

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

**Efeito do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG em componentes do
inflamassoma NLRP3 e da permeabilidade intestinal em modelo de doença
hepática alcoólica**

JULIANA PAULA BRUCH BERTANI

Tese de doutorado

PORTO ALEGRE, BRASIL

Julho, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

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

**Efeito do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG em componentes do
inflamassoma NLRP3 e da permeabilidade intestinal em modelo de doença
hepática alcoólica**

JULIANA PAULA BRUCH BERTANI

Orientadora: Profa. Dra. Valesca Dal'Alba

Coorientadora: Profa. Dra. Carolina Uribe-Cruz

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

PORTO ALEGRE, BRASIL

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Bertani, Juliana Paula Bruch

Efeito do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG em componentes do inflamassoma NLRP3 e da permeabilidade intestinal em modelo de doença hepática alcoólica / Juliana Paula Bruch Bertani. -- 2018.

77 f.

Orientadora: Valesca Dall'Alba.

Coorientadora: Carolina Uribe-Cruz.

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, 2018.

1. Probióticos. 2. *Lactobacillus rhamnosus* GG. 3. Doença hepática alcoólica. 4. Inflamassomas. 5. Proteínas Tight Junctions. I. Dall'Alba, Valesca, orient. II. Uribe-Cruz, Carolina, coorient. III.

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

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Valesca Dall'Alba, que desde minha chegada ao programa de pós graduação com muita atenção e dedicação me orientou em cada passo importante. Dividiu seu conhecimento, seu tempo e foi fundamental para que eu me tornasse a pessoa e profissional que sou hoje. Muito obrigada por tudo que tens feito por mim durante todos estes anos.

À minha coorientadora Profa. Dra. Carolina Uribe-Cruz, por todo conhecimento me passado na área experimental, sendo fundamental para que esta tese fosse iniciada e concluída. Obrigada por todo auxílio e compreensão desde o primeiro momento.

Ao Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva e à Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira, só tenho a agradecer pela oportunidade de convívio e tamanha aprendizagem durante os anos no programa de pós graduação. Fazer parte dos grupos de pesquisa do Ambulatório e do Laboratório foi e será uma gratidão.

Às queridas colegas do Ambulatório de Nutrição em Gastroenterologia e do Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia, pela troca de experiências, auxílio nas etapas deste trabalho, pela amizade e família que criei neste momento de aprendizado.

Ao Prof. Dr. Afonso Luis Barth e a Dra. Daiana Lima-Morales do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana pela ajuda nas etapas iniciais deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, instituições de excelência que proporcionaram a minha formação e experiência acadêmica.

A minha família, que sempre me apoiou e me incentivou a alcançar todos os meus objetivos, não deixando com que eu desistisse nos diferentes obstáculos. Em

especial a meu pai que hoje não está mais presente para ver a conclusão deste sonho, mas sua educação e incentivo sempre foram fatores importantes para a conclusão deste trabalho.

Ao meu marido Francisco Corbellini Bertani, por sempre estar ao meu lado, com toda sua paciência, me incentivando em todos os momentos difíceis. Obrigada por seu companheirismo ao longo destes anos de dedicação ao doutorado.

Sumário

ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Álcool	10
2.2 Doença hepática alcoólica	11
2.3 Infiltrações e dha	15
2.4 Barreira e permeabilidade intestinal	17
2.4.1 Estrutura da barreira intestinal	18
2.4.2 Molécula de adesão Juncional (JAM)	20
2.4.3 Permeabilidade intestinal e álcool	20
2.4.4 Avaliação da permeabilidade intestinal	22
2.5 Zebrafish como modelo experimental	25
2.6 Probióticos	27
3. JUSTIFICATIVA	38
4. QUESTÃO DA PESQUISA	39
5. HIPÓTESE	40
6. OBJETIVOS	41
7. ARTIGO	42
8. CONCLUSÕES	66
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	67
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

