e ALC8 apresentaram esteatose (microvesicular grau 2 e macrovesicular grau 1; e microvesicular grau 3 e macrovesicular grau 1, respectivamente), enquanto os animais do grupo CONT não tiveram alteração na histologia hepática; em nenhum grupo houve deposição de fibras de colágeno. Os marcadores inflamatórios hepáticos IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 não apresentaram diferenças entre os grupos. Houve redução da diversidade bacteriana fecal, com menor abundância relativa do gênero *Firmicutes* ( $p < 0,005$ ) e maior de *Bacteroidetes* ( $p < 0,0007$ ) e *Proteobacteria* ( $p < 0,001$ ) nos grupos ALC4 e ALC8. Foi observado a correlação entre a comunidade microbiana e marcadores da DHA como esteatose, acúmulo de gordura, TG e CT hepáticos e ALT, AST, FA e albumina séricos. **Conclusão:** O modelo desenvolvido foi capaz de induzir anormalidades bioquímicas e histológicas hepáticas, assim como disbiose intestinal, que reproduzem as alterações descritas na DHA em humanos.

**Palavras-chave:** Doença hepática alcóolica, modelo experimental, dieta hiperlipídica e alcoólica crônica e aguda, microbiota intestinal.



## ABSTRACT

**Introduction:** Alcoholic liver disease (ALD), although the main hepatic cause of hospitalization and death, still receives little attention. Furthermore, except for alcohol abstinence, there is no established pharmacological treatment. Intestinal dysbiosis is associated with DHA and is a therapeutic target to be explored. Experimental models are useful for testing new alternatives, but DHA models are both safe and expensive.

**Objectives:** To develop an experimental model of DHA that is reproducible and inexpensive, to evaluate the induction of intestinal dysbiosis, through the analysis of the composition and diversity of the enteric microbiota, and to estimate its relationship with liver damage.

**Methods:** Twenty-four male Wistar rats were randomized into three experimental groups: control (CONT; n=8), fed standard chow and water with 0.05% sodium saccharin ad libitum for 4 weeks; alcohol 4 (ALC4; n=8), which received sunflower seed and 10% ethanol with 0.05% sodium saccharin ad libitum for 4 weeks; and alcohol 8 (ALC8; n=8) that received sunflower seed and 10% ethanol with 0.05% sodium saccharin ad libitum for 8 weeks. The animals in the ALC4 and ALC8 groups received, by gavage, 9 hours before euthanasia, alcoholic overload (5g/kg); the animals in the CONT group received sterile water by the same route. Data on food intake, weight and height of the animals were collected to assess food consumption and calculate the Lee index; serum and liver for biochemical and inflammatory markers evaluation; and feces for analysis of the intestinal microbiota. All procedures were approved by the HCPA Ethics Committee for the Use of Animals (n° 2018-0257).

**Results:** All animals completed the experimentation period before alcohol overload. The total consumption of calories, liquids, solid foods, carbohydrates, and proteins was lower in the ALC4 and ALC8 groups than in the CONT animals ( $p < 0.01$  for all). The Lee index was lower in the ALC 8 group compared to ALC 4 ( $p < 0.01$ ) and CONT

( $p < 0.01$ ), while the consumption of ethanol and lipids was higher in the ALC4 and ALC8 groups ( $p < 0.01$  for both) in relation to CONT. The animals in the ALC4 group had higher levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (AP) and total cholesterol (TC) and lower levels of albumin than CONT animals ( $p < 0.03$  for all). In the ALC8 group, blood glucose, AST, ALT and FA were higher than in the CONT ( $p < 0.03$  for all), while there was a reduction in TC, HDL cholesterol and albumin ( $p < 0.03$  for all). Hepatic deposition of triglycerides, TC and total fat varied in a decreasing way between the ALC8, ALC4 and CONT groups ( $p < 0.05$ ). Animals in the ALC4 and ALC8 groups presented steatosis (microvesicular grade 2 and macrovesicular grade 1; and microvesicular grade 3 and macrovesicular grade 1, respectively), while the animals in the CONT group had no change in liver histology; in no group there was deposition of collagen fibers. The hepatic inflammatory markers IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 showed no differences between the groups. There was a reduction in fecal bacterial diversity, with a lower relative abundance of the genus Firmicutes ( $p < 0.005$ ) and a higher abundance of Bacteroidetes ( $p < 0.0007$ ) and Proteobacteria ( $p < 0.001$ ) in the ALC4 and ALC8 groups. A correlation was observed between the microbial community and DHA markers such as steatosis, fat accumulation, hepatic TG and CT and serum ALT, AST, AP and albumin. **Conclusion:** The model developed was able to induce hepatic biochemical and histological abnormalities, as well as intestinal dysbiosis, which reproduce the changes described in DHA in humans.

**Keywords:** Alcoholic liver disease, experimental model, chronic and acute high-fat and alcoholic diet, intestinal microbiota.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA: acetaldeído

ADH: álcool desidrogenase

AGCC: ácido graxo de cadeia curta

AGCL: ácido graxo de cadeia longa

ALDH2: aldeído desidrogenase 2

ALT: alanina aminotransferase

AST: aspartato aminotransferase

AUD: do inglês *alcohol use disorder*

CHC: carcinoma hepatocelular

CYP2E1: citocromo P450 2E1

CXCL: quimiocina

DALYs: do inglês *Disability Adjusted Life Years*

DHA: doença hepática alcoólica

DHGNA: doença hepática gordurosa não-alcoólica

DNA: ácido desoxirribonucleico

TDC: transferrina deficiente em carboidratos

EASL: do inglês *European Association for the Study of Liver*

EH: esteato-hepatite

EtG: etil-glicuronídeo

EtOH: etanol

GGT: gama-glutamiltransferase

HA: hepatite alcoólica

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

HSCs: células estreladas hepáticas

IgA: imunoglobulina A

IL: interleucina

INR: proporção normalizadora internacional

KCs: células de kupffer

LPS: lipopolissacarídeos

MFB: miofibroblastos

NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NF- $\kappa$ B: do inglês *nuclear factor kappa B*

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: ânion superóxido

OH: radical hidroxil

PPAR- $\alpha$ : do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$*

RE: retículo endoplasmático

RNA: ácido ribonucleico

ROS: espécies reativas de oxigênio

SALVE: do inglês *Study of Alcohol-related Liver Disease in Europe*

SM: síndrome metabólica

SMASH: síndrome da esteato-hepatite alcoólica e metabólica

SREBP: do inglês *sterol regulatory element-binding proteins*

TGI: trato gastrointestinal

TGF- $\beta$ : fator de transformação do crescimento beta

TLRs: do inglês *toll-like receptors*

TNF- $\alpha$ : do inglês *tumor necrosis factor- $\alpha$*

VCM: volume corpuscular médio

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Progressão da doença hepática alcoólica .....	14
<b>Figura 2:</b> Vias principais e secundárias de oxidação do etanol no fígado .....	23
<b>Figura 3:</b> Desenvolvimento da fibrose.....	26
<b>Figura 4:</b> Contribuição da microbiota intestinal para a doença hepática alcoólica .....	32
<b>Figura 5:</b> Modelo de Tsukamoto-French .....	37

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1:** Volume médio de bebidas alcoólicas equivalente a uma dose.....13

## 1. INTRODUÇÃO

A doença hepática alcoólica (DHA) ainda é uma das principais causas de morbimortalidade por doenças hepáticas crônicas. E ainda, é um cofator frequente em pacientes com outro tipo de doença hepática acelerando a fibrose do fígado.<sup>1</sup> O consumo elevado de álcool por um período superior a dez anos condiciona um risco de indução de doença hepática avançada. A história natural da DHA varia da deposição isolada de gordura no tecido hepático (esteatose) à esteato-hepatite (EH), cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC).<sup>2</sup> A doença costuma ser silenciosa, sendo que os pacientes em geral procuram auxílio médico de forma tardia, quando há icterícia ou complicações da cirrose. A hepatite alcoólica (HA) pode sobrevir após sobrecarga aguda de etanol, em geral em pacientes com cirrose. A DHA é importante causa de transplante hepático em todo o mundo, em 2017 28,7% de todos transplantes de fígado é relacionado ao alcoolismo.<sup>2</sup>

A estratégia global para reduzir o uso nocivo do álcool, negociada e acordada pelos Estados Membros da OMS, representa o consenso internacional e é uma prioridade de saúde pública. A meta global é que se tenha uma redução relativa de 10% no uso nocivo de álcool até 2025 com opções de políticas e intervenções em áreas como liderança, conscientização e comprometimento; apoio dos serviços de saúde; ação comunitária; políticas e punições para dirigir embriagado; disponibilidade de álcool; comercialização de bebidas alcoólicas; políticas de preços; redução das consequências negativas do consumo de álcool e da intoxicação alcoólica; reduzir o impacto na saúde pública do álcool ilícito e do álcool produzido informalmente; monitoramento e vigilância.<sup>3</sup> No entanto, em decorrência da situação atual, instalada desde o ano de 2020 com a pandemia de COVID-19 está se observando um aumento no consumo de álcool e DHA em todo o mundo. Uma coorte nos EUA que examinou

a taxa de paciente com hepatite aguda associada ao álcool à lista de espera de transplante de fígado viu um aumento substancial durante a pandemia de COVID-19 e sugere que essa mudança provavelmente está associada a padrões recentes de uso de álcool de alto risco.<sup>4</sup>

O principal tratamento para a doença é a abstenção prolongada de álcool, pois faltam medidas terapêuticas eficazes para sua reversão.<sup>5</sup> Apesar do conhecimento da alta prevalência e dos grandes gastos públicos, somente nos últimos anos, tem sido dado mais atenção pelas autoridades de saúde, organizações de financiamento de pesquisa e comunidade acadêmica do fígado. Entre o período de 2010 e 2014 apenas 5% das pesquisas na área de hepatologia foram dedicadas à DHA.<sup>6</sup> Recentemente surgiram as primeiras publicações de um projeto que vai auxiliar no andamento de novas pesquisas nesta doença, o *Study of Alcohol-related Liver Disease in Europe* (consórcio SALVE) da *European Association for the Study of Liver* (EASL), que está atualmente envolvido em estudos sobre a história natural da DHA, o manejo clínico da HA e o desenvolvimento de um sistema de classificação/estadiamento histopatológico com base de dados multinacional prospectiva e retrospectiva.<sup>7</sup> Devido a falta de tratamento algumas intervenções parecem ser promissoras, como por exemplo na microbiota intestinal.

O eixo fígado-intestino desempenha um papel importante na homeostase e na doença hepática. Estudos têm demonstrado que a disbiose intestinal pode estar relacionada ao desencadeamento e à progressão da DHA.<sup>8</sup> Avanços recentes, possibilitam a realização de estudos mais aprofundados para a avaliação da microbiota intestinal. Até o momento, a intervenção na microbiota intestinal não faz parte do tratamento da DHA, mas pode vir a ser uma alternativa no futuro.



Condições clínicas comuns e graves, com deficiências terapêuticas notáveis, representam um grande desafio médico, e isso é o que ocorre hoje na DHA. As lacunas no entendimento e no manejo da doença abrem espaço para o uso de modelos experimentais em estudos pré-clínicos. Nosso grupo tem estudado a DHA em modelo experimental em zebrafish,<sup>9,10,11,12</sup> assim como a intervenção na microbiota intestinal neste modelo, com resultados promissores.<sup>13</sup> Modelos experimentais em roedores podem ser igualmente úteis para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na DHA e para testar novos alvos terapêuticos. Os roedores, no entanto, têm aversão ao álcool e os modelos experimentais de DHA nesses animais costumam ser complexos e muito onerosos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Transtorno por uso de álcool

O transtorno por uso de álcool (*alcohol use disorder* - AUD) é uma das principais causas de doenças evitáveis e mortalidade por diversos fatores, ficando atrás somente do tabagismo e da hipertensão. Igualmente, o desenvolvimento da DHA em pessoas com AUD é uma das principais causas de doenças hepáticas crônicas no mundo.<sup>3</sup>

De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), 2,3 bilhões de pessoas consumiam álcool ativamente em 2016. De forma alarmante, o consumo per capita de álcool aumentou de 5,5l em 2000 para 6,4l em 2016. Embora a porcentagem de bebedores tenha diminuído na África e na América, continua a aumentar nas regiões do Pacífico Ocidental, Europa e Sudeste Asiático, incluindo Índia e China.<sup>3</sup> O padrão demográfico do consumo de álcool tem mudado, sendo observado início de seu consumo em idade mais jovem e uma maior ingestão em pessoas de sexo feminino.<sup>3,14</sup>

A OMS emitiu um relatório que indica que 3,3 milhões de mortes (6% de todas as mortes globais) são atribuíveis ao uso de álcool, e que este abuso é um fator de risco em cerca de 50% dos casos de cirrose.<sup>15</sup> Aproximadamente 1 em cada 12 adultos tem AUD definido, sendo essa determinação definida em decorrência do consumo de mais de 3 doses por dia para homens e mais de 2 doses por dia em mulheres<sup>16</sup>. Adicionalmente, a AUD pode ser definida pelo consumo excessivo de álcool, conforme estabelecido pelo Instituto Nacional de Alcoolismo e Abuso de Álcool compreende a ingestão de mais de 5 doses para homens e mais de 4 doses para mulheres em um período de duas horas. Uma dose é definida quando a porção, independente do volume de bebida, contenha 14g de álcool. O quadro 1 demonstra o

volume médio de algumas bebidas alcoólicas que equivalem a uma dose (14g de etanol).<sup>16</sup> A porcentagem de álcool puro varia dentro e entre os tipos de bebida conforme produção. Embora as quantidades padrão de bebida sejam úteis para seguir as diretrizes de saúde, elas podem não refletir os tamanhos de porção e medidas caseiras.

**Quadro 1:** Volume médio de bebidas alcoólicas equivalente a uma dose.

<b>Bebida</b>	<b>Teor alcoólico médio</b>	<b>Volume médio equivalente a uma dose (14g de etanol)</b>
Cerveja/chopp	5%	280ml
Licores	7%	200ml
Vinho	12%	120-150ml
Gin/Rum/Tequila/Vodca/Uísque	40%	35-40ml

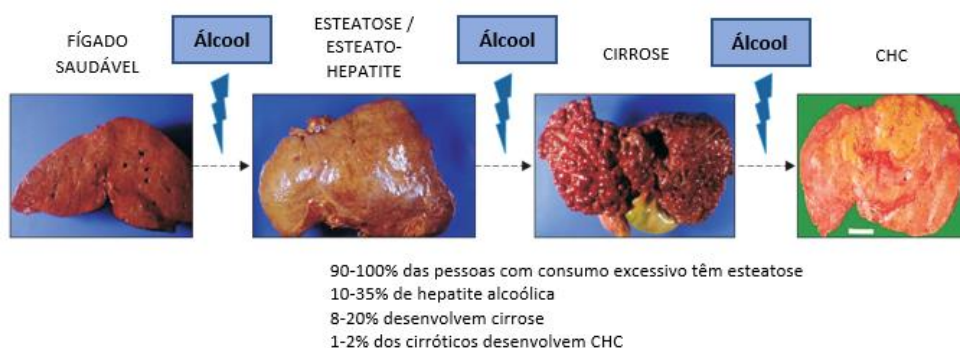
Fonte: Adaptado de *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA)*<sup>17</sup> e Centro de Informações sobre Saúde e Álcool (CISA)<sup>18</sup>.

Acidentes e violência são causas comuns de morte entre pessoas que abusam do álcool, além de mais de 200 doenças e uma série de outras condições clínicas relacionadas ao seu uso, incluindo doenças cardiovasculares, câncer e cirrose. No entanto, o fígado é o órgão mais atingido e as doenças hepáticas, particularmente a cirrose, é uma das maiores problemáticas.<sup>3</sup>

## **2.2 Doença Hepática Alcoólica**

A história natural da DHA compreende um espectro clínico-histológico incluindo esteatose hepática, EH, HA e cirrose com suas complicações como CHC. A maioria dos pacientes são diagnosticados em estágios avançados e os dados são limitados em relação a prevalência e o perfil demográfico da doença precoce.

Para o desenvolvimento da DHA estima-se que seja necessário um consumo diário superior a 20g de álcool para mulheres e 30g para os homens<sup>19,20</sup> por um período superior a 5 ou 10 anos. O consumo de uma grande quantidade de álcool, maior que 60g em menos de duas horas, aumenta a probabilidade de desencadear a hepatite alcóolica.<sup>21</sup> Um estudo realizado na Itália, verificou que há um maior risco para o desenvolvimento de cirrose alcoólica quando o consumo de álcool é superior a 120g de álcool por dia.<sup>22</sup> Estima-se que de 90 a 95% das pessoas com uso crônico e elevado de álcool desenvolvem esteatose hepática e destes, 10 a 35% evoluem para uma sobreposição com graus variados de inflamação e fibrose e 8 a 20% dos casos progridem para cirrose.<sup>23,24,25</sup> O CHC é diagnosticado anualmente em 1-2% dos casos de pacientes com cirrose por álcool, sendo observado um aumento desta incidência nos últimos anos.<sup>26,27</sup> (Figura 1) A DHA não se desenvolve em todos os indivíduos com o padrão de consumo de álcool descrito acima, somente em alguns casos ocorre a manifestação das formas graves relacionado a progressão da doença;<sup>28</sup> existem outros fatores exógenos e inerentes que estão envolvidos na modulação da suscetibilidade individual, tais como fatores comportamentais, ambientais e genéticos.<sup>29</sup>



**Figura 1: Progressão da DHA.** A progressão de lesão hepática alcoólica para esteatose com cicatrizes, inflamação e distorção arquitetônica levando à cirrose. Como complicação da cirrose, pode ocorrer o carcinoma hepatocelular (CHC). No entanto, apenas uma minoria de pacientes com esteatose alcoólica evolui para lesão hepática grave. Fonte: Adaptado de Stickel, *et al* (2017).<sup>25</sup>

As mulheres apresentam um risco maior de desenvolver cirrose relacionada ao álcool, provavelmente atribuível aos efeitos hormonais sobre o estresse oxidativo e a inflamação,<sup>30</sup> diferenças nos padrões de expressão das enzimas metabolizadoras do álcool, como a álcool desidrogenase (ADH)<sup>31</sup> e um menor volume de distribuição do álcool nas mulheres e, portanto, níveis mais elevados de exposição ao álcool nos tecidos.<sup>32,33</sup> Além disso, o padrão de consumo de álcool, se excessivo e fora das refeições; o tipo de bebida e teor alcoólico; a presença de obesidade;<sup>34</sup> a coexistência de hepatite B crônica ou infecção pelo vírus C;<sup>1,35,36</sup> o acúmulo de ferro hepático;<sup>37</sup> a genética;<sup>38</sup> e ainda a microbiota intestinal e seus metabólitos<sup>39</sup> foram identificados como interferentes na progressão da história natural da doença. Consumir café parece proteger as lesões hepáticas relacionadas ao álcool, pois as pessoas que bebem quatro ou mais xícaras por dia têm um quinto do risco de desenvolver cirrose quando comparados às pessoas que não ingerem;<sup>40</sup> o tabagismo aumenta o risco de desenvolvimento de cirrose alcoólica, pessoas que fumam mais de um maço por dia apresentam risco três vezes maior do que os não fumantes;<sup>41</sup> indivíduos infectados pelo vírus da hepatite C que bebem álcool acima de 50 g/dia apresentam um risco significativamente maior de desenvolver fibrose avançada se comparado aos casos que bebem menos ou nunca bebem.<sup>42</sup> O sobrepeso, obesidade e síndrome metabólica (SM) estão associados a um risco aumentado de desenvolver fibrose e cirrose relacionada ao álcool, refletindo potencialmente uma interação sinérgica entre o álcool e a lipotoxicidade da esteatose como consequência da obesidade.<sup>43,44,45</sup> Esta última interação citada apresenta uma nova definição para representá-la, a síndrome da esteato-hepatite alcoólica e metabólica (SMASH).<sup>46</sup> Todos esses fatores, estão relacionados ao quanto a doença irá se desenvolver e progredir, principalmente, para os casos com diagnóstico de cirrose alcoólica e que continuam a consumir álcool.

Em todo o mundo, a DHA é responsável por 4% da mortalidade e 5% dos anos de vida perdidos por incapacidade (*Disability Adjusted Life Years - DALYs*). Em 2010, quase meio milhão de mortes foram atribuídas à cirrose relacionada ao álcool;<sup>47</sup> uma em cada dez mortes atribuíveis ao álcool é devida à cirrose alcoólica, sendo que aproximadamente 50% da mortalidade atribuível ao álcool é em decorrência da presença de lesão hepática.<sup>3,47</sup> A prevalência da DHA é em torno de 2% da população geral dos Estados Unidos da América.<sup>48</sup> De acordo com o Relatório de Vigilância do Instituto Nacional de Alcoolismo e Abuso de Álcool sobre mortalidade em 2013, a cirrose foi a 12ª causa de morte nos Estados Unidos, com cerca de metade das mortes relacionadas à cirrose devido ao álcool. A taxa bruta de mortalidade por cirrose por qualquer etiologia foi de 12,0 óbitos por 100.000 habitantes, enquanto a taxa de cirrose relacionada ao álcool foi de 5,7, representando um aumento de 3,4% e 1,8% a partir de 2012, respectivamente.<sup>49,50</sup> Na União Europeia, 41% da mortalidade relacionada ao fígado é atribuível ao álcool.<sup>51</sup> Na Índia, o álcool é a causa mais comum de cirrose (34,3%) e quase 20% de todos os pacientes com doença hepática (independentemente da etiologia) são consumidores atuais de álcool.<sup>52</sup> Em 2015, a Ásia foi responsável por 54,3% da mortalidade global por cirrose, sendo 20,8% atribuível ao consumo de álcool.<sup>53</sup> A HA também é uma grande preocupação, pois a sua mortalidade é muito alta podendo chegar a 40% em seis meses.<sup>54</sup> Esses dados demonstram o quanto o consumo abusivo de álcool tem afetado a população em todo o mundo.

Alguns países implementaram medidas políticas para a redução do consumo e mortalidade por álcool, tais como o aumento de impostos sobre as vendas de bebidas alcoólicas, preço mínimo de venda do álcool, aumento da idade legal para a realização da compra, proibições de beber em locais públicos, redução de publicidade e ações

legais mais rígidas para dirigir sob efeito do álcool.<sup>55</sup> No entanto, essas medidas não estão sendo suficientes para minimizar os dados relatados acima.

### **2.2.1 Diagnóstico e Tratamento da Doença Hepática Alcoólica**

A DHA é uma doença clinicamente silenciosa para a maioria das pessoas, com poucos ou nenhum sintoma em pacientes com a doença em estágio inicial e cirrose compensada. O diagnóstico requer a documentação do uso crônico de álcool e a exclusão de outras causas de doença hepática. Assim, o diagnóstico depende da suspeita clínica, exames laboratoriais e de técnicas invasivas ou não invasivas.<sup>56</sup> A hipertrofia da glândula parótida bilateral, perda muscular, desnutrição, síndrome de Dupuytren e sinais de neuropatia periférica podem estar presentes em alguns pacientes com suspeita inicial de DHA. No entanto, a maior parte dos casos são assintomáticos e relutantes em admitir abertamente que seu comportamento de beber pode ser a razão de suas anomalias hepáticas. No exame físico de pacientes com diagnóstico de cirrose, os sinais típicos incluem ginecomastia, angiomas de aranha e eritema palmar. Adicionalmente, icterícia, encefalopatia hepática, ascite e edema periférico também podem ser visíveis à primeira vista em pacientes com doença hepática em estágio terminal. O diagnóstico de DHA é comprovado mediante documentação de consumo excessivo de álcool (> 40–50 g / dia) e a presença de anormalidades clínicas e/ou biológicas sugestivas de lesão hepática.<sup>57</sup> Complicações anteriores de cirrose hepática, como sangramento gastrointestinal, ascite, episódios de icterícia ou acidentes devido a encefalopatia ou embriaguez, relatadas pelo paciente ou acompanhante, são informações diagnósticas importantes.

Alterações nos exames laboratoriais, como volume corpuscular médio (VCM), gama glutamiltransferase (GGT) e aspartato aminotransferase (AST) e imunoglobulina

A (IgA), podem indicar a presença de DHA em estado inicial enquanto uma diminuição nos níveis de albumina, aumento da proporção normalizada internacional (INR), níveis elevados das bilirrubinas e/ou uma baixa contagem de plaquetas são sinais de DHA em estágio avançado. Muitos indivíduos que consomem elevada quantidade de álcool apresentam níveis aumentados de triglicerídeos e ácido úrico, este último frequentemente associado a crise de gota.<sup>58</sup> Marcadores específicos para o consumo de álcool incluem a transferrina deficiente em carboidratos (TDC) e etil-glicuronídeo (EtG).<sup>59</sup> Clinicamente, o GGT é o marcador mais utilizado para detectar o consumo prévio de álcool, porém, carece de especificidade e pode estar aumentado em decorrência de outras etiologias.<sup>60</sup> Em pacientes com diagnóstico de DHA, a relação AST/alanina aminotransferase (ALT) geralmente é maior que 1 e pode ser maior que 2 em pacientes com HA. No entanto, também pode ser encontrado em pacientes com cirrose avançada, por outras causas.

A realização de biópsia hepática não é recomendada na rotina de pacientes que possuem diagnóstico da doença em estágio inicial ou com cirrose alcoólica se os dados clínicos, analíticos e de imagem forem incontestáveis.<sup>56,61</sup> No entanto, a biópsia hepática pode ser útil para descartar etiologia não alcoólica ou quando os métodos não invasivos não forem suficientes para a obtenção de resultados favoráveis. Os achados típicos da biópsia hepática para os pacientes com DHA são esteatose, dano hepatocelular (balonização e/ou corpos de Mallory-Denk), infiltrado inflamatório composto de células polimorfonucleares (PMN) com predominância nos lóbulos, grau variável de fibrose e distorção lobular que pode progredir para cirrose e outros estádios mais avançados da doença.<sup>62</sup>

Recentemente o consórcio SALVE publicou um novo sistema de graduação e estadiamento da DHA. Ele conta com sete estágios diferentes de fibrose, desde a sua



ausência até a cirrose avançada. Além disso, utiliza escores semiquantitativos para esteatose, atividade (lesão hepatocelular e neutrófilos lobulares) e colestase. O seu valor prognóstico foi avaliado e validado em uma coorte de 445 pacientes com DHA inscritos em quatro centros europeus. Este sistema de graduação mostrou-se ser um método reprodutível e relevante quanto ao prognóstico para a avaliação histológica da atividade da doença e fibrose na DHA.<sup>63</sup>

O diagnóstico clínico da HA ocorre devido ao desenvolvimento rápido de icterícia e complicações relacionadas ao fígado, com bilirrubina total sérica maior que 3mg/dL, ALT e AST 1,5 vezes maior que o limite superior da normalidade, ou seja, maior que 400 U/l com a relação AST/ALT maior que 1,5 vezes, documentação de uso elevado de álcool até 8 semanas antes do início dos sintomas e exclusão de outras doenças hepáticas. Os corticosteroides fornecem benefícios de sobrevivência a curto prazo em cerca da metade dos pacientes tratados com HA grave e a mortalidade em longo prazo está relacionada à gravidade da doença hepática subjacente e depende da abstenção de álcool. As medidas gerais em pacientes hospitalizados com DHA incluem o manejo hospitalar das complicações de doença hepática, controle da síndrome da abstenção do álcool, vigilância de infecções, antibioticoterapia precoce eficaz, suplementação nutricional e tratamento do transtorno por uso de álcool subjacente. O transplante de fígado, uma opção de tratamento definitivo em pacientes com cirrose alcoólica avançada, também pode ser considerado em casos de HA, que não respondem à terapia médica.<sup>25</sup>

Atualmente não há nenhuma terapia aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de qualquer estágio de DHA. A abstenção prolongada é a estratégia mais eficaz para prevenir a progressão da doença. Portanto,

há uma necessidade clínica não atendida de desenvolver terapias mais eficazes e seguras para os pacientes com DHA.

### **2.2.2 Fisiopatologia da Doença Hepática Alcoólica**

Os mecanismos celulares e moleculares da patogênese da DHA não são completamente elucidados, mas parecem estar relacionados a uma complexa interação entre os fatores comportamentais, ambientais e genéticos. Os achados histológicos da DHA, compreendem a presença de esteatose, inflamação e fibrose resultantes de eventos fisiopatológicos consecutivos e inter-relacionados no contexto de exposição contínua ao álcool. Um componente essencial na progressão da DHA é a toxicidade direta do primeiro metabólito da degradação do álcool, o acetaldeído (AA).<sup>64</sup>

O álcool é metabolizado principalmente nas células parenquimatosas do fígado que constituem cerca de 70% da massa hepática.<sup>65</sup> Essas células expressam os níveis mais elevados das principais enzimas oxidantes do etanol, ADH, que está localizado no citosol, e citocromo P450 2E1 (CYP2E1), que reside no retículo endoplasmático liso (RE).<sup>66</sup> (Figura 2) Os hepatócitos também apresentam níveis elevados de catalase, uma enzima que habita os peroxissomos. A catalase normalmente realiza a desintoxicação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio. No entanto, quando o etanol está presente, a catalase tem um papel acessório no metabolismo do etanol, usando  $H_2O_2$  para oxidar o etanol a acetaldeído. A oxidação do etanol pela catalase é uma via relativamente secundária no fígado, mas tem uma função de oxidação do etanol maior no cérebro.<sup>67</sup>

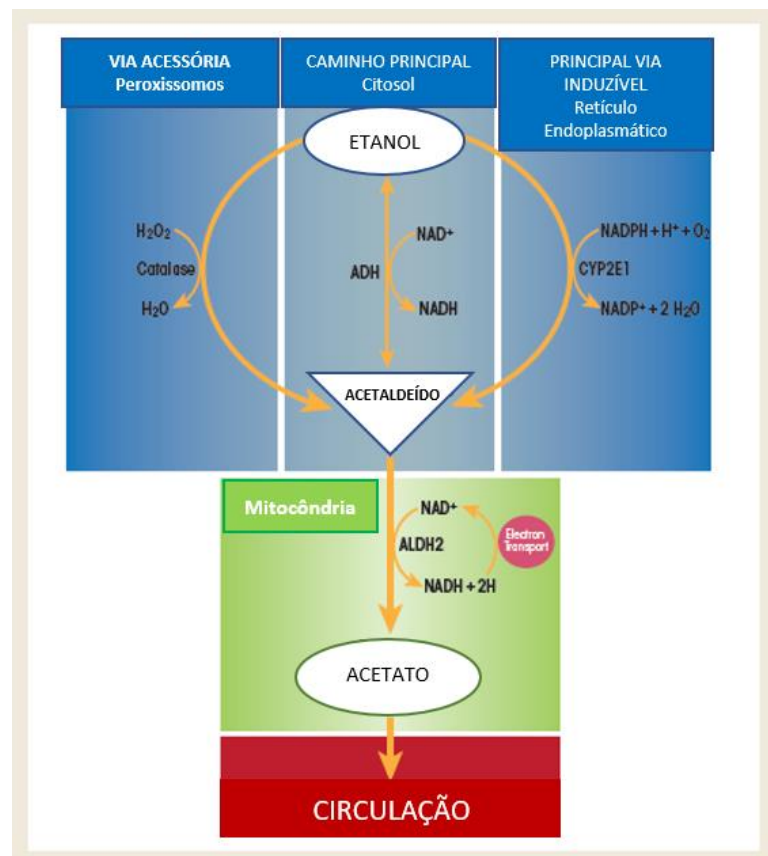
O ADH é a enzima metabolizadora de etanol mais eficiente. Atinge a metade da velocidade máxima quando os níveis de etanol em circulação são cerca de 5 a

10mg/dl, bem abaixo dos níveis que causam intoxicação. A oxidação do etanol catalisada por ADH usa nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ ) como cofator, gerando  $\text{NAD}^+$  ( $\text{NADH}$ ) e acetaldeído reduzidos. O último composto é altamente reativo e tóxico. Ele pode se ligar covalentemente a proteínas,<sup>68</sup> lipídeos,<sup>69</sup> e ácidos nucleicos<sup>70</sup> para formar adutos de acetaldeído, que, por sua vez, podem interromper a estrutura e função dessas macromoléculas.<sup>71</sup> Uma maneira dos hepatócitos minimizarem a toxicidade do acetaldeído é oxidando-o rapidamente a acetato usando a enzima aldeído desidrogenase 2 (ALDH2) dentro da mitocôndria. A reação ALDH2 é outra etapa de oxidação-redução que gera  $\text{NADH}$  e acetato, o último dos quais pode se difundir na circulação para ser utilizado em outras vias metabólicas. A geração aumentada de  $\text{NADH}$  por ambas as reações catalisadas por ADH e ALDH2 diminui a relação  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$  intra-hepática normal, chamada de potencial redox celular. Essa mudança causa mudanças metabólicas significativas do metabolismo oxidativo para a síntese redutiva, favorecendo a formação de ácidos graxos, que contribuem para o desenvolvimento da esteatose hepática.<sup>72</sup>

A CYP2E1 é a outra enzima hepática importante que catalisa a oxidação do etanol em acetaldeído. Embora a eficiência catalítica do CYP2E1 seja consideravelmente mais lenta que a do ADH, o CYP2E1 tem uma capacidade 10 vezes maior de se ligar ao etanol, tornando-se semissaturado a 46 a 92mg/dl. A CYP2E1 é uma enzima induzível; seu conteúdo hepatocelular aumenta durante o consumo crônico de etanol.<sup>73,74</sup> O etanol interage diretamente com a proteína CYP2E1, fazendo com que ele assumira uma conformação que resiste à degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma, resultando no acúmulo de moléculas CYP2E1.<sup>75</sup> A indução do CYP2E1 tem vários efeitos importantes em pessoas que consomem elevada quantidade de álcool: primeiro, porque mais CYP2E1 oxida o etanol, os

bebedores desenvolvem uma “tolerância metabólica” - isto é, eles precisam beber mais álcool para atingir um nível de intoxicação que antes alcançavam depois de beber menos álcool. Em segundo lugar, o metabolismo acelerado do álcool por níveis mais elevados de CYP2E1 coloca as células do fígado em perigo metabólico, porque mais CYP2E1 não apenas produz mais acetaldeído, mas a enzima induzida também gera maior quantidade de outras espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo radicais hidroxietil (ou seja, formas de radicais livres de etanol), ânions superóxido ( $O_2^-$ ) e radicais hidroxila ( $\cdot OH$ ). A geração contínua dessas moléculas reativas em pessoas que consomem elevada quantidade de álcool acaba criando a condição conhecida como estresse oxidativo. Nessa condição, a taxa de geração de ROS excede a capacidade do fígado de neutralizá-los com os antioxidantes naturais, tais como glutatona e vitaminas E, A e C, ou removê-los usando enzimas antioxidantes (cobre-zinco-superóxido dismutase, manganês-superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase, glutatona redutase e glutatona-s-transferase)<sup>76</sup>. Estudos experimentais demonstram que o consumo crônico de etanol diminui as atividades e/ou quantidades de várias enzimas antioxidantes, o que piora a carga oxidante dos hepatócitos.<sup>77,78</sup> O estresse oxidativo é ainda mais exacerbado quando as ROS geradas sofrem reações secundárias com proteínas e lipídeos insaturados. As últimas reações resultam na geração de peróxidos lipídicos, que interagem com as proteínas e com o acetaldeído para formar adutos (por exemplo, adutos de malondialdeído-acetaldeído) que são capazes de gerar uma resposta imune.<sup>79</sup> Com a ingestão excessiva de álcool, o dano oxidativo supera a capacidade de reparo celular com consequente apoptose.<sup>80</sup> É importante ressaltar que o AA também é um carcinógeno poderoso em animais experimentais e em humanos, e é considerado um motivo importante para a associação de certos tipos de câncer com o consumo de álcool.<sup>81</sup>

Embora os hepatócitos constituam a maior parte da massa hepática, as células não parenquimatosas, incluindo as células de Kupffer (KCs), células endoteliais sinusoidais, células estreladas hepáticas (HSCs) e os linfócitos associados ao fígado constituem os 15 a 30% restantes da massa hepática. Essas células não parenquimatosas interagem com os hepatócitos e entre si por meio de mediadores solúveis e por contato direto célula a célula. Cada tipo de célula hepática desempenha um papel específico não apenas na fisiologia hepática normal, mas também no início e na perpetuação da lesão hepática.<sup>82</sup>



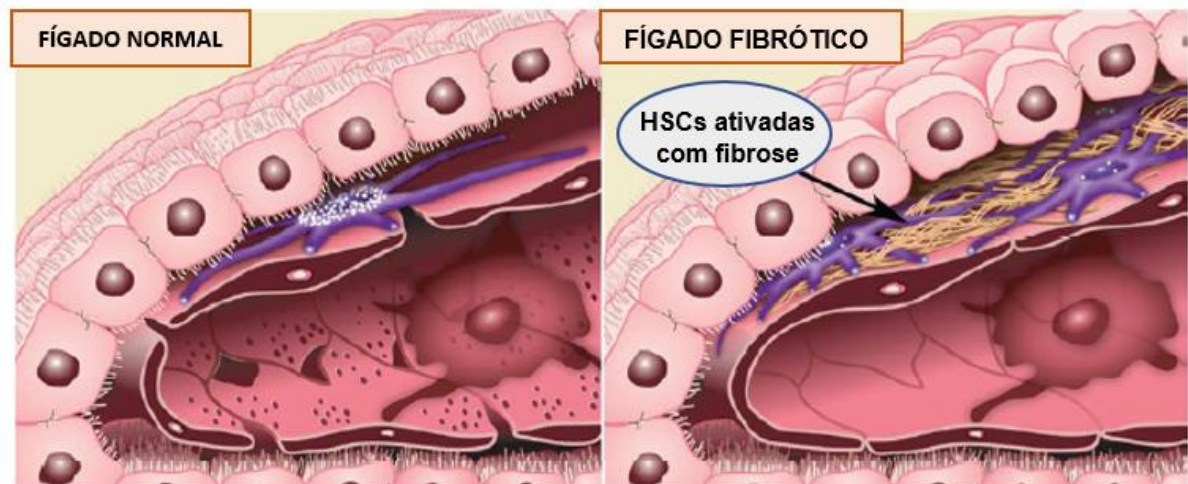
**Figura 2: Vias principais e secundárias de oxidação do etanol no fígado.** O etanol é oxidado principalmente nos hepatócitos do fígado. (Painel do meio) Álcool desidrogenase (ADH), uma enzima importante no citosol, e aldeído desidrogenase 2 (ALDH2), que está localizado na mitocôndria, catalisam oxidações sequenciais que convertem etanol em acetato, produzindo dois equivalentes molares de dinucleotídeo de adenina nicotinamida reduzido (NADH). (Painel direito) O citocromo P450 2E1 (CYP2E1) é a principal oxidorredutase induzível no retículo endoplasmático que oxida o etanol, na presença de oxigênio molecular (O<sub>2</sub>), em acetaldeído e converte NAD fosfato reduzido (NADPH) em sua forma oxidada, gerando água. (Painel esquerdo) A catalase peroxissômica é uma via hepática secundária de oxidação do etanol que usa peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para oxidar o etanol a acetaldeído e água. Fonte: adaptado de Zakhari and Li (2007).<sup>66</sup>

A lesão hepática inicial, a esteatose, ocorre em decorrência da alteração da renovação dos lipídeos.<sup>28</sup> A diminuição da oxidação de ácidos graxos, aumento da síntese de ácidos graxos e triglicerídeos, aumento da entrada de gordura no fígado por mobilização de ácidos graxos dos depósitos de gordura periféricos e via quilomícrons do intestino são as rotas para ocorrência do acúmulo da gordura no fígado.<sup>83</sup> Além disso, o aumento da lipogênese por desregulação de enzimas esteatogênicas e fatores de transcrição, incluindo a *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBP-1c), *peroxisome proliferator-activated receptor-α* (PPAR-α) e proteína de transporte de triglicerídeo microsomal estão envolvidos. Recentemente foi demonstrado o papel das enzimas proteicas envolvidas no processamento de lipídeos, como PNPLA3 e TM6SF2, para as quais foram encontradas variantes genéticas dos genes codificadores associados com DHA. No entanto, não está elucidado como o consumo de álcool afeta a função dessas enzimas ou como esse processo é ocasionado.<sup>82</sup>

A inflamação é uma característica importante na esteatose alcoólica resultando em EH, induzir fibrogênese levando à fibrose, cirrose e até ao CHC. Histologicamente, a EH é caracterizada por graus variáveis de esteatose, infiltrado inflamatório típico que consiste em células predominantemente PMN, balonização de hepatócitos centrolobulares, corpúsculos de inclusão de Mallory e uma rede de fibrose.<sup>84</sup> Uma via patogênica chave neste estágio é o eixo intestino-fígado. Assim, a ingestão de álcool aumenta a permeabilidade intestinal e promove a translocação de endotoxinas de bactérias Gram negativas, como lipopolissacarídeos (LPS) para a corrente sanguínea portal para atingir as KCs que, após a ligação de LPS ao receptor de endotoxina CD14, ativam a via de sinalização independente da resposta primária da diferenciação mielóide 88 através do receptor *toll-like* 4 (TLR4), com produção consecutiva de

citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que contribuem para o dano hepatocelular.<sup>85,86</sup> Citocinas e quimiocinas estão envolvidas na ativação e recrutamento de células inflamatórias e mesenquimais contribuindo para o processo de inflamação e reparo fibrótico na DHA. São elas, as interleucinas (IL)-1 $\beta$ , IL-8 e IL-17, osteopontina, quimiocina (CXCL) 1, CXCL4, CXCL5 e CXCL6.<sup>86,87</sup>

A lesão-chave na doença hepática crônica é a fibrose que, em essência, se assemelha ao processo de cicatrização excessiva como resultado do aumento da fibrogênese e diminuição da fibrólise. Na fibrose progressiva, o parênquima hepático é substituído pelo excesso de matriz extracelular produzida por HSC e miofibroblastos (MFB), resultando em uma arquitetura hepática distorcida e no comprometimento funcional progressivo.<sup>88,89,90</sup> (Figura 3) Vários gatilhos podem ser os responsáveis pela ativação das KCs e outras células inflamatórias que levam à produção de citocinas pró-fibrogênicas, entre eles o fator de crescimento derivado de plaquetas e o fator de crescimento transformador- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) que podem estimular as HSC e MFB a produzir colágenos, glicoproteínas não colágenas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos até 10 vezes em comparação com o tecido hepático normal. Aqui, os colágenos formadores de fibrilas tipo I e III representam mais que 80% do colágeno total do fígado. Por sua vez, as enzimas de degradação da matriz denominadas metaloproteinases da matriz são reguladas negativamente pelos seus inibidores de tecido correspondentes. Na DHA, as HSCs e MFBs podem ser estimuladas por AA, ROS,<sup>91</sup> leptina,<sup>92</sup> endocanabinoides<sup>93</sup> e peróxidos lipídicos<sup>94</sup>.