RESUMO

Introdução: A doença hepática alcóolica (DHA), causada pelo consumo excessivo de álcool, está entre as principais causas de morte por doenças hepáticas no mundo. A DHA pode apresentar-se na forma aguda (hepatite alcoólica) ou crônica (esteatose, esteato-hepatite, fibrose e cirrose). Dentre os fatores envolvidos na patogênese da DHA, tanto os inflamassomas como o aumento da permeabilidade intestinal, têm sido implicados no desenvolvimento de fibrose hepática. **Objetivos:** Avaliar o efeito da suplementação com probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) sobre o acúmulo de lipídios hepáticos, na ativação dos marcadores dos inflamassomas e de permeabilidade intestinal em modelo experimental de DHA com *zebrafish*. **Metodologia:** Foi realizado experimento preliminar para avaliar a dose efetiva de LGG capaz de promover colonização intestinal no *zebrafish* adulto, *wild-type*.

foram divididos em quatro grupos (8 animais/grupo), sendo que 3 grupos receberam diferentes doses de LGG (0.4; 1; e 2 mg LGG/peixe/dia) e um grupo recebeu apenas ração, sem probiótico por 14 dias. Foram empregadas técnicas de análise de Gram, análise microbiológica e reação em cadeia da polimerase (PCR). Definida a dose, um novo experimento foi realizado e os animais divididos em três grupos (n = 64/grupo): Grupo etanol (E), Grupo etanol + probiótico (EP) - suplementado com 1mg LGG/peixe/dia, e grupo controle (C) - sem etanol e sem LGG. Os grupos E e EP foram expostos a uma concentração alcoólica de 0,5% por 28 dias. Ao final deste período, todos os animais foram eutanasiados sob anestesia, e os fígados foram coletados para coloração de *Oil Red* e avaliação do sistema inflamassoma através dos marcadores *Pycard*, Fator de Necrose Tumoral- α (*tnf- α*), *Caspase*, *Interleucina-10* (*il-10*) e *Interleucina-1 β* (*il-1 β*). Os intestinos foram coletados para avaliação dos marcadores de permeabilidade intestinal *Claudina* (*cldn*)-*c*, *cldn15a*, *cldn15b* e F11

Receptor (*f11r*). **Resultados:** Os testes de colonização indicaram que as doses 1 e 2 mg promoveram colonização intestinal após 14 dias, sendo a dose escolhida a dose mínima de 1mg LGG/peixe/dia. Ao final do segundo experimento, o Grupo EP, apresentou menor acumulação de lipídios hepáticos, menor expressão de *il-1 β* e maior expressão de *cln15a* quando comparado ao Grupo E. **Conclusões:** Foi possível verificar que a suplementação de probióticos com LGG foi protetora para a esteatose hepática em peixes expostos ao etanol. Além disso, o LGG teve ação na modulação da resposta inflamatória, promovendo diminuição da citocina pró-inflamatória *il-1 β* e de marcadores de permeabilidade intestinal, principalmente *cln15a*, melhorando a integridade da barreira intestinal.

Palavras-chave: Probióticos; *Lactobacillus rhamnosus* GG; Doença hepática alcoólica; Inflamassomas; Proteínas *Tight Junctions*; *Zebrafish*.