**Figura 3: Desenvolvimento da fibrose.** As células estreladas hepáticas (HSCs) são peças-chave no desenvolvimento da fibrose. HSCs normalmente residem no espaço de Disse como células quiescentes de armazenamento de lipídios (retinil-éster). O consumo crônico de etanol inicia um processo de ativação complexo que transforma esses HSCs quiescentes em um estado ativado. HSCs ativados secretam grandes quantidades de proteínas da matriz extracelular que formam cicatrizes. Isso, por sua vez, contribui para alterações estruturais no fígado, como a perda de microvilosidades de hepatócitos e fenestras endoteliais sinusoidais, causando, em última instância, a deterioração da função hepática. Fonte: Adaptado de Friedman (2000).<sup>90</sup>

Uma das principais complicações da DHA é o CHC, e a grande maioria dos CHC se desenvolve no contexto de cirrose alcoólica.<sup>95</sup> Além da transformação da cirrose como condição pré-cancerosa, vários aspectos fisiopatológicos são específicos do CHC associado ao álcool. Um importante gatilho do desenvolvimento do tumor é o AA, que não é apenas uma toxina, mas também um mutagênico altamente reativo que forma adutos de DNA estáveis, causa mutação de ponto, trocas de cromátides irmãs e inibe o reparo de DNA.<sup>96</sup> Outros mecanismos moleculares envolvidos neste processo são as modificações epigenéticas do álcool, alterando a metilação do DNA.<sup>97</sup>

### 2.2.3 Nutrição na Doença Hepática Alcoólica

Pacientes com DHA inicial geralmente estão adequadamente nutridos, porém aqueles com a doença mais avançada, e com HA em particular, revelam sinais clínicos



significativos de desnutrição e sarcopenia.<sup>98</sup> Até 60% dos alcoolistas com cirrose e quase a totalidade destes pacientes que estão hospitalizados revelam algum grau de desnutrição que agrava com a progressão da doença.<sup>99</sup>

Embora o álcool forneça 7,1 kcal/g de energia, que é mais do que os carboidratos (4,1 kcal/g), os pacientes com DHA avançada frequentemente apresentam desnutrição primária e secundária severa e, particularmente, desnutrição energética proteica.<sup>99</sup> Portanto, o suporte nutricional adequado é recomendado em diretrizes.<sup>56,61,100</sup>

As causas da desnutrição primária na DHA incluem: (1) baixa ingestão alimentar devido à composição desequilibrada da dieta ou substituição das calorias dos alimentos pelas calorias derivadas do álcool; (2) falta de apetite relacionada a disgeusia, esofagite, gastrite, mau estado dentário; (3) falta de palatabilidade de dietas com baixo teor de sódio; (4) má absorção por causa de diarreia, insuficiência pancreática exógena; e (5) complicações de doença hepática, por exemplo, ascite, encefalopatia hepática. Além da ingestão alimentar inadequada, o consumo excessivo de álcool também pode levar a interações profundas com o metabolismo de vários micronutrientes. A absorção e a biodisponibilidade de uma ampla gama de vitaminas solúveis em água e gordura, bem como oligoelementos, são influenciados pelo consumo abusivo de álcool e devem ser avaliadas ao tratar o paciente.<sup>25</sup>

Enquanto os ensaios clínicos, até o momento, não conseguiram demonstrar auxílio da terapia nutricional parenteral na DHA,<sup>101</sup> outros estudos forneceram evidências para um benefício do suporte nutricional enteral em vários marcadores substitutos do estado nutricional, como balanço de nitrogênio, variáveis antropométricas e sobrevida.<sup>99</sup> Vários estudos sugerem um benefício da suplementação de dietas com os aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e

isoleucina para manter a ingestão adequada de proteínas, sem ocasionar o agravamento da encefalopatia hepática em pacientes cirróticos intolerantes a proteínas,<sup>102,103</sup> no entanto uma análise da Cochrane de 37 ensaios clínicos não restritos a DHA demonstrou apenas evidências fracas que apoiam o uso rotineiro de nutrição parenteral, nutrição enteral ou suplementos nutricionais orais em pacientes com doença hepática. Os benefícios da terapia nutricional foram limitados a desfechos fracos, como melhores níveis de bilirrubina e um melhor balanço de nitrogênio em pacientes tratados ativamente com nutrição, contudo, não houve o prolongamento da sobrevida.<sup>101</sup>

Do ponto de vista prático, as diretrizes atuais para pacientes com DHA mais avançada recomendam a ingestão alimentar de 1,2 a 1,5 g de proteína / kg e 35 a 30 kcal / kg de peso corporal e refeições frequentes incluindo lanche noturno.<sup>21,56,61,100</sup> Considerando as numerosas deficiências de micronutrientes verificadas no estágio avançado da doença, a suplementação adequada destes também é recomendada.

Em pacientes com HA grave, a prevalência de desnutrição chega a quase 100% e foi demonstrada uma correlação significativa do estado da desnutrição com a sobrevida a curto e a longo prazo.<sup>104</sup> Estudos randomizados controlados mostraram melhora no estado nutricional, mas com dados controversos sobre o benefício de sobrevida com a suplementação enteral<sup>105,106</sup> ou suplementação parenteral para a HA. Um estudo demonstrou que a suplementação enteral na HA grave não demonstra um efeito benéfico na sobrevida, porém acontece mais mortes de pacientes com ingestão calórica diária menor de 21,5 kcal/kg por dia em comparação aos casos com maior ingestão de calorias.<sup>107</sup> Neste sentido, é recomendado o acompanhamento da ingestão calórica destes pacientes. A via enteral, devido ao seu baixo custo, segurança e menor risco de infecções, é a via preferencial. A sonda de alimentação

pode ser inserida com segurança na presença de varizes esofágicas sem sangramento ativo ou em situações em que o paciente não tenha passado por bandagem endoscópica de varizes.<sup>107</sup>

### **2.3 Microbiota Intestinal**

O intestino é o maior reservatório de microrganismos do corpo. Na verdade, o lúmen gastrointestinal humano é o habitat fisiológico para diversos micróbios (bactérias, arqueias, fungos, leveduras e vírus). Inclui dezenas de trilhões de células microbianas pertencentes a várias espécies diferentes que carregam mais de três milhões de genes únicos.<sup>108,109</sup> A maioria das espécies bacterianas pertencem aos filos *Firmicutes* (Gram positivos) e *Bacteroidetes* (Gram negativos), enquanto os remanescentes pertencem aos filos *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*.<sup>110</sup> O trato gastrointestinal e sua microbiota estão em relação simbiótica. De fato, 85% do total de bactérias, como por exemplo *Lactobacilli* e *Bifidobacteria*, são organismos comensais, enquanto os outros, como por exemplo *Clostridium* e *Fusobacterium*, podem potencialmente se tornar patógenos.<sup>111</sup>

O papel exato da microbiota permanece amplamente inexplorado. No entanto, é sabido que a presença de micróbios no intestino participa da síntese de vitaminas e aminoácidos, catabolismo de macromoléculas, fornecimento de energia, metabolismo de drogas e toxinas e preservação da barreira intestinal. Todos os desequilíbrios ou alterações na composição e / ou função taxonômica da microbiota intestinal são geralmente indicados como 'disbiose'.<sup>112</sup> Em particular, as alterações da homeostase da microbiota têm um impacto não apenas nas doenças hepáticas relacionadas ao álcool, mas também foram associadas a outras condições clínicas, tais como diabetes tipo II,<sup>113</sup> obesidade,<sup>114</sup> doença inflamatória intestinal,<sup>115</sup> síndrome do intestino

irritável,<sup>116</sup> doença celíaca,<sup>117</sup> câncer<sup>118</sup> e outras. Na verdade, a microbiota intestinal interage com o hospedeiro, evitando o crescimento excessivo de bactérias patogênicas, modulando o sistema imunológico e a tolerância imunológica das células da mucosa e estimulando a produção de IgA específica para patógenos.<sup>119</sup>

A concentração e a composição das espécies bacterianas são diferentes ao longo do TGI, com variação interindividual dependendo da idade, etnia, estilo de vida, medicamentos e hábitos alimentares.<sup>111</sup> O consumo de álcool juntamente com a dieta ocidental, enriquecida em gordura animal e açúcares, frequência de evacuação, genética e perturbação dos ritmos circadianos podem predispor à disbiose, conforme demonstrado em estudos experimentais<sup>120,121</sup> e em humanos<sup>122,123,124</sup>.

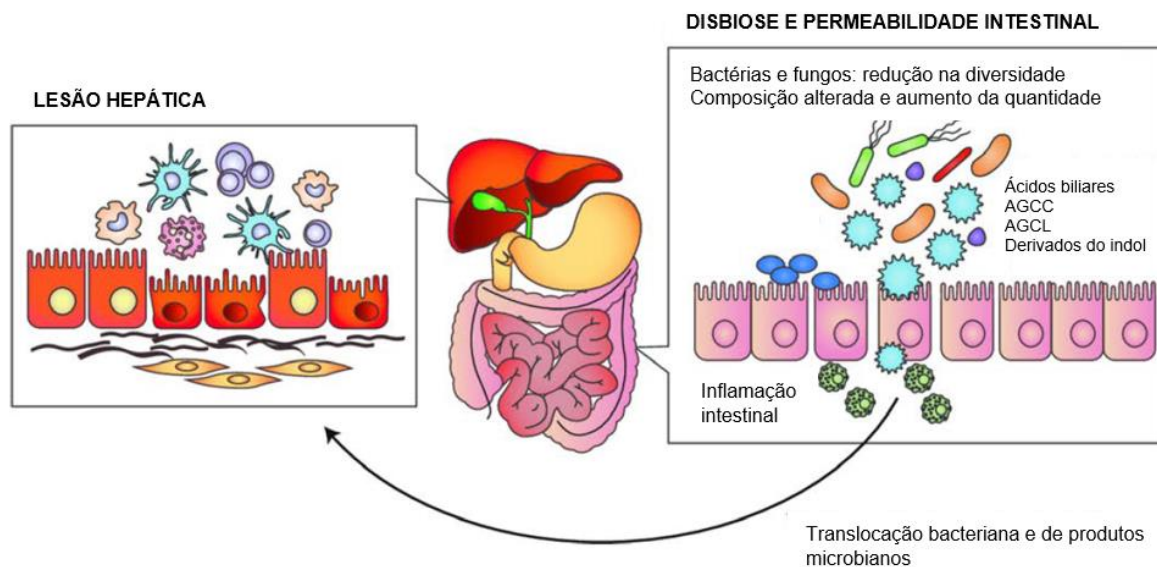
A função fisiológica da microbiota intestinal na produção de metabólitos (ou seja, endotoxinas, ácidos biliares e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), produtos da fermentação de resíduos alimentares não absorvidos, principalmente carboidratos usados como fonte de energia para o hospedeiro) pode ser avaliada usando abordagens metabolômica, proteômica e transcriptômica. Na verdade, a concentração intestinal, sistêmica e fecal de produtos bacterianos reflete potencialmente a composição da microbiota e pode ser explorada como um marcador diagnóstico não invasivo. Além disso, o sequenciamento do gene 16S do RNA ribossômico (rRNA) por meio do sequenciamento de DNA de última geração é amplamente utilizado para determinar a diversidade da comunidade bacteriana e sua abundância relativa em biópsias de tecido colônico associadas à mucosa e em amostras fecais.<sup>124</sup>

### **2.3.1 Microbiota intestinal na Doença Hepática Alcoólica**

O fluxo bidirecional entre o intestino e fígado através do trato biliar, veia porta e circulação sistêmica representa uma via crucial na patologia hepática. Em particular,

o fígado modula a composição da microbiota intestinal, exercendo funções múltiplas (ou seja, produção de ácido biliar) e participando da circulação enterohepática, que é responsável pelos produtos finais bacterianos intestinais e de nutrientes recebidos através da veia porta. O eixo intestino-fígado também tem implicações para a resposta imune intestinal, função de barreira intestinal e inflamação hepática e sistêmica.<sup>125</sup> A fronteira intermediária que separa o eixo intestino-fígado é representada pela barreira intestinal, composta por múltiplas camadas que revestem o intestino e protegem o hospedeiro da invasão de microrganismos. Esta barreira não é apenas uma barreira física seletivamente permeável constituída por células epiteliais intestinais justapostas mantidas juntas por junções apertadas (occludinas, claudinas e zônula ocludente 1), junções aderentes e desmossomos, mas também tem propriedades imunológicas, devido à presença da camada de muco. Esta camada é composta por mucina (predominantemente Muc2 no intestino delgado e grosso) secretada pelas células caliciformes e atua como barreira física, química e imunológica, protegendo também as células da mucosa contra agentes exógenos. Na verdade, pode servir como sítios de ligação para microrganismos comensais na superfície, que são considerados uma barreira para a colonização de patógenos.<sup>126</sup>

O abuso de álcool desencadeia modificações qualitativas e quantitativas na composição taxonômica da microbiota intestinal, inflamação da mucosa e desarranjo da barreira intestinal. A hiperpermeabilidade intestinal resulta na translocação de bactérias patogênicas, produtos microbianos gram-negativos e metabólitos luminiais pró-inflamatórios para a corrente sanguínea, ocasionando um maior dano hepático induzido pelo álcool.<sup>127</sup> (Figura 4) Mudanças no metabolismo microbiano afetam os metabólitos intestinais, incluindo ácidos biliares,<sup>128,129</sup> AGCC,<sup>130</sup> ácidos graxos de cadeia longa (AGCL),<sup>131</sup> derivados de indol<sup>132</sup> e possivelmente outras moléculas.



**Figura 4: Contribuição da microbiota intestinal para a DHA.** AGCC: ácidos graxos de cadeia curta; AGCL: ácidos graxos de cadeia longa. Fonte: Adaptado de Avila (2020).<sup>127</sup>

O consumo de álcool é responsável por modificações substanciais na qualidade e quantidade da microbiota intestinal, alteração da mucosa e aumento da permeabilidade intestinal, resultando em endotoxemia.<sup>133</sup> A disbiose intestinal e o aumento da permeabilidade intestinal têm um papel fundamental na patogênese da DHA.<sup>134</sup> Especificamente, o aumento da permeabilidade intestinal devido ao abuso de álcool leva a maior concentração de LPS<sup>134,135</sup> no fluxo sanguíneo portal que se liga ao receptor *toll-like 4* (TLR4) e ativa o fator nuclear kappa- $\beta$  (NF - $\kappa$  $\beta$ ) estimulando, por sua vez, a liberação de citocinas pró-inflamatórias, a produção de ROS e o estresse oxidativo. Todos esses eventos podem induzir a ativação de macrófagos residentes, KCs e HSCs, perpetuando a inflamação e a fibrose no fígado.<sup>136,137</sup> A DHA está associada à síntese reduzida de ácidos graxos de cadeia longa.<sup>138</sup> A disbiose induzida por álcool aumenta a concentração intestinal de ácidos biliares não conjugados, resultando na regulação negativa do receptor farnesoide X, que é o receptor de ácidos biliares.<sup>138</sup>

O uso indevido de álcool facilita o supercrescimento bacteriano intestinal predominantemente no intestino delgado superior, tanto em modelos experimentais quanto em humanos.<sup>139,140</sup> Os modelos pré-clínicos são particularmente úteis na compreensão das implicações da administração do álcool na disbiose e crescimento excessivo de bactérias. Camundongos alimentados com álcool por três semanas desenvolveram a DHA, relacionada a disbiose intestinal. Esses ratos demonstraram um desequilíbrio de famílias bacterianas, exibindo uma redução de bactérias do filo *Firmicutes* e, inversamente, uma abundância aumentada de *Bacteroidetes* e *Verrucomicrobia*.<sup>139</sup>

A variabilidade na composição bacteriana intestinal de pacientes com a ingestão excessiva de álcool crônico em comparação com pessoas que não consumiam ou que consumiam muito pouco bebidas alcoólicas foram avaliadas e os pacientes com alta ingestão de álcool tinham uma microbiota potencialmente mais inflamatória, juntamente com uma maior abundância de *Proteobacteria* (gram-negativas) no intestino, no nível do filo, e um aumento particular dos gêneros *Clostridium*, *Holdemania* (*Firmicutes*) e *Sutterella* (*Proteobacteria*). Neste estudo, também foi observado uma quantidade relativa menor do gênero *Faecalibacterium*, que contrapõe com outros achados; este gênero de bactéria é considerado protetor contra doenças gastrointestinais. Adicionalmente, entre os AGCC avaliados, os autores encontraram uma menor concentração de ácido butírico nas fezes de pessoas que consomem excessivamente álcool; composto benéfico para a manutenção da integridade da barreira intestinal.<sup>141</sup>

## 2.4 Modelos Experimentais de Doença Hepática Alcoólica

O estudo da DHA em modelos animais é difícil, uma vez que são necessário modelos que reproduzam efetivamente os padrões de consumo alcoólico e espelhem o espectro e a gravidade da lesão hepática induzida pelo álcool em humanos. Até o presente momento não se tem um modelo de fácil reprodutibilidade e que seja viável para todos os centros de pesquisa.<sup>142,143</sup> Os roedores são notoriamente resistentes aos efeitos hepatotóxicos do álcool, devido às diferenças relacionadas às espécies no metabolismo do mesmo. Ratos e camundongos podem desenvolvem algum tipo de lesão hepática crônica quando expostos ao álcool em combinação com uma segunda toxina (por exemplo, tetracloreto de carbono e tioacetamida), ou manipulações dietéticas (por exemplo, deficiência de colina/metionina e dietas hiperlipídicas), ou ainda modificações genéticas; e mesmo assim, com essas combinações, ainda não reproduzem um quadro histológico que modele totalmente a DHA avançada humana.<sup>143</sup>

Na literatura estão descritos alguns modelos pré-clínicos em roedores que reproduzem os diferentes graus da doença. Em geral, o álcool que é usado nesses modelos experimentais é o etanol. A seguir, estão as linhas de estudos que são utilizadas: modelos que simulam o consumo compulsivo (agudo) de álcool, referido como *binge* alcoólico; modelos onde os animais tem acesso *ad libitum* a alimentação crônica com álcool através de uma dieta específica ou de uma solução alcoólica na água de beber;<sup>144</sup> modelos onde a alimentação dos animais é realizado por infusão intragástrica;<sup>145,146,147</sup> e ainda modelos que combinam o álcool com outros fatores (*hit* adicional) ou associam o modo de consumo crônico com o agudo.<sup>142,148</sup>

O *binge* alcóolico é realizado por gavagem nos roedores, sendo um método de fácil reprodução e baixo custo. Alguns estudos reproduzem uma única dose de *binge*



algumas horas antes da eutanásia (geralmente 9 horas antes), outros realizam sobrecargas sucessivas. Em modelos que empregam uma única sobrecarga, com doses que variam de 3 a 7g de etanol por quilograma de peso do animal, pode ser induzido leve aumento de ALT de forma dose dependente,<sup>149,150,151,152</sup> bem como aumento da permeabilidade intestinal<sup>153</sup>. Em modelos onde os roedores são expostos a *binge* tripla, em intervalos de 12 em 12 horas antes da eutanásia, com doses que variam de 4,5 a 6g/kg, além dos sinais relatados acima, costuma ocorrer esteatose hepática microvesicular, com aumento de TG hepático, citocinas pró-inflamatórias hepáticas, estresse oxidativo e endotoxinas plasmáticas.<sup>154,155</sup>

O modelo experimental mais amplamente utilizado oferece uma administração crônica *ad libitum* de álcool, através de uma dieta líquida contendo etanol, chamada de Lieber-DeCarli. Para o desenvolvimento da DHA, a dieta é rica em gordura monoinsaturada, pobre em carboidrato e a concentração de etanol geralmente utilizada é de 5% v/v. No entanto, podem haver alterações na composição nutricional desta dieta conforme objetivos específicos das pesquisas. A alimentação dos roedores com essa dieta, mesmo por períodos mais longos, geralmente causa pouca esteatose hepática, pouca ou nenhuma inflamação e não resulta em fibrose<sup>149,156,157,158</sup>. Uma desvantagem de seu uso é o custo elevado. Apesar disso, estudos a utilizam em outros modelos, parecendo ter uma influência positiva no desenvolvimento da DHA.<sup>145,147</sup> Seguindo na linha do consumo crônico de álcool também existem modelos onde a oferta de álcool é *ad libitum* através da água de beber. Este, foi um dos primeiros modelos animais usados para o estudo de DHA em roedores.<sup>159</sup> O álcool é administrado na água potável, servindo como única fonte de líquido para os animais, enquanto têm livre acesso a uma dieta padrão. O modelo de alimentação *ad libitum* é simples de executar, fácil de manipular a concentração

precisa de etanol na água e de baixo custo. O consumo “voluntário” de álcool na água de beber com a dieta normal imita o padrão de consumo típico em humanos. Em parte, devido à sua grande flexibilidade, os protocolos usados em diferentes estudos têm variado consideravelmente. A concentração da solução de etanol pode variar de 10 a 40% (v/v), e o período de administração da solução alcoólica também varia de 8 ou mais semanas, sem mortalidade significativa. Na maioria dos estudos, o modelo de alimentação *ad libitum* de etanol na água de beber induziu somente esteatose leve e pouca elevação nos níveis de ALT, sem fibrose ou cirrose.<sup>160,161,162,163</sup> Além disso, os roedores mostram forte aversão natural ao álcool, pois tendem a beber menos etanol do que o esperado.<sup>164</sup>

O modelo de administração crônica de etanol intragástrica (IG) é conhecido como o modelo de Tsukamoto-French. Fornece a distribuição direta de nutrientes ao estômago ou intestino por meio da implantação cirúrgica de um cateter,<sup>145</sup> contornando a limitação da aversão do álcool observada em roedores. Para administração da dieta líquida é utilizado uma espécie de bomba de infusão para cada animal e a dieta administrada nesses modelos tem sido a dieta líquida Lieber-DeCarli. O período experimental é geralmente de dois a três meses e a manutenção ao acesso do trato gastrointestinal com o passar dos dias costuma ser um desafio.<sup>165</sup> Se o término experimental alcançado, é possível a verificação da presença de esteatose hepática severa, com inflamação e fibrose leve, sendo esse o modelo que mais se aproxima da DHA grave observada em humano.<sup>145</sup> Entretanto é um modelo tecnicamente complicado e trabalhoso,<sup>147,166</sup> pois, além de utilizar a dieta Lieber-DeCarli, é necessário o emprego de uma bomba de infusão para cada animal (Figura 5), encarecendo ainda mais o modelo. Além do que, a taxa de mortalidade é alta, em

decorrência do procedimento invasivo, intercorrências cirúrgicas e a necessidade de acompanhamento constante dos animais por pessoas especializadas.<sup>167</sup>



**Figura 5: Modelo de Tsukamoto-French.** A) Implantação cirúrgica do cateter no estômago do animal, sutura e saída do cateter no dorso do pescoço do animal. B) Sistema de alimentação com bomba de infusão. Fonte: Adaptado de Ueno, *et al.* (2012).<sup>147</sup>

Os modelos com golpe adicional combinam a administração de álcool com outros fatores a fim de facilitar a progressão para DHA avançada como por exemplo: uma intervenção dietética (dieta rica em gordura ou com LPS, dieta deficiente em colina e metionina), consumo crônico e agudo concomitante, ou a utilização de roedores nocaute. Além destes exemplos, foi desenvolvido outro modelo no Instituto Nacional de Abuso de Álcool e Alcoolismo do *National Institutes of Health* em 2013, que simula o padrão de consumo crônico de álcool e ainda momentos de consumo compulsivo. Alguns estudos realizados com esse objetivo ofereceram a dieta líquida Lieber-DeCarli com etanol de forma crônica e a *binge* alcoólica na dose de 5g/kg simulando o consumo agudo. Este modelo induz ao aumento dos níveis de ALT e AST séricos, TGs hepáticos, lipogênese hepática<sup>166,168,169,170,171</sup> e estresse oxidativo hepático, além de promover uma lesão hepática robusta mediada por neutrófilos, sendo esta última uma característica clínica da HA.<sup>54,148,171</sup> A alimentação crônica associada a alimentação aguda com etanol pode atingir níveis de álcool no sangue marcadamente mais altos em comparação com eles isolados.<sup>173</sup> A incorporação do

modo de consumo crônico com agudo em modelos animais pode recapitular certos componentes da doença humana e pode ajudar a delinear mecanismo que contribuem para o desenvolvimento de DHA progressiva.<sup>174</sup>

Embora existam vários modelos experimentais de DHA, há diferenças da doença entre humanos e roedores nas formas leve e precoce da doença. Na DHA humana, as análises de função hepática sérica e a histologia do fígado revelam altas concentrações das enzimas ALT e AST, esteatose, infiltração de neutrófilos e a degenerações hialinas celulares (corpúsculo de Mallory-Denk) no fígado.<sup>148</sup> Os modelos de DHA em roedores ainda não refletem a patologia humana observada em cada estágio da doença, sendo um impeditivo para o estudo mais aprofundado da DHA.

### **3. JUSTIFICATIVA**

A DHA é uma das principais causas de doença hepática aguda e crônica em todo o mundo, no entanto, ainda é dada pouca atenção para essa doença.

Sendo a DHA uma doença grave, faltam marcadores adequados de prognóstico e especialmente medidas terapêuticas eficientes. A microbiota intestinal e as funções da barreira intestinal têm demonstrado desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento e progressão das doenças no fígado, incluindo a DHA. Na presença de disbiose intestinal e da ruptura da barreira intestinal acontece o aumento da translocação de bactérias e subprodutos bacterianos, estimulando as células hepáticas a desencadear uma resposta inflamatória. Assim, intervir na microbiota intestinal pode ser uma forma de tratar a DHA. Há espaço para estudos que avaliem potenciais alvos terapêuticos na doença, o que inclui modelos animais. Entretanto, estudos experimentais em DHA ainda são limitados e difíceis de serem reproduzidos.

Desta forma, justifica este estudo o desenvolvimento de um modelo experimental de DHA que seja reprodutível, de custo razoável, e simule as alterações bioquímicas e inflamatórias que ocorrem na doença em humanos, incluindo alterações na microbiota intestinal, para que possam ser avaliadas alternativas terapêuticas futuras.

#### **4. QUESTÕES DE PESQUISA**

1- A administração crônica de etanol em ratos *Wistar*, seguida de sobrecarga alcoólica, pode levar a anormalidades bioquímicas, inflamatórias e histológicas semelhantes às que ocorrem na doença hepática alcoólica em humanos?

2- O modelo experimental é capaz de induzir disbiose intestinal?

## **5. HIPÓTESES**

1- A administração crônica de etanol em ratos *Wistar*, seguida de sobrecarga alcoólica pode levar a alterações bioquímicas, inflamatórias e histológicas como as observadas na doença hepática alcoólica humana.

2- O modelo experimental é capaz de induzir disbiose, com alteração na composição e diminuição da diversidade bacteriana intestinal.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo Geral**

Estabelecer modelo experimental de DHA que seja de baixo custo e facilmente reprodutível.

### **6.2 Objetivos Específicos**

1- Desenvolver modelo experimental de DHA em ratos *Wistar* através do consumo crônico de álcool e dieta rica em gordura proveniente da semente de girassol, por quatro e oito semanas, seguido por sobrecarga alcoólica aguda horas antes da eutanásia, comparando seus resultados a animais controle;

2- Comparar os níveis séricos de glicose, perfil lipídico e parâmetros de lesão hepática (aminotransferases, fosfatase alcalina e albumina) obtidos nos animais expostos à dieta por quatro ou oito semanas e controles;

3- Comparar a expressão gênica de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10) no tecido hepático nos animais expostos à dieta por quatro ou oito semanas e controles;

4- Quantificar o depósito de lipídeos, triglicerídeos e colesterol no tecido hepático e comparar nos animais expostos à dieta por quatro ou oito semanas e controles;

5- Avaliar a presença de esteatose, inflamação e fibrose hepáticas e comparar os resultados obtidos nos animais expostos à dieta por quatro ou oito semanas e controles;

6- Avaliar e comparar composição e diversidade bacteriana fecal nos animais expostos à dieta por quatro ou oito semanas e controles;

7- Correlacionar a comunidade microbiana com os marcadores de DHA.



## **7. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS**

### **7.1 Artigo**

Título: Alcoholic Liver Disease and Intestinal Microbiota in an Experimental

Model: Biochemical, Inflammatory and Histological Parameters

**Title:** Alcoholic Liver Disease and Intestinal Microbiota in an Experimental Model: Biochemical, Inflammatory and Histological Parameters

**Short running title:** Alcoholic liver disease and intestinal microbiota

**Authors:** Rutiane Ullmann Thoen<sup>1,2</sup>, Larisse Longo<sup>1,2</sup>, Luiza Cecília Leonhardt<sup>2</sup>, Matheus Henrique Mariano Pereira<sup>2,3</sup>, Pabulo Henrique Rampelotto<sup>2,4</sup>, Carlos Thadeu Schmidt Cerski<sup>3,5</sup>, Mário Reis Alvares-da-Silva<sup>1,2,3,4,6</sup>

**Affiliation**

1- Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil.

2- Experimental Hepatology and Gastroenterology Laboratory, Center for Experimental Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil.

3- School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil.

4- Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

5- Unit of Surgical Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

6- Division of Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil.

**Declaration of Interest:** Authors have nothing to disclose.

**Address for correspondence:** Experimental Laboratory of Hepatology and Gastroenterology, Experimental Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350 / room 12214, 2nd floor. CEP 90035-903, Rio Branco, Porto Alegre, RS - Brazil.

**Corresponding author:** Mário Reis Alvares-da-Silva, MD, Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil. E-mail: [marioreis@live.com](mailto:marioreis@live.com); Telephone: +55-051-999652322; Fax number: +55-051-33598307.

**Author contributions:** Thoen RU and Longo L performed the majority of experiments and analyzed the data; Leonhardt LC and Pereira MHM helped data collection; Cerski CTS analysis and

interpretation of data; Rampelotto PH analysis and interpretation of gut microbiota data; Álvares-da-Silva MR designed and coordinated the research; Thoen RU, Longo L, Rampelotto PH and Álvares-da-Silva MR wrote the manuscript; All the authors participated in the critical review and in the final approval of the manuscript.

**Institutional review board statement:** This study was approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Ethics Committee for the Use of Animals (GPPG-HCPA nº 2018-0257) and followed the recommended guidelines for animal studies.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank the Research Incentive Fund of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, CNPq (National Council of Technological and Scientific Development), PNPd/CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) Program for financial support.

**List of abbreviations:** ALC4: alcohol group 4 weeks; ALC8: alcohol group 8 weeks; ALD: alcoholic liver disease; ALT: alanine aminotransferase; AP: alkaline phosphatase; AST: aspartate aminotransferase; CONT: control group; CSS: cumulative sum scaling; HDLc: high density lipoprotein-cholesterol; HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre; GPPG: Research and Graduate Group; H&E: hematoxylin & eosin; IL: interleukin; LDA: linear discriminant analysis; LEfSe: linear discriminant effect size NIAAA: National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism; OTUs: operational taxonomic units; PCoA: principal coordinates analysis; SPSS: Software Statistical Package for the Social Sciences; RNA: ribonucleic acid; TC: total cholesterol; TG: triglyceride.

## ABSTRACT

**Background/Aim:** Alcoholic liver disease (ALD) is an important cause of death. Experimental ALD models are expensive and difficult to reproduce. Developing a low-cost, reproducible model of ALD and comparing liver damage with gut microbiota (GM) is necessary. **Materials and Methods:** Adult male Wistar rats were randomized (n=24): control (CONT- standard diet and water +0.05% saccharin), ALC4 and ALC8 (sunflower seed, 10% ethanol +0.05% saccharin for 4 and 8 weeks, respectively) plus alcohol binge (5g/kg). Clinical, nutritional, biochemical, inflammatory, histological and GM data were analyzed. **Results:** ALC4/8 animals consumed more alcohol and lipids ( $p<0.01$ ) and less total energy, liquids, solids, carbohydrates, and proteins ( $p<0.01$ ), and gained less weight ( $p<0.01$ ) than CONT. ALC8 group had lower Lee index than CONT and ALC4 ( $p<0.01$ ). Aminotransferases increased and albumin diminished in ALC4/8 compared to CONT ( $p<0.03$  for all). Glucose and AST/ALT ratios were higher in ALC8 than CONT ( $p<0.03$ ). Cholesterol was higher in ALC4 and lower in ALC8 compared to CONT ( $p<0.03$ ). Albumin and HDL-cholesterol were lower in ALC8 ( $p<0.03$ ). Hepatic concentration of triglycerides was higher in ALC8 than in ALC4 and CONT ( $p<0.05$ ). ALC4/8 presented microvesicular grade 2 and 3 steatosis, respectively, and macrovesicular grade 1. ALC4 /8 had lower fecal bacterial  $\alpha$ -diversity and relative abundance of Firmicutes ( $p<0.005$ ) and greater Bacteroidetes ( $p<0.0007$ ) and Protobacteria ( $p<0.001$ ) than CONT. GM correlated with serum and liver lipids, steatosis, albumin, and aminotransferases ( $p<0.01$  for all). **Conclusion:** The model induced nutritional, biochemical, histological and GM alterations, and appears to be useful for studying new therapeutic targets.

**Keywords:** Alcoholic liver disease, Experimental model, intestinal microbiota.

## INTRODUCTION

Alcoholic liver disease (ALD) is one of the main causes of preventable chronic liver disease worldwide and can lead from asymptomatic liver steatosis to the development of fibrosis, cirrhosis, alcoholic hepatitis, and hepatocellular carcinoma. More than 3.3 million deaths or 6% of all global deaths are attributable to alcohol (1).

The definition of alcohol abuse is the consumption of more than three doses per day for men and two doses per day for women, or even compulsive consumption greater than five doses for men and four doses for women in a two-hours period, as defined by the National Institute of Alcoholism and Alcohol Abuse, NIAAA (2, 3, 4). ALD can occur with abusive consumption over a period greater than 5 or 10 years. About 90% of chronic drinkers have hepatic steatosis and 10 to 20% develop severe forms, such as alcoholic hepatitis or cirrhosis (5). The risk of progression from asymptomatic hepatic steatosis to more advanced stages of the disease is modulated by the extent and duration of alcohol misuse, and by hereditary factors, obesity, smoking and sex (5). However, new studies have begun to demonstrate the role of potentially modifiable factors in this progression, particularly the intestinal microbiota (6, 7). Thus, the study of the intestinal microbial environment in ALD and its progression is relevant.

Although major evidence of the pathological process of ALD has been obtained, treatment options are still very limited in part due to the lack of *in vivo* models capable of replicating the disease phenotypes seen in humans. Experimental models in rodents have been widely used and are of paramount importance for understanding the pathophysiology of ALD, but since rodents have an aversion to alcohol, the replication of the disease observed in humans is limited (8). In addition, some experimental models described in the literature for the study of this disease are expensive and difficult to reproduce, given the need for using a specific diet (9), infusion pumps and performing invasive procedures on each animal (10). Indeed, the challenge of this study was to establish an experimental model with good reproducibility and viability to allow the study of ALD. Thus, the objectives of the study were: 1) to develop an experimental model of ALD, through a high-fat diet, the chronic use of ethanol and intragastric alcohol binge; and 2) to evaluate the role of the intestinal microbiota in inflammation and disease progression in this model.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Twenty-four adult male Wistar rats weighing between 260-340g were used. The animals were randomized by weight and kept in polypropylene cages with a sawdust-covered floor, each box with two animals, controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), humidity 40-60%, exhaust system and light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). All experimental procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (protocol nº 2018-0257) and were conducted in accordance with international guidelines for the care and use of laboratory animals. Measures were taken to minimize the pain and discomfort of the animals, when necessary.

### Study Design, Dietary Interventions and physical parameters

After acclimatization, the rats were divided into three experimental groups (nº 8): control group (CONT), alcohol group 4 (ALC4); and alcohol group 8 (ALC8). In groups ALC4 and ALC8 the experimentation period was four and eight weeks, respectively.

For the development of this experimental model, groups ALC4 and ALC8 receive daily *ad libitum* a diet rich in fat from sunflower seeds without sterile husks and alcohol in a 10% ethanol solution (Merck PA, Germany) plus 0.05% sodium saccharin, the latter aiming to increase the palatability of the alcoholic solution; in addition, on the last day of the experiment, nine hours before euthanasia, the animals were given an alcoholic binge by gavage at a dose of 5g of ethanol per kilogram of the animal's weight.

During the experimental period, the CONT group received *ad libitum* standard ration and water with 0.05% sodium saccharin for four weeks. On the last day of the experiment, nine hours before euthanasia, the animals received the gavage with water.

The animals in the ALC4 and ALC8 groups received a high-fat diet of sunflower seed, which has 25 J per gram, comprising 47.3% lipids, 19.9% carbohydrates, 24.0% protein and 8.8% fibers. The CONT group animals received the standard diet (Nuvilab CR-1, Quimtia S.A., Brazil) with 14 J per gram. This diet consisted of 4.5% lipids, 55.0% carbohydrates, 22.0% protein and 18.5% fibers and vitamins (information provided by the manufacturer). During the experimental period, food intake control was carried out every two days, weight was assessed weekly, and the naso-anal length measured at the beginning and end of the animals' experiment for determination of the delta Lee index. This index is calculated as the ratio between the cube root of body weight and the naso-anal length of animals multiplied by 10 (g/cm) (11).

Prior to euthanasia, the rats were fasted for eight hours and were anesthetized with 5% isoflurane (Instituto BioChimico, Brazil). Euthanasia was due to cardiac exsanguination. Serum samples, feces present in the intestine and liver fragments were collected aseptically, frozen in liquid nitrogen, and stored in at -80 °C until the proposed evaluations were carried out. Part of the liver tissue was fixed in 10% formalin for histological analysis.

#### Analysis of Biochemical Parameters

The serum levels of triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein (HDLc), glucose, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase and albumin were determined using the ROCHE Cobas e702 equipment.

#### Quantitative Analysis of Hepatic Lipid Deposits

To analyze the hepatic lipid content, the previously frozen liver tissue samples were thawed on ice and homogenized in phosphate buffer (20 mg of tissue/mL). The accumulation of total lipids was evaluated by the Nile red method (12), and hepatic triglycerides and total cholesterol were dosed enzymatically by colorimetry (Labtest Diagnóstica S.A, Brazil). All analyses were done in duplicate.

The total lipid concentration was determined using the modified protocol of Gómez-Lechón *et al* (12) In brief, liver tissue fragments, previously homogenized in phosphate buffer, were incubated with 1 µl of Nile red solution (1 mg/mL in acetone) at 37°C for 15 minutes. Fluorescence was measured at 488 nm excitation and 550 nm emission (SpectraMax M3). All analyses were done in duplicate. The obtained values were normalized to total protein present in the homogenate (13). The results were expressed as fluorescence/µg protein.

#### Evaluation of the Gene Expression of Hepatic Inflammation

Total RNA was extracted from fragments of liver tissue, using the RNeasy mini kit (Qiagen, USA). The conversion of cDNA from 2 µg of RNA was performed using the high-capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, USA). The qRT-PCR with the TaqMan assay (Applied Biosystems, USA) was used to evaluate the gene expression of *Il1b*, *Il6* and *Il10*. The *Actb* gene was used as a normalizer. The probes used are described in Supplementary Table-1. The values were calculated using the formula  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ . The data obtained were used to calculate the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, an inflammatory index.

## Histological Analysis

Samples of liver tissue fixed in formalin were included in paraffin and stained with hematoxylin & eosin (H&E) which shows damage to liver tissue and picosirius to identify fibrosis. Histopathological lesions from different stages of steatosis were classified using a score adapted to ALD seen in Kleiner *et al.* (14). The evaluation was performed based on the degrees of severity of steatosis: 0 (occurrence in up to 5% of the tissue), 1 (occurrence in 6-33% of the tissue), 2 (occurrence in 34-66% of the tissue) and 3 (between 67 and 100% of the tissue). The analysis was performed by an experienced pathologist who was blind to the experimental groups.