ABSTRACT

Alcoholic liver disease (ALD), caused by excessive alcohol consumption, is among the leading causes of death from liver disease in the world. Among the factors involved in the pathogenesis of ALD, both inflammasomes and increased gut permeability, have been linked in the development of hepatic fibrosis. Objectives: To assess the effect of supplementation with probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) on the accumulation of hepatic lipids, in the activation of inflammasomes and gut permeability markers in experimental model of ALD with zebrafish. Methodology: A preliminary experiment was conducted to assess the effective dose of LGG capable of promoting intestinal colonization in adult wild-type zebrafish. The fish were divided into four groups (8 animals/group), and 3 groups received different doses of LGG (0.4; 1, and 2 mg LGG/fish/day) and one group received only ration, without probiotic for 14 days. To achieve this assessment, gram analysis, microbiological analysis, and polymerase chain reaction (PCR) techniques were used. When the dose was set, a new experiment was done, animals were divided into three groups (n=64/group): Ethanol group (E), Ethanol + probiotic group (EP) - supplemented with 1mg LGG/fish/day, and control group (C) - without ethanol and without LGG. Groups E and EP were exposed to an alcohol concentration of 0.5% for 28 days. At the end of this period, all animals were euthanized under anesthesia, and livers were collected for Oil Red staining and assessment of the inflammasome system through *Pycard*, Tumor Necrosis Factor- α (*tnf- α*), *Caspase*, Interleukin-10 (*il-10*), and Interleukin-1 β (*il-1 β*) markers. Intestines were collected for evaluation of the gut permeability markers Claudine (*cldn*)-c, *cldn15a*, *cldn15b*, and F11 Receptor (*f11r*). Results: Colonization tests indicated that the 1 and 2 mg doses promoted intestinal colonization, and the minimum dose of 1 mg LGG/ fish/day was chosen. At the end of the second experiment, the Group EP

presented lower accumulation of hepatic lipids, lower $il-1\beta$ expression and higher *cldn15a* expression when compared to Group E. Conclusions: Was possible to verify that the supplementation of probiotics with LGG was protective for hepatic steatosis in fish exposed to ethanol. In addition, LGG had an effect on the modulation of the inflammatory response, promoting the reduction of the proinflammatory cytokine *il-1 β* and markers of intestinal permeability, mainly *cldn15a*, improving the structure of the gut barrier.

Keywords: probiotics; *Lactobacillus rhamnosus* GG; Alcoholic Liver Disease; Inflammasomes; Tight Junctions proteins; *Zebrafish*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH - Enzima álcool desidrogenase

ASC - Proteína *speck-like* associada à apoptose com domínio de recrutamento de caspase

CKs - Células de Kupffer

Cldn - Claudina

CYP2E1 - Citocromo P-450E1

DAMPs - Padrões moleculares associados a danos

DHA – Doença Hepática Alcoólica

IL - Interleucina

JA - Junções de aderência

JAM - Molécula de adesão juncional

LGG - *Lactobacillus rhamnosus* GG

LPS - Lipopolissacarídeo

MDA – Malondialdeído

MEOS microsomal ethanol oxidizing system

NLR - Receptores intracitoplasmáticos do tipo NOD

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos exógenos

TLR4 - *Toll-like* receptor 4

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

TJ - *Tight Junctions*

TGI - Trato gastrointestinal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo total de álcool per capita	11
Figura 2. Vias de metabolização do etanol.....	13
Figura 3. Ativação de um inflamassoma.....	16
Figura 4. Famílias de proteínas <i>Tight Junctions</i> : ocludina, claudinas e molécula de adesão juncional.....	19
Figura 5. Função de barreira intestinal normal e associada ao álcool	23
Figura 6. <i>Zebrafish</i> (Danio rerio)	27
Figura 7. Potenciais mecanismos de ação dos probióticos.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Meios de avaliação da permeabilidade intestinal.....25

Tabela 2 Estudos experimentais com uso de probióticos na DHA e DHGNA.....30

1. INTRODUÇÃO

O alcoolismo é um problema de saúde pública presente em diferentes grupos étnicos, em todos os níveis socioeconômicos e leva a perdas sociais e econômicas importantes. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a cada ano, aproximadamente 3,3 milhões de mortes no mundo são decorrentes do consumo excessivo do álcool, representando 5,9% do total de mortes. A faixa etária entre 20 e 39 anos é responsável pela maior parte das lesões fatais decorrentes do uso do álcool¹. Além disso, os custos relacionados ao tratamento por abuso de álcool chegam a mais de 1% do produto interno bruto nos países de alta e média renda ².