## DNA extraction and sequencing of 16S rRNA

The bacterial DNA was isolated from the fecal samples using the QIAamp fast DNA stool mini kit (Qiagen, USA), following the manufacturer's instructions. The hypervariable V4 region from the rRNA gene was amplified by PCR using the following primer pair: 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). To pool different samples in the same reaction, we used the primer-fusion method, and each sample had a distinct barcode attached to the corresponding PCR product. The purified products were subjected to emulsion PCR using Ion PGM™ Hi-Q™ view OT2 kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Afterwards, the resulting enriched beads were sequenced in an NGS machine (Ion Torrent PGM, Life Technologies) using an Ion PGM™ Hi-Q™ view sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

## Bioinformatics analyses

### 16S rRNA readings processing for downstream analyses

The data sequence exported from the Ion PGM™ System was processed using a custom pipeline in Mothur v.1.41.1 (15). Initially, sequences were depleted of barcodes and primers (where no mismatch was allowed) and then a quality filter was applied to eliminate low quality readings. Quality control was conducted by trimming the low-quality readings, those with incorrect length, those containing an ambiguous base, or containing homopolymers longer than 8 bp. All potentially chimeric sequences were identified and removed using VSEARCH (16).

After these initial quality filtering and trimming steps, the remaining sequences were clustered into operational taxonomic units (OTUs) based on a 99% identity level and were classified against the SILVA v132 reference database at 97% similarity (17). Sequences that could not be classified (i.e., “unknown” sequences), as well as sequences identified as eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts were removed prior to further analysis. To reduce spurious OTUs caused by PCR or sequencing errors,



an additional filtering step was performed by removing OTUs with less than 10 readings. The resulting OTU table was normalized using the cumulative sum scaling (CSS) method. For alpha diversity analysis, the OTU table was rarefied to the smallest library size. Subsequent analyses of the sequence dataset were performed in R v. 3.6.1 (using *vegan*, *phyloseq*, *ggplot2*, and *MicrobiomeAnalystR* packages).

#### Microbial community and statistical analysis

Alpha-diversity was assessed using Shannon and Chao 1 indexes. For overall comparison of significant differences among bacterial communities (i.e., beta diversity), principal coordinates analysis (PCoA) was performed. A matrix using Bray–Curtis dissimilarity metrics was calculated for each pair of samples. The distances were turned into points in space with the number of dimensions one less than the number of samples. To achieve statistical confidence for the sample grouping observed by PCoA, the ANOSIM multivariate test was performed on the distance matrix. To compare the distribution of microbial taxa among samples, a clustering method was performed, and the results were visualized using a cladogram. To identify differentially abundant phyla, the linear discriminant effect size (LEfSe) method was performed (18). The algorithm performs a nonparametric factorial Kruskal–Wallis sum rank test and linear discriminant analysis (LDA) to determine statistically significant different features among taxa and estimates the effect size of the difference. Differences were considered significant for a logarithmic LDA score threshold of  $\pm 3.0$  and a  $p < 0.05$  after adjusting for multiple hypotheses testing with the Benjamini–Hochberg method. Spearman correlation analysis was used to correlate microbial taxa and molecular parameters. A correlation was considered significant when  $p < 0.05$  after adjusting for multiple hypotheses testing with the Benjamini–Hochberg method.

#### Statistical Analysis

The data were analyzed for homogeneity of variance and normal distribution. One-way ANOVA was used, followed by post hoc tests by Tukey and Games Howell. The results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. The level of significance was set at 95% ( $p < 0.05$ ). All analyses were performed using the Software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 18.0) and the graphs were prepared using Graphpad Prism version 5.0.

## RESULTS

### Consumption and Weight Gain

There was a difference in the average daily intake of solid foods, liquids, the ratio of macronutrients (carbohydrates, lipids, and proteins), total energy consumed and significantly increased final weight of the animals ( $p < 0.05$ ) between the three groups at the end of the experiment. (Table 1). The amount of lipids ingested by the ALC4 and ALC8 groups was significantly higher than in the CONT group ( $p < 0.01$ ). Among the ALC4 and ALC8 groups, the latter had an energy consumption, solid and liquid foods, all macronutrients, ethanol, and significantly higher weight gain than the ALC4 group ( $p < 0.01$ ). The CONT group consumed a significantly higher caloric value, solid and liquid foods, carbohydrates, and proteins, and obtained a significantly higher weight gain than the ALC4 and ALC8 groups ( $p < 0.01$ ). However, the Lee index of the ALC8 group was significantly lower compared to the CONT and ALC4 groups ( $p < 0.01$ ).

There was no mortality during the period of four and eight weeks, respectively, in the ALC4 and ALC8 groups, in which the high-fat diet and the alcoholic solution were offered. However, after the alcoholic binge by gavage (5g of ethanol per kg of weight) one animal in the ALC4 group and four animals in the ALC8 group, died.

### Biochemical Analysis

The results for these parameters are shown in Table 2. The model applied to the ALC4 and ALC8 groups caused a significant increase in the AST level by 118% and 300% respectively compared to the CONT group ( $p < 0.03$ ) and an increase of 84% comparing the ALC8 group with the ALC4 group ( $p < 0.001$ ); the increase in the ALT level of the ALC4 and ALC8 groups was 70% and 75%, respectively, compared to the CONT group ( $p < 0.03$ ), but there was no significant difference between them; The AST to ALT ratio was significantly higher in the ALC8 group compared to the CONT ( $p < 0.03$ ) and ALC4 ( $p < 0.001$ ) groups and higher in the ALC4 group compared to the CONT group ( $p < 0.03$ ). The level of alkaline phosphatase was significantly higher in the ALC4 group compared to the CONT group ( $p < 0.03$ ).

In addition, the albumin concentration in the ALC4 and ALC8 groups decreased significantly compared to the CONT group ( $p < 0.03$ ); no significant difference was shown between them. TC levels were significantly higher in the ALC4 group compared to the CONT ( $p < 0.03$ ) and ALC8 ( $p < 0.001$ ) groups and lower in the ALC8 group compared to the CONT group ( $p < 0.03$ ). HDLc was significantly

lower in the ALC8 group than in the CONT ( $p < 0.03$ ) and ALC4 ( $p < 0.001$ ) groups. Glucose was significantly higher in the ALC8 group compared to the CONT group ( $p < 0.03$ ). There was no significant difference in the level of TG between the groups.

#### Quantitative Analysis of Hepatic Lipid Deposit

There was a significant 2.5-fold increase in liver TG concentration in the ALT4 group compared to the CONT group ( $p < 0.001$ ) and a significant 4-fold increase in the ALC8 group compared to the CONT group ( $p < 0.001$ ). The ALC8 group showed a significant 1.7-fold increase in hepatic TG concentration compared to the ALC4 group ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1 panel A).

The ALC4 group showed a significant 2.0-fold increase in the concentration of liver TC in relation to the CONT group ( $p < 0.001$ ). The ALT8 group had a significant 3.5-fold increase compared to the CONT group ( $p < 0.001$ ) and 1.6x when compared to ALC4 ( $p < 0.003$ ) (Fig. 1 panel B).

There was a significant increase in the concentration of total lipids in the liver tissue in the ALC4 and ALC8 groups, respectively 4.3-fold ( $p < 0.004$ ) and 9.0-fold ( $p < 0.007$ ) compared to the CONT group. The ALC8 group showed a 2-fold increase in total lipid accumulation compared to the ALC4 group ( $p < 0.015$ ) (Fig. 1 panel C).

#### Evaluation of the Gene Expression of Hepatic Inflammation

Regarding the gene expression of hepatic inflammatory markers, there was no significant difference between the experimental groups for the gene expression of *Il1b*, *Il6*, *Il10* (Fig. 2 panel A-C). There was also no difference in the inflammatory indices *Il1b/Il10* and *Il6/Il10*.

#### Histopathological Analysis

There were no abnormalities in the liver tissue of animals in the CONT group (Fig. 3 panel A), while animals in the ALC4 and ALC8 groups showed micro and macrovesicular steatosis. The animals in the ALC4 group presented grade two for microvesicular steatosis (34-66% of occurrence) and grade one for macrovesicular steatosis (6-33% of occurrence) (Fig. 3 panel B). The animals in the ALC8 group had grade three (67-100% of occurrence) for microvesicular steatosis and grade one for macrovesicular steatosis (6-33% of occurrence) (Fig. 3 panel C). No deposition of collagen fibers in the hepatic tissue was observed in any experimental group through picrosirius staining (Fig. 3 panel D).

## Gut Microbiota Diversity and Composition

In general, major differences in alpha and beta diversity were observed in ALC4 and ALC8, when compared to CONT. Shannon and Chao1 indexes indicated that the samples had different degrees of diversity, with the lowest diversity for ALC4 (Fig. 4 panel A and panel B). Similarly, the structural pattern of gut microbiota in both interventions (i.e. ALC4 and ALC8) was clearly distinct from CON (ANOSIM,  $p < 0.001$ ), as observed by PCoA analysis and hierarchical clustering dendrogram (Fig. 4 panel C and panel D).

Taxonomy-based analysis of bacterial communities identified 2032 bacterial taxa (OTUs), which belong to 121 genera, 45 families, and 12 phyla. *Bacteroidetes* (49%) and *Firmicutes* (45%) were the most prevalent phyla in all samples (Fig. 5). *Protobacteria* presented 3% of abundance while the other 9 phyla altogether represented less than 3% of the readings (Fig. 5). These three main phyla were also differentially abundant among groups, where *Bacteroidetes* and *Protobacteria* were predominant in ALC4 / ALC8 (Fig. 6 panel A and panel C), while *Firmicutes* was less abundant in ALC4 / ALC8 (Fig. 6 panel B) when compared to CONT, respectively. LDA score=4.21,  $p < 0.01$  (*Bacteroidetes*); LDA score=3.81,  $p < 0.01$  (*Firmicutes*); LDA score=3.06,  $p < 0.01$  (*Protobacteria*).

The correlations between microbial community and ALD markers are presented in Table 3. Hepatic steatosis associated with ALD, measured by histological analysis, presented the highest correlation with the microbiota, i.e.,  $r=0.74$  for both microvesicular and macrovesicular steatosis. The hepatic levels of TG, TC and liver total lipid accumulation also presented significant correlation with the microbiota. In addition, a significant correlation was observed for serum enzymes alkaline phosphatase, ALT, albumin, and AST. No correlation was observed for inflammatory markers.

## DISCUSSION

Attention to chronic and acute alcohol consumption has gradually increased worldwide in recent years. There is an economic and health concern caused by the development of ALD, a disease for whose prevention and treatment drugs have not yet been approved. However clinical research on ALD is still limited including diagnostic and prognostic tools as well as therapeutics. The experimental model here described succeeded in demonstrating initial liver injury with significant changes in body composition, suggesting worsening of nutritional status, biochemical abnormalities, and liver fat deposition. Another interesting finding was the intestinal dysbiosis in the intervention groups in comparison to the controls. Moreover, there was a correlation between liver steatosis and microbiota. The experimental model here developed was originated based on studies using a high-fat, alcoholic diet (19) and an alcoholic binge simulating the chronic and compulsion effect (20). In addition to alcohol, a high-fat diet is necessary for the characteristics of ALD to be expressed in rodents. We

obtained, besides other studies (20; 21), limited results regarding the reproduction of a model to characterize the shape of advanced human ALD in all its aspects, which includes severe steatosis, hepatocellular damage, and hepatic infiltration (8).

Nutrient deficiencies prevail in liver dysfunction, especially when the etiology is concerned with alcohol and its chronic consumption. For the animal model with rats, chronic consumption is considered when it is exposed to a period greater than or equal to four weeks, while alcoholic binge can be in a single or multiple dose (22). In humans, the amount of alcohol intake is related to inappropriate eating habits (23, 24, 25, 26), referred to as an imbalance between consumption macronutrients and micronutrients causing weight loss and malnutrition in the most advanced disease (24). In this experimental work, the lower weight gain and Lee's index, as well as the consumption profile of macronutrients that occurred in the groups that received the high-fat diet, alcohol and alcoholic binge represent the signs and the reality of consumption of a large part of the studied population.

In this work, a longer time of chronic exposure to the model led to a significant increase in fasting glucose of the animals. This finding can be observed in studies carried out with humans with excessive alcohol consumption. A systematic review, using 20 cohort studies, showed a U-shaped relationship to the relative risk of developing diabetes *mellitus* type 2 associated with alcohol in men and women (27).

Experiments with rodents, due to their alcohol avoidance and resistance are difficult to establish. So, other models have been studied, including zebrafish. Our group recently published some articles that evaluated the effect of probiotics on alcohol-exposed zebrafish (28, 29, 30). The probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG showed a hepatoprotective effect through the modulation of intestinal permeability and inflammasomes in this model (29). Chronic exposure to ethanol also altered the expression of miR-155, miR-122 and miR-217 genes in zebrafish (30). These microRNAs are abundant in the liver and regulate several cellular processes associated with liver injury and are involved in lipid export and synthesis, cholesterol homeostasis and regulation of inflammation and immune response in liver tissue (30) However, they are also labor-intensive models that require attention.

ALD rodent models need at least one factor other than alcohol to trigger the clinical signs seen in the progression of ALD in humans as a significant change in biochemical parameters, hepatic steatosis, inflammation and fibrosis. Experimental models with rodents that use more than one disease-inducing agent are called "second hits" and when they use more than two, they are called "multiple hits", such as nutritional modifications, pharmacological agents, hormones, cytochrome P-450 inducers, toll-like receptor ligands, genetic manipulation, and viral infections (31, 32). Our experimental model can be considered a "second hit" model, because in addition to using chronic and

acute alcohol, a high-fat diet was used. The Gao-Binge model, which similarly to ours, uses the alcoholic binge and the chronic supply of alcohol and fat, obtained a significant increase in transaminases and presented a moderate increase in inflammation, sunflower seed was chosen as a source of lipids in this model, in addition to alcohol, because it has practically the same concentration of proteins (33) as the standard feed, since it is palatable to rodents, and contains a considerable amount of monounsaturated fats and reduced carbohydrate concentration as found in the Liber-DeCarli diet used in ALD models (20). In this study, alcohol drinking and a high-fat diet from sunflower seed was not shown to be pro-inflammatory. This effect may not have been observed due to some nutritional characteristics of sunflower seed, such as the presence of phenolic compounds, flavonoids, polyunsaturated fatty acids and/or vitamins (34, 35) or has not yet been observed due to the rodents' own resistance to alcohol.

Comparing our experimental model to the Gao-Binge and Tsukamoto model is considerably less costly. The Tsukamoto model reproduces the signs observed in the progression of ALD such as elevated transaminases, inflammation of the liver and liver fibrosis (36). However, although it looks better, it is very difficult to reproduce it, since surgical procedures are necessary for the introduction of an intragastric tube in the animals so that they are constantly fed, the use of infusion pumps for each animal and the administration of a liquid diet, which is not viable for most animals. experimental research centers replicate this model.

Alcohol intake can lead to changes in the composition of the intestinal microbiota, even before the development of liver disease (37). Alcohol reaches the microbiome due to its direct contact with components of the microbiota during consumption. In addition, it can damage the intestinal barrier and alter serum microbial levels in animal and human models. This lesion increases intestinal permeability and contributes to the pathogenesis of ALD (38). In this study, we demonstrated a clear distinction of bacterial communities between experimental groups. In addition, the groups with intervention showed a significant decrease in the observed OTUs. Among the twelve phyla of bacteria detected in our study *Firmicutes* and *Bacteroidetes* were the most abundant. In the distribution analysis we demonstrated that the most abundant phyla in the intervention group were less prevalent (or absent) in the animals in the control group. In the analysis of differential phylum abundance, we identified that *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* are more associated with the intervention groups, while *Firmicutes* and *Tenericutes* are with the control group. The composition of the total microbial community of the intervention groups showed a significant correlation with some parameters such as macro and microvesicular steatosis, accumulation of total lipids, triglycerides and total cholesterol in the liver tissue, serum levels of ALT, AST, AP, and albumin. The increase in the translocation of bacteria and bacterial products to the liver has been discussed and related to hepatic steatosis (39).

Approximately 70% of the blood that supplies the liver comes from the intestine through the portal vein. Consequently, the liver, like the intestine, is continuously exposed to products derived from the intestine (37). In addition, *in vitro* studies demonstrate that alcohol has direct and selective effects on the intestinal bacterial growth of some species and that it can produce endogenous ethanol, further affecting intestinal permeability. With the rupture of the intestinal epithelial barrier, there is an increase in intestinal permeability, which is increasingly recognized as an important factor in ALD.

Recent studies have also shown that alcohol consumption is associated with the imbalance of pathogenic and commensal organisms in the intestinal microbiome, contributing to the abnormal intestinal-liver axis in ALD (40). In the literature, some phyla are out of balance and are related to the progression of ALD. In the Tsukamoto model, long-term alcohol consumption produced quantitative and qualitative changes in the intestinal microbiome, i.e., a decrease in the relative abundance of the phylum *Firmicutes* and an increase in the phyla *Bacteroidetes* and *Verrucomicrobia* (41). In a recent metagenomic analysis, the chronic changes induced by alcohol in the intestinal microbiome reflected the lower abundance of the phyla *Bacteroidetes* and *Firmicutes*, with a proportional increase in the abundance of the phylum *Proteobacteria* and *Actinobacteria* (41). In addition, other studies report an increase in *Proteobacteria* (23, 42, 43) and *Bacteroidetes* in addition to a reduction in *Firmicutes* associated with alcohol consumption (44, 45). Similarly, human ALD is associated with intestinal dysbiosis. Both qualitative and quantitative changes in the intestinal microbiome have been demonstrated in several human studies. However, there is no consensus in the literature, including alcoholic liver disease in humans. A recent review shows conflicting results, an "alcoholic microbiome" has not been established, probably due to the high heterogeneity of patients, active consumption or alcohol withdrawal time, the stage of liver disease, the different eating patterns, the medications used, the type of biological material and the different techniques used to analyze the bacterial composition (37). In this model, important findings were found in the correlation between the intestinal microbiota and parameters linked to liver injury, corroborating the literature that relates liver injury to intestinal dysbiosis. The relationship is probably due to the liver-intestinal axis, the increase in intestinal permeability and translocation of bacteria and bacterial products through the portal vein (38).

In conclusion, both groups (ALC4 and ALC8) proposed in this study seem to induce ALD in the early stages. The group with the longest exposure to the diet had greater damage, but with high mortality. They showed significant signs such as the presence of micro and macrovesicular steatosis, biochemical changes related to liver function and substantial changes in the quality and quantity of the intestinal microbiota (a condition referred to as dysbiosis) and may be useful in the development of new studies to elucidate not only the pathophysiology of the disease, but also to identify some new therapeutic targets.

## REFERENCES

- 1- WHO, World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization, 2018. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274603>.
- 2- Singal AK, Bataller R, Ahn J, Kamath PS, Shah VH. ACG Clinical Guideline: Alcoholic Liver Disease. *Am J Gastroenterol*. 2018 Feb;113(2):175-194.
- 3- National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Alcohol facts and statistics. *NIAAA* <https://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/alcohol-facts-and-statistics> (2020).
- 4- Crabbe JC, Harris RA, Koob GF. Preclinical studies of alcohol binge drinking. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Jan;1216:24-40.
- 5- Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*. 2011 Nov;141(5):1572-85.
- 6- Mutlu EA, Gillevet PM, Rangwala H, Sikaroodi M, Naqvi A, Engen PA, Kwasny M, Lau CK, Keshavarzian A. Colonic microbiome is altered in alcoholism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012 May 1;302(9):G966-78.
- 7- Szabo G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease. *Gastroenterology*. 2015 Jan;148(1):30-6.
- 8- Lamas-Paz A, Hao F, Nelson LJ, Vázquez MT, Canals S, Gómez Del Moral M, Martínez-Naves E, Nevzorova YA, Cubero FJ. Alcoholic liver disease: Utility of animal models. *World J Gastroenterol*. 2018 Dec 7;24(45):5063-5075.
- 9- Lieber CS, DeCarli LM, Sorrell MF. Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology*. 1989 Oct;10(4):501-10.
- 10- Tsukamoto H, Mkrtchyan H, Dynnyk A. Intragastric ethanol infusion model in rodents. *Methods Mol Biol*. 2008;447:33-48.
- 11- Longo L, Tonin Ferrari J, Rampelotto PH, Hirata Dellavia G, Pasqualotto A, P Oliveira C, Thadeu Schmidt Cerski C, Reverbel da Silveira T, Uribe-Cruz C, Álvares-da-Silva MR. Gut Dysbiosis and Increased Intestinal Permeability Drive microRNAs, NLRP-3 Inflammasome and Liver Fibrosis in a Nutritional Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis in Adult Male Sprague Dawley Rats. *Clin Exp Gastroenterol*. 2020 Sep 18;13:351-368. Erratum in: *Clin Exp Gastroenterol*. 2020 Oct 13;13:459.
- 12- Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor JE. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact*. 2007 Jan 30;165(2):106-16.
- 13- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.