O álcool continua sendo uma das principais causas de doença hepática em todo o mundo. É comum que pacientes com doença hepática alcoólica (DHA) compartilhem os fatores de risco para lesões simultâneas de outros insultos hepáticos (por exemplo, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) coexistente ou hepatite viral crônica). A DHA engloba um espectro de lesão, variando de esteatose simples a cirrose e diversos fatores estão envolvidos na sua patogênese, entre eles a ativação dos componentes dos inflamassomas e o aumento da permeabilidade intestinal ³.

Os inflamassomas são caracterizados como complexos proteicos que detectam sinais associados à infecção e estresse, e desencadeiam respostas inflamatórias imediatas. A ativação do inflamassoma NLRP3 em especial, resulta na estimulação da caspase, que promove a maturação e a secreção de citocinas pró-inflamatórias

implicadas na lesão hepática alcoólica^{4,5}. Este mecanismo representa fator importante de novos alvos e/ou biomarcadores no campo das doenças do fígado⁶.

O epitélio intestinal é composto principalmente pelas *tight junctions* (TJ), um complexo de proteínas seletivamente permeável, entre as quais podemos destacar as do tipo *Junctional Adhesion Molecules* (JAM), Claudinas, Ocludinas e Zona de Inclusão. Estas proteínas exercem papel determinante na permeabilidade de células endoteliais e epiteliais, tanto em humanos quanto em modelos animais⁷, especialmente no *zebrafish* (BESKOW, 2018-submitted).

O álcool promove dano hepático e contribui para a progressão da DHA por meio de compostos tóxicos gerados pelo seu metabolismo, como no caso do acetaldeído, que pode levar a um aumento de permeabilidade⁸. O rompimento da integridade da barreira intestinal, induz translocação bacteriana e aciona resposta inflamatória no fígado⁹. A suplementação com probióticos mostra efeito benéfico ao hospedeiro, possivelmente por ações anti-inflamatórias e por meio da estabilização da barreira intestinal¹⁰. Em especial, o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) demonstra aumento da expressão das proteínas TJ e redução dos níveis de endotoxina circulatória, mostrando associação com hepato-proteção¹¹⁻¹³.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação com probiótico LGG sobre o acúmulo de lipídios hepáticos, na ativação dos marcadores dos inflamassomas e de permeabilidade intestinal em modelo experimental de DHA com *zebrafish*.

2. VISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Álcool

O álcool é um das drogas psicoativas mais antigas do mundo, com evidências arqueológicas de seu uso datando o ano 7200 a.C. na China e 4200 a.C. no Egito¹⁴. O consumo de bebidas era um elemento importante presente em banquetes, em rituais e selando acordos econômicos e políticos nas sociedades¹⁵. No período de 1920 a 1933, os Estados Unidos proibiu a produção, importação, transporte e venda de bebidas alcoólicas, no entanto, há evidências de que o consumo de álcool permaneceu por meio do mercado negro e de vendas ilegais. Entretanto, após a volta da liberação, foi possível verificar que o consumo de álcool aumentou lentamente até se igualar ao período anterior a proibição¹⁶.

O consumo da bebida alcoólica não é ilegal, assim, ele não é considerado como uma droga pelos seus consumidores¹⁷. Ao longo dos anos, a ingestão de bebidas alcoólicas per capita vem aumentando, equivalente a 8 a 9 litros por ano¹⁶. O consumo de álcool varia significativamente em todo o mundo: No norte da África e no Oriente Médio é particularmente baixo, por outro lado, na Europa Oriental a ingestão se mostra bastante alta, de 14 a 17 litros por pessoa por ano (**FIGURA 1**)¹⁶.