- 14- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Jun;41(6):1313-21.
- 15- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Dec;75(23):7537-41.
- 16- Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*. 2016 Oct 18;4:e2584.
- 17- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(Database issue):D590-6.
- 18- Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011 Jun 24;12(6):R60.
- 19- Souza CEA, Stolf AM, Dreifuss AA, Lívero FR, Gomes LO, Petiz L *et al*. Characterization of an Alcoholic Hepatic Steatosis Model Induced by Ethanol and High-Fat Diet in Rats. *Braz. Arch. Biol. Technol*. 2015 Jun 58(3):367-378.
- 20- Bertola A, Mathews S, Ki SH, Wang H, Gao B. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nat Protoc*. 2013 Mar;8(3):627-37.
- 21- Ghosh Dastidar S, Warner JB, Warner DR, McClain CJ, Kirpich IA. Rodent Models of Alcoholic Liver Disease: Role of Binge Ethanol Administration. *Biomolecules*. 2018 Jan 13;8(1):3.
- 22- D'Souza El-Guindy NB, Kovacs EJ, De Witte P, Spies C, Littleton JM, de Villiers WJ, Lott AJ, Plackett TP, Lanzke N, Meadows GG. Laboratory models available to study alcohol-induced organ damage and immune variations: choosing the appropriate model. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010 Sep 1;34(9):1489-511.
- 23- Wang SC, Chen YC, Chen SJ, Lee CH, Cheng CM. Alcohol Addiction, Gut Microbiota, and Alcoholism Treatment: A Review. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 3;21(17):6413.
- 24- Styskel B, Natarajan Y, Kanwal F. Nutrition in Alcoholic Liver Disease: An Update. *Clin Liver Dis*. 2019 Feb;23(1):99-114.
- 25- Maillot F, Farad S, Lamisse F. Alcool et nutrition [Alcohol and nutrition]. *Pathol Biol (Paris)*. 2001 Nov;49(9):683-8. French.
- 26- Le Daré B, Lagente V, Gicquel T. Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. *Drug Metab Rev*. 2019 Nov;51(4):545-561.

- 27- Baliunas DO, Taylor BJ, Irving H, Roerecke M, Patra J, Mohapatra S, Rehm J. Alcohol as a risk factor for type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2009 Nov;32(11):2123-32.
- 28- Schneider AC, Rico EP, de Oliveira DL, Rosemberg DB, Guizzo R, Meurer F, da Silveira TR. Lactobacillus rhamnosus GG Effect on Behavior of Zebrafish During Chronic Ethanol Exposure. *Biores Open Access*. 2016 Jan 1;5(1):1-5.
- 29- Bruch-Bertani JP, Uribe-Cruz C, Pasqualotto A, Longo L, Ayres R, Beskow CB, Barth AL, Lima-Morales D, Meurer F, Tayguara Silveira Guerreiro G, da Silveira TR, Álvares-da-Silva MR, Dall'Alba V. Hepatoprotective Effect of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG Through the Modulation of Gut Permeability and Inflammasomes in a Model of Alcoholic Liver Disease in Zebrafish. *J Am Coll Nutr*. 2020 Feb;39(2):163-170.
- 30- Pasqualotto A, Ayres R, Longo L, Del Duca Lima D, Losch de Oliveira D, Alvares-da-Silva MR, et al. Chronic exposure to ethanol alters the expression of miR-155, miR-122 and miR-217 in alcoholic liver disease in an adult zebrafish model. *Biomarkers*. 2021 Mar;26(2):146-151.
- 31- Mathews S, Xu M, Wang H, Bertola A, Gao B. Animals models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of alcohol-induced liver disease: pathophysiology, translational relevance, and challenges. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014 May 15;306(10):G819-23.
- 32- Tsukamoto H, Machida K, Dynnyk A, Mkrtchyan H. "Second hit" models of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*. 2009 May;29(2):178-87.
- 33- Guo S, Ge Y, Na Jom K. A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common sunflower seed and sprouts (*Helianthus annuus* L.). *Chem Cent J*. 2017 Sep 29;11(1):95.
- 34- Fowler MW. Plants, medicines and man. *J Sci Food Agric*. 2006; 86 (12): 1797-1804.
- 35- Adeleke BS, Babalola OO. Oilseed crop sunflower (*Helianthus annuus*) as a source of food: Nutritional and health benefits. *Food Sci Nutr*. 2020 Jul 31;8(9):4666-4684.
- 36- Tsukamoto H, French SW, Benson N, Delgado G, Rao GA, Larkin EC, Largin C. Severe and progressive steatosis and focal necrosis in rat liver induced by continuous intragastric infusion of ethanol and low fat diet. *Hepatology*. 1985 Mar-Apr;5(2):224-32.
- 37- Bajaj JS. Alcohol, liver disease and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Apr; 16 (4): 235 - 246.
- 38- Chopyk DM, Grakoui A. Contribution of the Intestinal Microbiome and Gut Barrier to Hepatic Disorders. *Gastroenterology*. 2020 Sep;159(3):849-863.
- 39- Shao T, Zhao C, Li F, Gu Z, Liu L, Zhang L, Wang Y, He L, Liu Y, Liu Q, Chen Y, Donde H, Wang R, Jala VR, Barve S, Chen SY, Zhang X, Chen Y, McClain CJ, Feng W. Intestinal HIF-1 $\alpha$  deletion

exacerbates alcoholic liver disease by inducing intestinal dysbiosis and barrier dysfunction. *J Hepatol*. 2018 Oct;69(4):886-895.

40- Szabo G, Bala S, Petrasek J, Gattu A. Gut-liver axis and sensing microbes. *Dig Dis*. 2010;28(6):737-44.

41- Yan AW, Fouts DE, Brandl J, Stärkel P, Torralba M, Schott E, Tsukamoto H, Nelson KE, Brenner DA, Schnabl B. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2011 Jan;53(1):96-105.

42- Kourkoumpetis T, Sood G. Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease: An Update. *Clin Liver Dis*. 2019 Feb;23(1):71-80.

43- Shen TD, Pysopoulos N, Rustgi VK. Microbiota and the liver. *Liver Transpl*. 2018 Apr;24(4):539-550.

44- Zhang DY, Zhu L, Liu HN, Tseng YJ, Weng SQ, Liu TT, Dong L, Shen XZ. The protective effect and mechanism of the FXR agonist obeticholic acid via targeting gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease. *Drug Des Devel Ther*. 2019 Jul 5;13:2249-2270.

45- Gómez-Zorita S, Aguirre L, Milton-Laskibar I, Fernández-Quintela A, Trepiana J, Kajarabille N, Mosqueda-Solís A, González M, Portillo MP. Relationship between Changes in Microbiota and Liver Steatosis Induced by High-Fat Feeding-A Review of Rodent Models. *Nutrients*. 2019 Sep 9;11(9):2156.

**Table 1. WEIGHT GAIN AND AVERAGE CONSUMPTION PER DAY**

Groups	CONT (n=8)	ALC4 (n=8)	ALC8 (n=8)
Weight gain (g)	103.26 ± 5.97	37.21 ± 4.11 *	65.77 ± 3.07 **
Lee Index	3.3 ± 0.04	3.22 ± 0.01	2.99 ± 0.04 **
Total energy consumption (J)	452.82 ± 11.26	277 ± 10.43 *	373.79 ± 6.46 **
Liquid consumption (ml)	45.3 ± 1.48	20.68 ± 1.04 *	26.88 ± 0.24 **
Ethanol (g)	0 ± 0	1.63 ± 0.08 *	2.12 ± 0.02 **
Food intake (g)	31.93 ± 0.79	9.1 ± 0.51 *	12.37 ± 0.24 **
Carbohydrate consumption (g)	17.24 ± 0.42	1.81 ± 0.10 *	2.46 ± 0.04 **
Lipid consumption (g)	1.28 ± 0.03	4.3 ± 0.24 *	5.85 ± 0.11 **
Protein consumption (g)	7.02 ± 0.17	2.18 ± 0.12 *	2.97 ± 0.05 **

Values are expressed as means ± S.E.M (n=8). Statistical comparison was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's or Games-Howell test. \* $p < 0.01$  when compared with CONT and # $p < 0.01$  when compared with ALC4. The amount of food and drink represents consumption per day per rat. Legend: ALC4 group: sunflower seed and 10% ethanol (for 4 weeks); ALC8 group: sunflower seed and 10% ethanol (for 8 weeks); CONT group: standard feed and water (for 4 weeks).

**Table 2. BIOCHEMICAL PARAMETERS OF ANIMALS**

Variable (Serum)	CONT (n=8)	ALC4 (n=7)	ALC8 (n=4)
Glucose (mg/dL)	253.3 ± 5.1	321.6 ± 40.6	381.5 ± 42.3 *
Triglyceride (mg/dL)	120.0 ± 19	111.0 ± 23	69.0 ± 9
Total Cholesterol (mg/dL)	54.8 ± 2.5	68.7 ± 2.4 *	39.5 ± 4.6 **
HDL Cholesterol (mg/dL)	47.5 ± 2.2	49.7 ± 2	32.5 ± 2.2 **
AST (U/L)	81.4 ± 5.3	177.4 ± 18.3 *	326.5 ± 25.1 **
ALT (U/L)	49.4 ± 2.4	84.7 ± 6.5 *	86.5 ± 9.4 *
AST/ALT	1.6 ± 0.10	2.1 ± 0.06	3.9 ± 0.50 **
Alkaline Phosphatase (U/L)	105.1 ± 2	147.3 ± 9.5 *	123.5 ± 2.2
Albumin (g/dL)	4.2 ± 0.1	3.8 ± 0.1 *	3.7 ± 0.0 *

Values are expressed as means ± S.E.M. (n= 4 - 8). Statistical comparison was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test. \* $p < 0.03$  when compared with CONT and # $p < 0.001$  when compared with ALC4. Abbreviations: ALC4 group: sunflower seed and 10% ethanol (for 4 weeks); ALC8 group: sunflower seed and 10% ethanol (for 8 weeks); ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; CONT group: standard feed and water (for 4 weeks); HDL: high density lipoproteins.

**Table 3. CORRELATIONS BETWEEN MICROBIAL COMMUNITY AND ALD MARKERS**

Molecular Parameter	r	p
Microvesicular steatosis	0.74	0.01
Macrovesicular steatosis	0.74	0.01
Hepatic triglycerides	0.47	0.01
Alkaline phosphatase	0.44	0.01
ALT	0.42	0.01
Albumin	0.37	0.01
Hepatic total lipid accumulation	0.33	0.01
AST	0.33	0.01
Hepatic cholesterol	0.30	0.01
<i>Il6</i>	0.16	0.06
TC	0.14	0.03
AST/ALT	0.04	0.51
<i>Il1b</i>	0.02	0.73
<i>Il10</i>	0.01	0.8
Glucose	0.01	0.96
Lee Index	0.002	0.96
Triglycerides	0.001	1
HDLc	-0.02	0.73

The Mantel test was performed using the Pearson correlation method and the microbial community structures were calculated based on the Bray-Curtis distance. Abbreviations: ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; Il: interleukin; HDLc: high density lipoprotein-cholesterol.

Figure 1

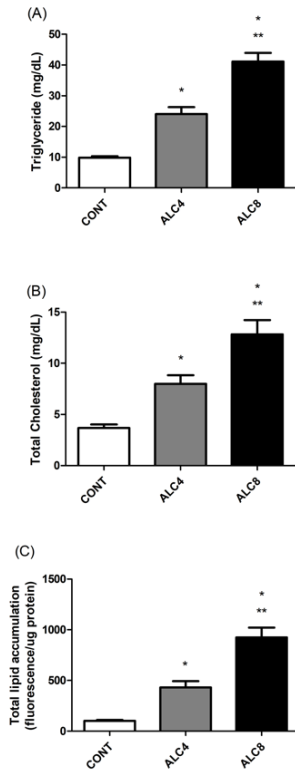


Figure 2

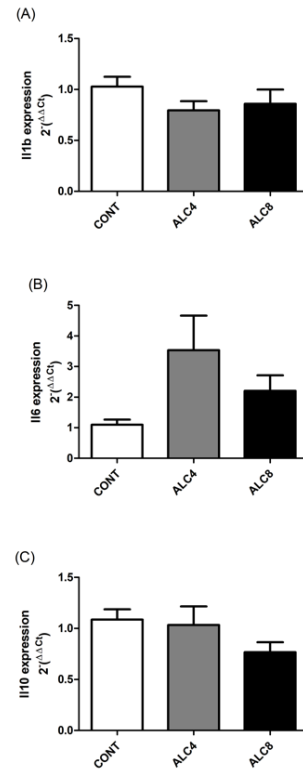


Figure 3

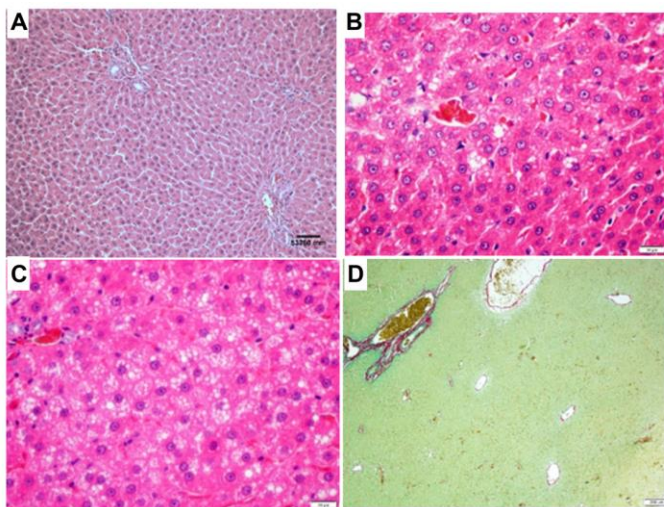


Figure 4

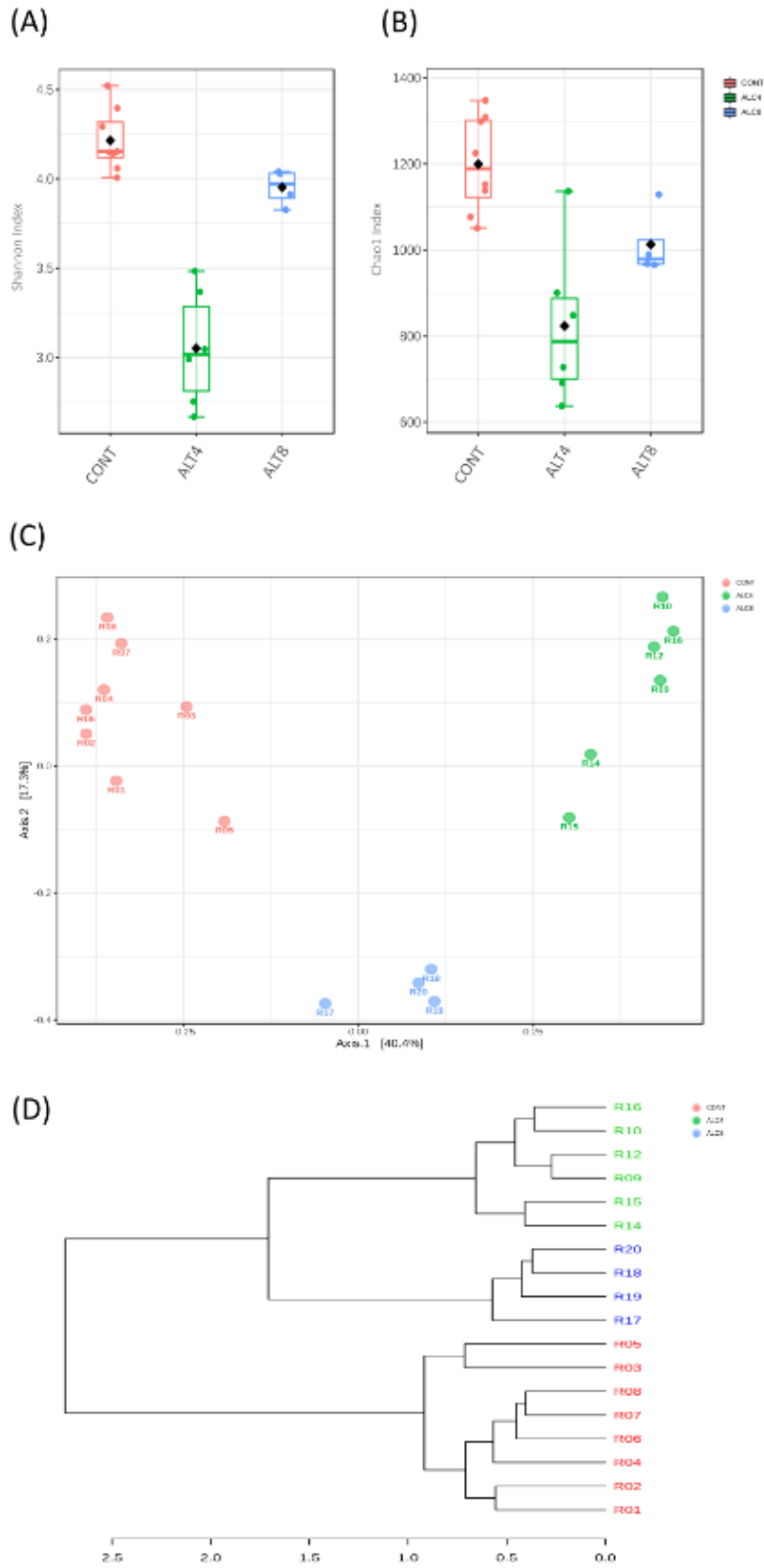


Figure 5

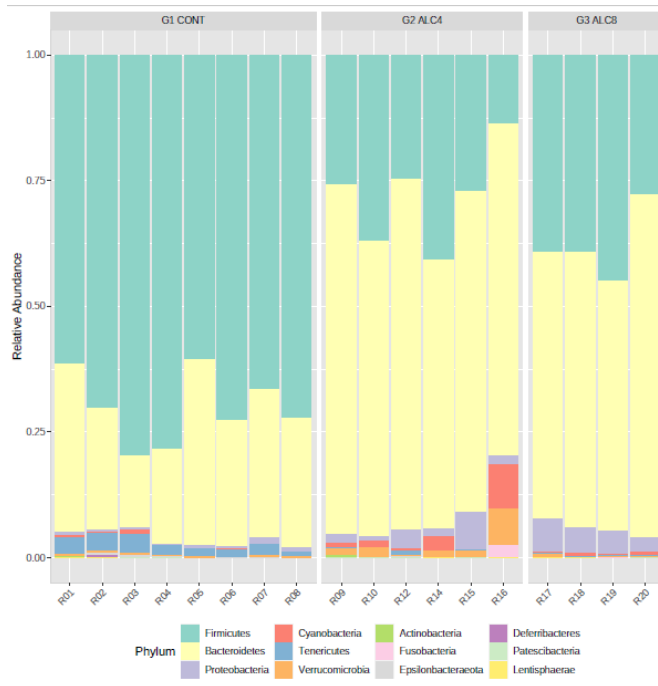
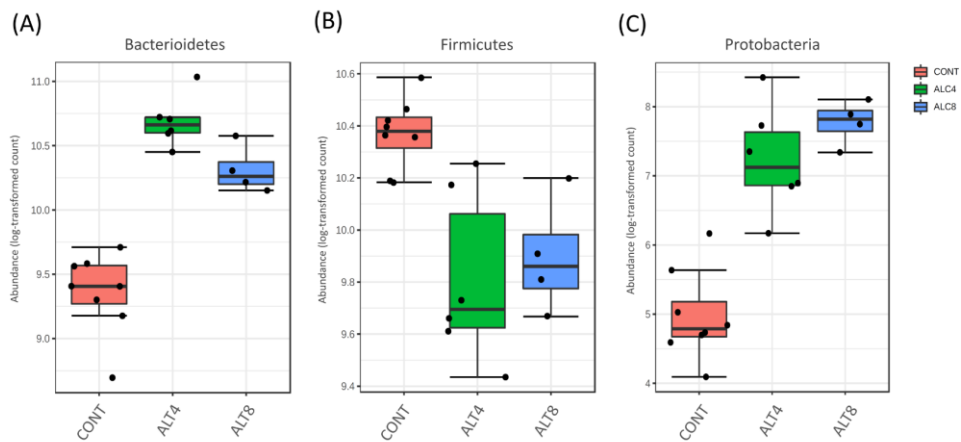


Figure 6



Supplementary Table-1

**Probe Identification**

Supplementary Table-1 describes the identification of TaqMan probes that were used to evaluate the gene expression of inflammatory markers in the liver.

**Supplementary Table 1: PROBE IDENTIFICATION**

Assay Name	Assay ID
<i>Il1b</i>	Rn00580432_m1
<i>Il6</i>	Rn01410330_m1*
<i>Il10</i>	Rn00563409_m1*

## **8. CONCLUSÃO**

O modelo desenvolvido foi capaz de induzir anormalidades descritas na DHA em humanos como parâmetros bioquímicos, histológicos hepáticos e disbiose intestinal. No entanto, não desenvolveu inflamação que é um ponto chave para a progressão da doença. O objetivo de desenvolver um modelo com custo inferior e metodologicamente mais simples, em comparação a outros modelos existentes, foi alcançado uma vez que a dieta empregada é mais barata que a dieta Liber-DeCarli e que o modelo não demanda a realização de procedimentos cirúrgicos ou utilização de equipamentos especiais.



## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O modelo experimental desenvolvido neste trabalho é uma opção viável para estudar os mecanismos e a fisiopatologia da DHA inicial. O modelo utiliza uma metodologia simples e custo relativamente baixo, facilitando a reprodução por outros centros de pesquisa. Comparando somente a alimentação crônica de álcool, a dieta Lieber-DeCarli tem um custo médio diário por rato *Wistar* de R\$ 4,50 (Bio-Serv®), enquanto o custo diário por animal neste estudo foi de R\$ 0,36.

A concentração de etanol na solução foi optada por também ser utilizada em outros estudos com fornecimento crônico de álcool<sup>167</sup> e a inclusão da sacarina sódica foi para melhorar a palatabilidade, sem adicionar calorias. Assim, o intuito foi contribuir para o consumo da solução quando comparado sem o uso deste adoçante. Esta ideia foi uma sugestão da veterinária responsável pelo biotério, pois já havia tido experiências neste quesito. Devido à aversão ao álcool, característica dos roedores, não foi ofertada água pura, pois poderia diminuir o consumo da solução alcoólica.

Os roedores, ainda, têm reconhecida resistência à lesão hepática alcoólica, motivo pelo qual optou-se por fornecer dieta hiperlipídica concomitante, como um golpe adicional. A semente de girassol foi escolhida principalmente pela semelhança com a dieta Lieber-DeCarli, com características nutricionais importantes, como baixo teor de carboidratos, fornecendo gorduras, com predomínio de gordura monoinsaturada. Existem rações hiperlipídicas sólidas, utilizadas em modelos de obesidade, síndrome metabólica e doença hepática gordurosa não-alcoólica, entre outros, que poderiam ser testadas em substituição à semente de girassol. O custo diário para cada animal desta dieta em média é de R\$ 2,00 (PragSoluções®), também mais caro que a semente de girassol. Entretanto, comparar uma dieta hiperlipídica

sólida, com 20% de proteína, 20% de carboidrato e 60% de lipídeo, talvez possa ser interessante no futuro, para avaliar se a fonte lipídica tem influência no desfecho.

Por certo, o modelo aqui apresentado que não é apenas alcóólico, uma vez que foi utilizada uma fonte extra de gordura. Porém, sabe-se da necessidade da inclusão de outros golpes para estudar a DHA em roedores. Os estudos realizados pelo nosso grupo na DHA em zebrafish,<sup>9,10,11,12</sup> ainda quando coordenado pela Profa. Themis Reverbel da Silveira, não utilizaram qualquer outro aditivo ao álcool, e talvez essa possa ser uma vantagem dos peixes em relação aos roedores. O projeto original deste estudo incluía outros grupos experimentais com o objetivo de avaliar o efeito individual de cada componente. Os animais receberiam, em diferentes grupos, ração padrão, água e sobrecarga alcoólica; ração padrão mais solução alcoólica com e sem sobrecarga; semente de girassol e água, com e sem sobrecarga alcoólica; e semente de girassol mais solução alcoólica sem sobrecarga. Seria interessante avaliar as respostas, mas optou-se por restringir o estudo aos três grupos descritos, para limitar o tamanho amostral e a utilização de animais. Assim, fica claro que o estudo se propunha a prospectar qual a melhor forma de induzir DHA, o que abre espaço para refinamento futuro do modelo. De fato, é importante notar que o modelo não foi capaz de promover doença mais avançada em ratos. Até o momento, fibrose foi observada somente em estudos com modelos que utilizaram a dieta Lieber-DeCarli em conjunto com dietilnitrosamina ou tetracloreto de carbono e ainda etanol com tetracloreto de carbono, o que leva à especulação de que seriam esses modelos para induzir carcinogênese, e não DHA. O modelo de Tsukamoto-French, em que pese sua complexidade, é o mais bem-sucedido até agora.

Outro aspecto bastante significativo do presente estudo é a alta taxa de mortalidade decorrente da sobrecarga alcoólica oferecida, em especial no grupo

exposto ao consumo crônico de etanol por oito semanas. Após a sua administração, os animais apresentaram sudorese e letargia. Foram monitorados a respiração e os batimentos cardíacos, mas após duas horas houve as mortes, que foram imputadas à depressão do sistema nervoso central. Ajustes ao modelo devem ser discutidos e realizados para nova experimentação, como por exemplo reduzir a dose de álcool na sobrecarga, alterar o tempo e ou utilizar outra fonte lipídica na dieta. Talvez fosse interessante avaliar animais que recebessem apenas a administração crônica, sem a sobrecarga alcoólica, como estava programado no início do projeto, mas há de se perguntar se eles teriam feito doença ainda menos significativa.

Optou-se no estudo por avaliar IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 como marcadores inflamatórios no tecido hepático, no entanto não houve diferença entre os grupos. Este foi um achado surpreendente, até porque todos os outros componentes comuns da DHA, como esteatose, acúmulo de gordura hepática e parâmetros bioquímicos que avaliam a lesão estavam alterados. Talvez devessem ter sido avaliados outros marcadores como TNF- $\alpha$ , miR-122 e miR-155. Recentemente, nosso grupo publicou estudos em zebrafish mostrando aumento de TNF- $\alpha$  e expressão hepática e circulante aumentada dos microRNAs descritos. Como há material armazenado, essas determinações poderão ser feitas na sequência.

Este trabalho experimental é um passo para construção do entendimento da DHA e da sua relação com a microbiota intestinal. Com ele podem ser estudados possíveis tratamentos como probióticos, antibióticos não-absorvíveis, como rifaximina, e, ainda, agentes antioxidantes, antagonistas TLR, fatores de crescimento e drogas antifibróticas, entre outros, uma vez que atualmente são inexistentes as possibilidades terapêuticas para esta doença. Já está em curso no Laboratório Experimental em Gastroenterologia e Hepatologia (LEHG) do HCPA projeto para

refinamento do modelo aqui apresentado, incluindo a exploração de novas formas de terapia na DHA.

O desenvolvimento deste modelo em ratos seria o braço experimental da tese de doutorado aqui apresentada. Concomitante a ele foi iniciado um estudo clínico focado na avaliação da disbiose intestinal promovida pelo álcool e o efeito da abstenção sobre a microbiota, mas a pandemia de COVID-19, com a redução da internação por doença hepática e psiquiátrica, impactou de forma significativa o início das coletas. Até o momento foram incluídos 50% dos pacientes projetados para a composição da amostra. Este estudo clínico está sendo conduzido na Unidade de Psiquiatria e Adição Forense do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em parceria com o grupo liderado pelos Profs. Felix Kessler e Lisia von Diemen. Estão sendo coletados dados sociodemográficos e antropométricos, sangue e saliva para avaliação de parâmetros bioquímicos e marcadores inflamatórios e parácrinos, cabelo para avaliação de cortisol e, ainda, fezes para avaliação da microbiota intestinal.

Por outro lado, ao longo do período de doutorado, a aluna colaborou em atividades do grupo de pesquisa do LEHG, o que resultou, até o momento, em dois artigos publicados; um deles, como primeira autora, na revista *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, com fator de impacto 2,947 e Qualis A4, intitulado “*Low levels of Lysosomal Acid Lipase (LAL) activity increases necroinflammation in adult patients with biopsy-proven metabolic associated fatty liver disease*”, com o objetivo de investigar a atividade da LAL em pacientes com doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica (ANEXO A); o outro, na revista *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, com fator de impacto 11,382 e Qualis A1, intitulado “*Interaction of Microbiome, Diet, and Hospitalizations Between Brazilian and American Patients With Cirrhosis*”, em colaboração com a Universidade de São Paulo

(grupo da Profa. Claudia Oliveira) e a Virginia Commonwealth University (grupo do Prof. Jasmohan Bajaj), Estados Unidos, comparando cirróticos brasileiros e americanos em relação à dieta, microbiota e impacto nas hospitalizações (ANEXO B).

Apesar de a DHA ser muito antiga, ainda há perguntas sem respostas. O modelo experimental descrito pode auxiliar em estudos pré-clínicos de drogas e será repetido pelo grupo de pesquisa, com adaptações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METaViR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997;349:825–32.
- 2- Mathurin P, Bataller R. Trends in the management and burden of alcoholic liver disease. *J Hepatol.* 2015;62(1 Suppl):S38-S46.
- 3- WHO, World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization, 2018. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274603>.
- 4- Bittermann T, Mahmud N, Abt P. Trends in Liver Transplantation for Acute Alcohol-Associated Hepatitis During the COVID-19 Pandemic in the US. *JAMA Netw Open.* 2021;4(7):e2118713. Published 2021 Jul 1.
- 5- Lackner C, Spindelboeck W, Haybaeck J, Douschan P, Rainer F, Terracciano L, et al. Histological parameters and alcohol abstinence determine long-term prognosis in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol.* 2017 Mar;66(3):610-618.
- 6- Ndugga N, Lightbourne TG, Javaherian K, Cabezas J, Verma N, Barritt AS 4th, et al. Disparities between research attention and burden in liver diseases: implications on uneven advances in pharmacological therapies in Europe and the USA. *BMJ Open.* 2017 Mar 22;7(3):e013620.
- 7- Degré D, Stauber RE, Englebert G, Sarocchi F, Verset L, Rainer F, et al. Long-term outcomes in patients with decompensated alcohol-related liver disease, steatohepatitis and Maddrey's discriminant function <32. *J Hepatol.* 2020 Apr;72(4):636-642.

8- Engen PA, Green SJ, Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A. The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. *Alcohol Res.* 2015;37(2):223-36.

9- Schneider AC, Gregório C, Uribe-Cruz C, Guizzo R, Malysz T, Faccioni-Heuser MC, et al. Chronic exposure to ethanol causes steatosis and inflammation in zebrafish liver. *World J Hepatol.* 2017 Mar 18;9(8):418-426.

10- Bernardo HT, Agostini JF, Toé HCZD, Vieira KM, Baldin SL, Schuck PF, et al. Cholinergic system and exploratory behavior are changed after weekly-binge ethanol exposure in zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav.* 2019 Nov;186:172790.

11- Agostini JF, Toé HCZD, Vieira KM, Baldin SL, Costa NLF, Cruz CU, et al. Cholinergic System and Oxidative Stress Changes in the Brain of a Zebrafish Model Chronically Exposed to Ethanol. *Neurotox Res.* 2018 May;33(4):749-758.

12- Pasqualotto A, Ayres R, Longo L, Del Duca Lima D, Losch de Oliveira D, Alvares-da-Silva MR, et al. Chronic exposure to ethanol alters the expression of miR-155, miR-122 and miR-217 in alcoholic liver disease in an adult zebrafish model. *Biomarkers.* 2021 Mar;26(2):146-151.

13- Bruch-Bertani JP, Uribe-Cruz C, Pasqualotto A, Longo L, Ayres R, Beskow CB, et al. Hepatoprotective Effect of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG Through the Modulation of Gut Permeability and Inflammasomes in a Model of Alcoholic Liver Disease in Zebrafish. *J Am Coll Nutr.* 2020 Feb;39(2):163-170.

14- Mitra S, De A, Chowdhury A. Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases. *Transl Gastroenterol Hepatol.* 2020;5:16. Published 2020 Apr 5.

15- Yoon Y-H, Chen CM. Liver cirrhosis mortality in the United States: national, state, and regional trends, 2000–2013. 2016. Disponível em: <https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/surveillance105/Cirr13.htm>.

16- Singal AK, Bataller R, Ahn J, Kamath PS, Shah VH. ACG Clinical Guideline: Alcoholic Liver Disease. *Am J Gastroenterol*. 2018;113(2):175-194.

17- NIAAA, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Disponível em: <https://www.niaaa.nih.gov/alcohols-effects-health/overview-alcohol-consumption/what-standard-drink>

18- CISA, Centro de Informações sobre Saúde e Álcool CISA. Disponível em: <https://cisa.org.br/index.php/sua-saude/informativos/artigo/item/48-definicao-de-dose-padrao>

19- Than NN, Newsome PN. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*. 2015; 239 (1): 192-202.

20- Arab JP, Arrese M, Trauner M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Pathol*. 2018; 13: 321-50.

21- Singal AK, Bataller R, Ahn J, Kamath PS, Shah VH. ACG Clinical Guideline: Alcoholic Liver Disease. *Am J Gastroenterol*. 2018;113(2):175-194.

22 - Bellentani S, Saccoccio G, Costa G, Tiribelli C, Manenti F, Sodde M, et al. Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage. The Dionysos Study Group. *Gut*. 1997 Dec;41(6):845-50.

23- Grant BF, Goldstein RB, Saha TD, Chou SP, Jung J, Zhang H, et al. Epidemiology of *DSM-5* alcohol use disorder: Results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions III. *JAMA Psychiatry*. 2015;72:757–766.

24- Teli MR, Day CP, Burt AD, Bennett MK, James OF. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. *Lancet*. 1995 Oct 14;346(8981):987-90.



25- Stickel F, Datz C, Hampe J, Bataller R. Pathophysiology and Management of Alcoholic Liver Disease: Update 2016. *Gut Liver*. 2017 Mar 15;11(2):173-188. Erratum in: *Gut Liver*. 2017 May 15;11(3):447.

26- Stickel F. Alcoholic cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 815:113-130.

27- Ganne-Carrie N, Chaffaut C, Bourcier V, Archambeaud I, Perarnau JM, Oberti F, et al. Estimate of hepatocellular carcinoma incidence in patients with alcoholic cirrhosis. *J. Hepatol*. 2018;69:1274–1283.

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

29- Askgaard G, Gronbaek M, Kaer MS, Tjonneland A, Tolstrup JS. Alcohol drinking pattern and risk of alcoholic liver cirrhosis: a prospective cohort study. *J Hepatol*. 2015 May;62(5):1061-7.

30- Eagon PK. Alcoholic liver injury: influence of gender and hormones. *World J Gastroenterol*. 2010;16:1377–1384.

31- Baraona E, Abittan CS, Dohmen K, Moretti M, Pozzato G, Chayes ZW, et al. Gender differences in pharmacokinetics of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001 Apr;25(4):502-7.

32- Marshall AW, Kingstone D, Boss M, Morgan MY. Ethanol elimination in males and females: relationship to menstrual cycle and body composition. *Hepatology*. 1983;3:701–706.

33- Frezza M, di Padova C, Pozzato G, Terpin M, Baraona E, Lieber CS. High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. *N Engl J Med*. 1990 Jan 11;322(2):95-9.

- 34- Hart CL, Morrison DS, Batty GD, Mitchell RJ, Davey Smith G. Effect of body mass index and alcohol consumption on liver disease: analysis of data from two prospective cohort studies. *BMJ*. 2010 Mar 11;340:c1240.
- 35- Shoreibah M, Anand BS, Singal AK. Alcoholic hepatitis and concomitant hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2014;20:11929–11934.
- 36- Gitto S, Micco L, Conti F, Andreone P, Bernardi M. Alcohol and viral hepatitis: a mini-review. *Dig Liver Dis*. 2009;41:67–70.
- 37- Nahon P, Sutton A, Rufat P, Ziol M, Thabut G, Schischmanoff PO, et al. Liver iron, HFE gene mutations, and hepatocellular carcinoma occurrence in patients with cirrhosis. *Gastroenterology*. 2008 Jan;134(1):102-10.
- 38- Salameh H, Raff E, Erwin A, Seth D, Nischalke HD, Falletti E. PNPLA3 Gene Polymorphism Is Associated With Predisposition to and Severity of Alcoholic Liver Disease. *Am J Gastroenterol*. 2015 Jun;110(6):846-56.
- 39- Meroni M, Longo M, Dongiovanni P. Alcohol or Gut Microbiota: Who Is the Guilty?. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4568.
- 40- Kennedy OJ, Roderick P, Buchanan R, Fallowfield JA, Hayes PC, Parkes J. Systematic review with meta-analysis: coffee consumption and the risk of cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43:562–574.
- 41- Dam MK, Flensburg-Madsen T, Eliassen M, Becker U, Tolstrup JS. Smoking and risk of liver cirrhosis: a population-based cohort study. *Scand J Gastroenterol*. 2013;48:585–591.
- 42- Monto A, Patel K, Bostrom A, Pianko S, Pockros P, McHutchison JG, et al. Risks of a range of alcohol intake on hepatitis C-related fibrosis. *Hepatology*. 2004 Mar;39(3):826-34.

43- Hart CL, Morrison DS, Batty GD, Mitchell RJ, Davey Smith G. Effect of body mass index and alcohol consumption on liver disease: analysis of data from two prospective cohort studies. *BMJ*. 2010;340:c1240.

44- Naveau S, Giraud V, Borotto E, Aubert A, Capron F, Chaput JC. Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology*. 1997;25:108–111.

45- Raynard B, Balian A, Fallik D, Capron F, Bedossa P, Chaput JC, et al. Risk factors of fibrosis in alcohol-induced liver disease. *Hepatology*. 2002 Mar;35(3):635-8.

46- Buyco DG, Martin J, Jeon S, Hooks R, Lin C, Carr R. Experimental models of metabolic and alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2021;27(1):1-18. doi:10.3748/wjg.v27.i1.1

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

48- Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, Fang Y, Younossi Y, Mir H, et al. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011 Jun;9(6):524-530.e1; quiz e60.

49- Abureesh M, Alkhayyat M, Abualnadi I, Badran R, Henneberry JD, Sadiq W, et al. Epidemiology of Depressive Disorders in Patients With Liver Cirrhosis: A Population-Based Study in the United States. *Prim Care Companion CNS Disord*. 2022 Jan 13;24(1):20m02889.

50- Yoon Y-H, Chen CM. Liver cirrhosis mortality in the United States: national, state, and regional trends, 2000–2013. 2016.

51- Sheron N. Alcohol and liver disease in Europe-Simple measures have the potential to prevent tens of thousands of premature deaths. *J Hepatol* 2016;64:957-67.

52- Mukherjee PS, Vishnubhatla S, Amarapurkar DN, Das K, Sood A, Chawla YK, et al. Etiology and mode of presentation of chronic liver diseases in India: A multi centric study. *PLoS One*. 2017 Oct 26;12(10):e0187033.

53 - Sarin SK, Kumar M, Eslam M, George J, Al Mahtab M, Akbar SMF, et al. Liver diseases in the Asia-Pacific region: a Lancet Gastroenterology & Hepatology Commission. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020 Feb;5(2):167-228.

54- Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *N. Engl. J. Med*. 2009;360:2758–2769.

55- Mann RE, Smart RG, Govoni R. The epidemiology of alcoholic liver disease. 2004. Disponível em: <https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh27-3/209-219.htm>.

56- European Association for the Study of Liver. EASL clinical practical guidelines: management of alcoholic liver disease. *J Hepatol*. 2012;57:399–420.

57- Stockwell T, Zhao J, Greenfield T, Li J, Livingston M, Meng Y. Estimating under- and over-reporting of drinking in national surveys of alcohol consumption: identification of consistent biases across four English-speaking countries. *Addiction*. 2016;111:1203–1213.

58- Tu HP, Tung YC, Tsai WC, Lin GT, Ko YC, Lee SS. Alcohol-related diseases and alcohol dependence syndrome is associated with increased gout risk: a nationwide population-based cohort study. *Joint Bone Spine*. Epub 2016 May 26.

59- Lowe JM, McDonnell MG, Leickly E, Angelo FA, Vilardaga R, McPherson S, et al. Determining ethyl glucuronide cutoffs when detecting self-reported alcohol use in addiction treatment patients. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015 May;39(5):905-10.

60- Alatalo P, Koivisto H, Puukka K, Hietala J, Anttila P, Bloigu R, et al O. Biomarkers of liver status in heavy drinkers, moderate drinkers and abstainers. *Alcohol Alcohol*. 2009 Mar-Apr;44(2):199-203.

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

62- Tannapfel A, Denk H, Dienes HP, Langner C, Schirmacher P, Trauner M, et al. Histopathological diagnosis of non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. *Virchows Arch*. 2011 May;458(5):511-23.

63-Lackner C, Stauber RE, Davies S, Denk H, Dienes HP, Gnemmi V, et al. Development and prognostic relevance of a histologic grading and staging system for alcohol-related liver disease. *J Hepatol*. 2021 Oct;75(4):810-819.

64- Konishi M, Ishii H. Role of microsomal enzymes in development of alcoholic liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(Suppl 1):S7–S10.

65- Jones AL. Anatomy of the normal liver. In: Zakim D, Boyer TD, editors. *Hepatology: A Textbook of Liver Disease*, Third Edition. Philadelphia: W.B. Saunders; 1996. pp. 3–32.