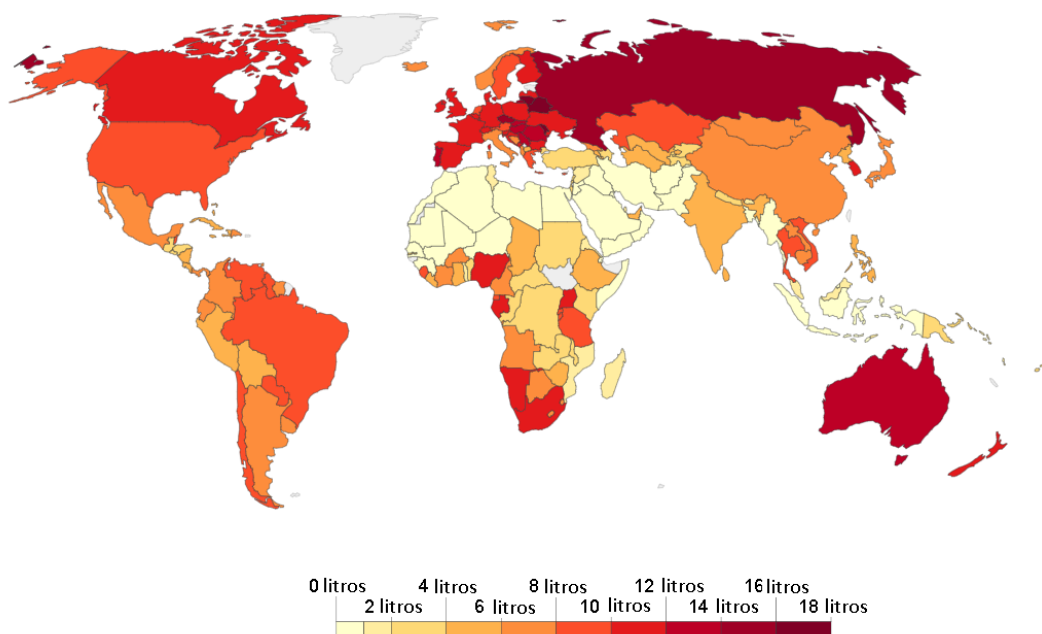


Figura 1. Consumo total de álcool per capita (litros de álcool puro), 2015. O consumo total de álcool per capita é baseado em projeções para a quantidade de consumo de álcool (litros de álcool) por pessoa com 15 anos ou mais por ano.

Fonte: Ritchie & Roser, 2018.

Há uma forte associação entre a ingestão excessiva de álcool e o aparecimento de problemas relacionados à saúde. Ao longo dos anos, programas sociais de prevenção ao consumo de álcool têm se mostrado efetivos para a redução da ingestão total de bebidas alcoólicas pela população e com isso houve diminuição das taxas de doenças relacionadas ao álcool¹⁹. É necessário dar continuidade a esses programas e também que sejam implementadas novas medidas de saúde pública e educação com a finalidade de reduzir ainda mais o consumo da droga ^{19,20}.

2.2 Doença hepática alcoólica

O alcoolismo é um problema de saúde pública, presente em diferentes níveis socioeconômicos e grupos étnicos. A prevalência do consumo de álcool tem

aumentado em todo o mundo segundo a OMS, estima-se que mais de 2 bilhões de pessoas ingerem bebidas alcoólicas e mais de 76,3 milhões são portadores de doenças associadas à ingestão de álcool²⁰. O consumo de álcool pode não apenas levar à dependência, mas também aumenta o risco de desenvolvimento de mais de 200 doenças, incluindo cirrose hepática e alguns tipos de câncer²¹. Além disso, promove aumento de ocorrências de acidentes de trânsito, da violência doméstica e de gastos envolvidos com tratamentos medicamentosos e internações hospitalares ²².

O álcool é a substância psicoativa lícita mais consumida no mundo, além de se destacar como uma das mais prejudiciais à saúde pública, tanto em termos de morbidade como mortalidade. Segundo o Relatório Global sobre Álcool e Saúde de 2014 da OMS, indivíduos com 15 anos ou mais consumiram em média 6,2 litros de álcool no ano de 2010. No Brasil, neste mesmo ano, estimou-se que houve um consumo total de 8,7 litros por pessoa, sendo o maior consumo entre homens em relação às mulheres²¹.