66- Zakhari S, Li TK. Determinants of alcohol use and abuse: Impact of quantity and frequency patterns on liver disease. *Hepatology*. 2007;46(6):2032–2039.

67- Aragon CM, Rogan F, Amit Z. Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. *Biochemical Pharmacology*. 1992;44(1):93–98

68- Donohue TM, Jr, Tuma DJ, Sorrell MF. Acetaldehyde adducts with proteins: Binding of [14C]acetaldehyde to serum albumin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1983;220(1):239–246.

69- Kenney WC. Acetaldehyde adducts of phospholipids. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1982;6(3):412–416.

70- Brooks PJ, Zakhari S. Acetaldehyde and the genome: Beyond nuclear DNA adducts and carcinogenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2014;55(2):77–91.

71- Mauch TJ, Donohue TM Jr, Zetterman RK, Sorrell MF, Tuma DJ. Covalent binding of acetaldehyde selectively inhibits the catalytic activity of lysine-dependent enzymes. *Hepatology*. 1986 Mar-Apr;6(2):263-9.

72- Donohue TM, Jr Alcohol-induced steatosis in liver cells. *World Journal of Gastroenterology*. 2007;13(37):4974–4978.

73- Dilger K, Metzler J, Bode JC, Klotz U. CYP2E1 activity in patients with alcoholic liver disease. *Journal of Hepatology*. 1997;27(6):1009–1014.

74- Lieber CS, DeCarli LM. Ethanol oxidation by hepatic microsomes: Adaptive increase after ethanol feeding. *Science*. 1968;162(3856):917–918.

75- Roberts BJ, Song BJ, Soh Y, Park SS, Shoaf SE. Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization. Role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1. *J Biol Chem*. 1995 Dec 15;270(50):29632-5.

76- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002;18(10):872–879.

77- Chen LH, Xi S, Cohen DA. Liver antioxidant defenses in mice fed ethanol and the AIN-76A diet. *Alcohol*. 1995;12(5):453–457.

78- Dong X, Liu H, Chen F, et al. MiR-214 promotes the alcohol-induced oxidative stress via down-regulation of glutathione reductase and cytochrome P450 in liver cells. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2014;38(1):68–77.

79- Tuma DJ, Thiele GM, Xu D, Klassen LW, Sorrell MF. Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration. *Hepatology*. 1996 Apr;23(4):872-80.

80- Ayala A, Munoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014;2014:1–31.

81- Scoccianti C, Cecchini M, Anderson AS, Berrino F, Boutron-Ruault MC, Espina C, et al. European Code against Cancer 4th Edition: Alcohol drinking and cancer. *Cancer Epidemiol.* 2015 Dec;39 Suppl 1:S67-74. Epub 2015 Jun 24. Corrected and republished in: *Cancer Epidemiol.* 2016 Dec;45:181-188.

82- Osna NA, Donohue TM Jr, Kharbanda KK. Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and Current Management. *Alcohol Res.* 2017;38(2):147-161.

83- Steiner J, Lang C. Alcohol, adipose tissue and lipid dysregulation. *Biomolecules* 2017;7:16.

84- Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Burt AD. Fatty liver disease: alcoholic and non-alcoholic. In: Burt A, Portmann B, Ferrell L, editors. *MacSween's pathology of the liver.* 6th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2012. pp. 293–360.

85- Roh YS, Zhang B, Loomba R, Seki E. TLR2 and TLR9 contribute to alcohol-mediated liver injury through induction of CXCL1 and neutrophil infiltration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;309:G30–G41.

86- Petrasek J, Csak T, Szabo G. Toll-like receptors in liver disease. *Adv Clin Chem.* 2013;59:155–201.

87- Szabo G, Petrasek J. Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12:387–400.

88- Schuppan D. Liver fibrosis: Common mechanisms and antifibrotic therapies. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2015 Sep;39 Suppl 1:S51-9.

89- Inokuchi S, Tsukamoto H, Park E, Liu ZX, Brenner DA, Seki E. Toll-like receptor 4 mediates alcohol-induced steatohepatitis through bone marrow-derived and endogenous liver cells in mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011 Aug;35(8):1509-18.

90- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(4):2247–2250.

91- Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest*. 2003 Nov;112(9):1383-94.

92- Elinav E, Ali M, Bruck R, Brazowski E, Phillips A, Shapira Y, et al. Competitive inhibition of leptin signaling results in amelioration of liver fibrosis through modulation of stellate cell function. *Hepatology*. 2009 Jan;49(1):278-86.

93- Patsenker E, Stoll M, Millonig G, Agaimy A, Wissniowski T, Schneider V, et al. Cannabinoid receptor type I modulates alcohol-induced liver fibrosis. *Mol Med*. 2011;17(11-12):1285-94.

94- Zamara E, Novo E, Marra F, Gentilini A, Romanelli RG, Caligiuri A, et al. 4-Hydroxynonenal as a selective pro-fibrogenic stimulus for activated human hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 2004 Jan;40(1):60-8.

95- Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S35–S50.

96- Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:599–612.

97- Villanueva A, Portela A, Sayols S, Battiston C, Hoshida Y, Méndez-González J, et al. DNA methylation-based prognosis and epidrivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2015 Jun;61(6):1945-56.



- 98- Stickel AK, Charlton MR. Nutrition in alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis* 2012;16:805–26.
- 99- Stickel F, Hoehn B, Schuppan D, Seitz HK. Review article: nutritional therapy in alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;18:357–373.
- 100- Plauth M, Cabré E, Riggio O, Assis-Camilo M, Pirlich M, Kondrup J, et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Liver disease. *Clin Nutr*. 2006 Apr;25(2):285-94.
- 101- Koretz RL, Avenell A, Lipman TO. Nutritional support for liver disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;(5):CD008344.
- 102- Marchesini G, Dioguardi FS, Bianchi GP, Zoli M, Bellati G, Roffi L, et al. Long-term oral branched-chain amino acid treatment in chronic hepatic encephalopathy. A randomized double-blind casein-controlled trial. The Italian Multicenter Study Group. *J Hepatol*. 1990 Jul;11(1):92-101.
- 103- Muto Y, Sato S, Watanabe A, Moriwaki H, Suzuki K, Kato A, et al. Effects of oral branched-chain amino acid granules on event-free survival in patients with liver cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005 Jul;3(7):705-13.
- 104- Mendenhall C, Roselle GA, Gartside P, Moritz T. Relationship of protein calorie malnutrition to alcoholic liver disease: a reexamination of data from two Veterans Administration Cooperative Studies. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995;19:635–641.
- 105- Moreno C, Langlet P, Hittelet A, Lasser L, Degré D, Evrard S, et al. Enteral nutrition with or without N-acetylcysteine in the treatment of severe acute alcoholic hepatitis: a randomized multicenter controlled trial. *J Hepatol*. 2010 Dec;53(6):1117-22.

106- Moreno C, Deltenre P, Senterre C, Louvet A, Gustot T, Bastens B, et al. Intensive Enteral Nutrition Is Ineffective for Patients With Severe Alcoholic Hepatitis Treated With Corticosteroids. *Gastroenterology*. 2016 Apr;150(4):903-10.e8.

107- de Ledinghen V, Beau P, Mannant PR. Early feeding or enteral nutrition in patients with cirrhosis after bleeding from esophageal varices? A randomized controlled study. *Dig Dis Sci* 1997; 42:536–41 .

108- Guarner F., Malagelada J. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003; 361:512–519.

109- Proctor L.M. The human microbiome project in 2011 and beyond. *Cell Host Microbe*. 2011;10:287–291.

110- Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*. 2008;320:1647–1651.

111- Vassallo G, Mirijello A, Ferrulli A, Antonelli M, Landolfi R, Gasbarrini A, et al. Review article: Alcohol and gut microbiota- The possible role of gut microbiota modulation in the treatment of alcoholic liver disease. *Aliment. Pharm.* 2015;41:917–927.

112- Bajaj JS. Alcohol, liver disease and the gut microbiota. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2019;16:235–246.

113- Larsen N, Vogensen FK, Van Den Berg FWJ, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS ONE*. 2010;5:E9085.

114- Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008;3:213–223.

115- Hold GL, Smith M, Grange C, Watt ER, El-Omar EM, Mukhopadhyay I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years? *World J. Gastroenterol.* 2014;20:1192–1210.

116- Kassinen A, Krogius-Kurikka L, Mäkivuokko H, Rinttilä T, Paulin L, Corander J, et al. The Fecal Microbiota of Irritable Bowel Syndrome Patients Differs Significantly From That of Healthy Subjects. *Gastroenterology.* 2007;133:24–33.

117- Nadal I, Donant E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J. Med. Microbiol.* 2007;56:1669–1674.

118- Goodman B, Gardner H. The microbiome and cancer. *J. Pathol.* 2018;244:667–676.

119- Lopetuso LR, Scaldaferri F, Petito V, Gasbarrini A. Commensal Clostridia: Leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut. Pathog.* 2013;5:23.

120- Mutlu E, Keshavarzian A, Engen P, Forsyth CB, Sikaroodi M, Gillevet P. Intestinal dysbiosis: A possible mechanism of alcohol-induced endotoxemia and alcoholic steatohepatitis in rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2009;33:1836–1846.

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

122- Mutlu EA, Gillevet PM, Rangwala H, Sikaroodi M, Naqvi A, Engen PA, et al. Colonic microbiome is altered in alcoholism. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 2012;302:G966–G978.

123- Queipo-Ortuño MI. Influence of Red Wine Polyphenols and Ethanol on the Gut Microbiota Ecology and Biochemical Biomarkers. *Am. J. Clin. Nutr.* 2012;95:1323–1334.

- 124- Engen PA, Green SJ, Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A. The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. *Alcohol Res.* 2015;37:223–236.
- 125- Sarin SK, Pande A, Schnabl B. Microbiome as a therapeutic target in alcohol-related liver disease. *J. Hepatol.* 2019;70:260–272.
- 126- Lindstedt G, Lindstedt S, Gustafsson BE. Mucus in intestinal contents of germfree rats. *J. Exp. Med.* 1965;121:201–213.
- 127- Avila MA, Dufour JF, Gerbes AL, Zoulim F, Bataller R, Burra P, et al. Recent advances in alcohol-related liver disease (ALD): summary of a Gut round table meeting. *Gut.* 2020 Apr;69(4):764-780.
128. Brandl K, Hartmann P, Jih LJ, Pizzo DP, Argemi J, Ventura-Cots M, et al. Dysregulation of serum bile acids and FGF19 in alcoholic hepatitis. *J Hepatol.* 2018 Aug;69(2):396-405
129. Hartmann P, Hochrath K, Horvath A, Chen P, Seebauer CT, Llorente C, et al. Modulation of the intestinal bile acid/farnesoid X receptor/fibroblast growth factor 15 axis improves alcoholic liver disease in mice. *Hepatology.* 2018 Jun;67(6):2150-2166.
- 130- Cresci GA, Glueck B, McMullen MR, Xin W, Allende D, Nagy LE. Prophylactic tributyrin treatment mitigates chronic-binge ethanol-induced intestinal barrier and liver injury. *J Gastroenterol Hepatol.* 2017 Sep;32(9):1587-1597.
- 131- Chen P, Torralba M, Tan J, Embree M, Zengler K, Stärkel P, et al. Supplementation of saturated long-chain fatty acids maintains intestinal eubiosis and reduces ethanol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology.* 2015 Jan;148(1):203-214.e16.

- 132- Hendriks T, Duan Y, Wang Y, Oh JH, Alexander LM, Huang W, et al. Bacteria engineered to produce IL-22 in intestine induce expression of REG3G to reduce ethanol-induced liver disease in mice. *Gut*. 2019 Aug;68(8):1504-1515.
- 133- Bode C, Bode CJ. Effect of alcohol consumption on the gut. *Best Pr. Res. Clin. Gastroenterol*. 2003;17:575–592.
- 134- Hartmann P, Seebauer CT, Schnabl B. Alcoholic liver disease: the gut micro-biome and liver cross talk. *Alcohol Clin Exp Res* 2015;39:763–75.
- 135- Rao R. Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009;50:638–44.
- 136- Bala S, Marcos M, Kodys K, Csak T, Catalano D, Mandrekar P, et al. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *J. Biol. Chem*. 2011;286:1436–1444.
- 137- Hritz I, Mandrekar P, Velayudham A, Catalano D, Dolganiuc A, Kodys K, et al. The critical role of toll-like receptor (TLR) 4 in alcoholic liver disease is independent of the common TLR adapter MyD88. *Hepatology*. 2008;48:1224–1231.
- 138- 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* 2018;15:397–411.
- 139- Yan AW, Fouts DE, Brandl J, Stärkel P, Torralba M, Schott E, et al. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2011;53:96–105.
- 140- Bode JC, Bode C, Heidelberg R, Dürr HK, Martini GA. Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. *Hepatogastroenterology*. 1984;31:30–34.

141- Bjorkhaug ST, Aanes H, Neupane SP, Bramness JG, Malvik S, Henriksen C, et al. Characterization of gut microbiota composition and functions in patients with chronic alcohol overconsumption. *Gut Microbes*. 2019;20:1–13.

142- Mathews S, Xu M, Wang H, Bertola A, Gao B. Animals models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of alcohol-induced liver disease: pathophysiology, translational relevance, and challenges. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014;306:G819–G823.

143- Mandrekar P, Bataller R, Tsukamoto H, Gao B. Alcoholic hepatitis: translational approaches to develop targeted therapies. *Hepatology*. 2016;64:1343–1355.

144- Lieber CS, DeCarli LM. Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol Alcohol*. 1989;24:197–211.

145- Tsukamoto H, French SW, Benson N, Delgado G, Rao GA, Larkin EC, et al. Severe and progressive steatosis and focal necrosis in rat liver induced by continuous intragastric infusion of ethanol and low fat diet. *Hepatology*. 1985;5:224–232.

146- French SW, Miyamoto K, Tsukamoto H. Ethanol-induced hepatic fibrosis in the rat: role of the amount of dietary fat. *Alcohol Clin Exp Res*. 1986;10:13S–19S.

147- Ueno A, Lazaro R, Wang PY, Higashiyama R, Machida K, Tsukamoto H. Mouse intragastric infusion (iG) model. *Nat Protoc*. 2012;7:771–781.

148- Bertola A, Mathews S, Ki SH, Wang H, Gao B. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model) *Nat Protoc*. 2013;8:627–637.

149- Leung TM, Lu Y, Yan W, Morón-Concepción JA, Ward SC, Ge X, et al. Argininosuccinate synthase conditions the response to acute and chronic ethanol-induced liver injury in mice. *Hepatology*. 2012 May;55(5):1596-1609.

150- Zhou Z, Wang L, Song Z, Lambert JC, McClain CJ, Kang YJ. A critical involvement of oxidative stress in acute alcohol-induced hepatic TNF-alpha production. *Am J Pathol.* 2003 Sep;163(3):1137-46.

151- Beier JI, Kaiser JP, Guo L, Martinez-Maldonado M, Arteel GE. Plasminogen activator inhibitor-1 deficient mice are protected from angiotensin II-induced fibrosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 2011;510:19–26.

152- Kao E, Shinohara M, Feng M, Lau MY, Ji C. Human immunodeficiency virus protease inhibitors modulate Ca<sup>2+</sup> homeostasis and potentiate alcoholic stress and injury in mice and primary mouse and human hepatocytes. *Hepatology.* 2012;56:594–604.

153- Lambert JC, Zhou Z, Wang L, Song Z, McClain CJ, Kang YJ. Prevention of alterations in intestinal permeability is involved in zinc inhibition of acute ethanol-induced liver damage in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003;305:880–886.

154- Kirpich I, Ghare S, Zhang J, Gobejishvili L, Kharebava G, Barve SJ, et al. Binge alcohol-induced microvesicular liver steatosis and injury are associated with down-regulation of hepatic *Hdac 1, 7, 9, 10, 11* and up-regulation of *Hdac 3*. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2012;36:1578–1586.

155- Abdelmegeed MA, Banerjee A, Jang S, Yoo SH, Yun JW, Gonzalez FJ, et al. CYP2E1 potentiates binge alcohol-induced gut leakiness, steatohepatitis, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 2013;65:1238–1245.

156- Cohen JI, Roychowdhury S, McMullen MR, Stavitsky AB, Nagy LE. Complement and alcoholic liver disease: role of C1q in the pathogenesis of ethanol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology.* 2010;139:664–674.

157- Leo MA, Lieber CS. Hepatic fibrosis after long-term administration of ethanol and moderate vitamin A supplementation in the rat. *Hepatology.* 1983;3:1–11

- 158- Brandon-Warner E, Schrum LW, Schmidt CM, McKillop IH. Rodent models of alcoholic liver disease: of mice and men. *Alcohol*. 2012;46:715–725.
- 159- Best CH, Hartroft WS. Liver damage produced by feeding alcohol or sugar and its prevention by choline. *Br Med J*. 1949;2:1002–1006, pl.
- 160- Keegan A, Martini R, Batey R. Ethanol-related liver injury in the rat: a model of steatosis, inflammation and pericentral fibrosis. *J Hepatol*. 1995;23:591–600.
- 161- Song M, Chen T, Prough RA, Cave MC, McClain CJ. Chronic Alcohol Consumption Causes Liver Injury in High-Fructose-Fed Male Mice Through Enhanced Hepatic Inflammatory Response. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016;40:518–528.
- 162- Meadows GG, Blank SE, Duncan DD. Influence of ethanol consumption on natural killer cell activity in mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 1989;13:476–479.
- 163- Cook RT, Schlueter AJ, Coleman RA, Tygrett L, Ballas ZK, Jerrells TR, et al. Thymocytes, pre-B cells, and organ changes in a mouse model of chronic ethanol ingestion--absence of subset-specific glucocorticoid-induced immune cell loss. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007;31:1746–1758.
- 164- Arvola A, Forsander O. Comparison between water and alcohol consumption in six animal species in free choice experiments. *Nature*. 1961;191:819–820.
- 165- Nanji AA, Mendenhall CL, French SW. Beef fat prevents alcoholic liver disease in the rat. *Alcohol Clin Exp Res*. 1989;13:15–19.
- 166- Xu MJ, Cai Y, Wang H, Altamirano J, Chang B, Bertola A, et al. Fat-Specific protein 27/CIDEA promotes development of alcoholic steatohepatitis in mice and humans. *Gastroenterology*. 2015;149:1030–1041.e6.



167- Lamas-Paz A, Hao F, Nelson LJ, Vázquez MT, Canals S, Gómez Del Moral M, et al. Alcoholic liver disease: Utility of animal models. *World J Gastroenterol*. 2018 Dec 7;24(45):5063-5075.

168- Lazaro R, Wu R, Lee S, Zhu NL, Chen CL, French SW, et al. Osteopontin deficiency does not prevent but promotes alcoholic neutrophilic hepatitis in mice. *Hepatology*. 2015;61:129–140.

169- Aroor AR, Restrepo RJ, Kharbanda KK, Shukla SD. Epigenetic histone modifications in a clinically relevant rat model of chronic ethanol-binge-mediated liver injury. *Hepatol. Int*. 2014;8(Suppl. S2):421–430.

170- Shukla SD, Aroor AR, Restrepo R, Kharbanda KK, Ibdah JA. In vivo acute on chronic ethanol effects in liver: A mouse model exhibiting exacerbated injury, altered metabolic and epigenetic responses. *Biomolecules*. 2015;5:3280–3294.

171- Ramirez T, Li YM, Yin S, Xu MJ, Feng D, Zhou Z, et al. Aging aggravates alcoholic liver injury and fibrosis in mice by downregulating sirtuin 1 expression. *J. Hepatol*. 2017;66:601–609.

172- Jaeschke H. Neutrophil-mediated tissue injury in alcoholic hepatitis. *Alcohol*. 2002;27:23–27.

173- Ki SH, et al. Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hepatology*. 2010;52:1291–1300.

Ki SH, Park O, Zheng M, Morales-Ibanez O, Kolls JK, Bataller R, et al. Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hepatology*. 2010 Oct;52(4):1291-300.

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

## ANEXO A

Thoen RU, Longo L, Neto SC, Álvares-da-Silva MR. Low levels of Lysosomal Acid Lipase (LAL) activity increases necroinflammation in adult patients with biopsy-proven metabolic associated fatty liver disease. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2021 Nov;45(6):101638. doi: 10.1016/j.clinre.2021.101638. Epub 2021 Mar 1. PMID: 33662773.

## **ANEXO B**

Álvares-da-Silva MR, Oliveira CP, Fagan A, Longo L, Thoen RU, Yoshimura Zitelli PM, Tanaka Ferreira RM, McGeorge S, Shamsaddini A, Farias AQ, Sikaroodi M, Gillevet PM, Bajaj JS. Interaction of Microbiome, Diet, and Hospitalizations Between Brazilian and American Patients With Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2022 Apr;20(4):930-940. doi: 10.1016/j.cgh.2021.03.045. Epub 2021 Apr 2. PMID: 33813071; PMCID: PMC8486893.