O Brasil é um dos principais fornecedores de substâncias psicoativas legais e ilegais do mundo. O aumento da renda per capita da população é acompanhado pelo aumento do consumo de substâncias ilícitas. Isto se explica pela facilidade de acesso da população, uma vez que há uma grande oferta de bebidas alcoólicas, muitos pontos de venda, falta de regulamentação e de fiscalização para sua comercialização ²³.

Entre as comorbidades envolvidas com o consumo excessivo ao álcool, destaca-se a DHA, a qual pode assumir a forma de desenvolvimento agudo (hepatite alcoólica) ou doença hepática crônica (esteatose, esteato-hepatite, fibrose e cirrose)²⁴. Possíveis fatores que afetam o seu desenvolvimento incluem a dose ingerida (40-80g/dia para homens e 20-40g/dia para mulheres)⁸, duração de consumo

e tipo de bebida alcoólica consumida, além do sexo, etnia e fatores de risco associados, incluindo obesidade, sobrecarga de ferro, infecção concomitante com hepatite viral e fatores genéticos²⁵. O consumo de álcool está diretamente associado à mortalidade por doença hepática e representa custos sociais e econômicos elevados²⁶.

O álcool é metabolizado e eliminado especialmente no fígado a partir de alterações metabólicas de reações oxidativas. A primeira reação é catalisada pela enzima álcool desidrogenase (ADH). Quando esta se encontrar bloqueada, duas outras vias, “vias de recurso”, são acionadas: a via do Sistema Mitocondrial de oxidação do etanol (MEOS) e a da catalase^{27,28} (**Figura 2**). As três vias produzem metabólitos específicos resultando na produção de acetaldeído, causando peroxidação lipídica e alteração de proteínas e da excitose por ligação à tubulina, promovendo alterações e danos estruturais na mitocôndria^{28,29}.

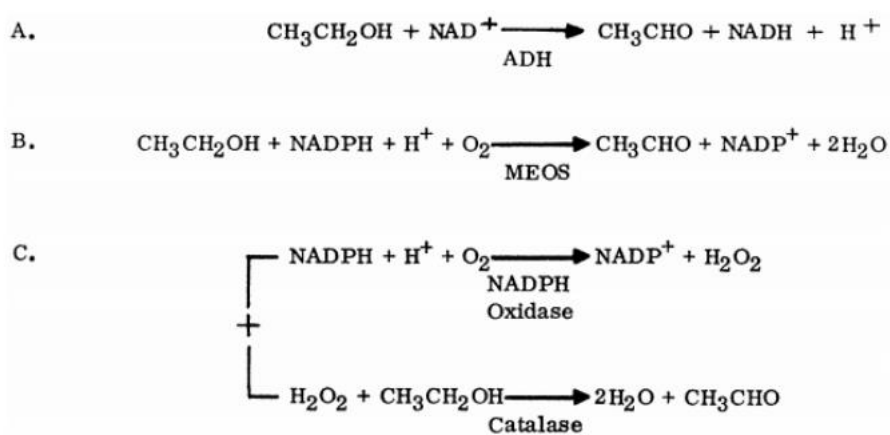


Figura 2. A) Oxidação pela via álcool desidrogenase, a primeira etapa ocorre no citosol e a segunda na mitocôndria, envolvendo a aldeído desidrogenase; B) A via das enzimas microsossomais oxidativas que envolve a atividade do citocromo P450 2E1; C) Via da catalase. Fonte: Lieber (2004)²⁸.

A probabilidade da hepatite alcoólica progredir para dano permanente aumenta entre aqueles que apresentam ingestão de álcool continuada. Aproximadamente 27%

dos pacientes que se abstém, há normalização histológica, enquanto 18% evoluem para cirrose e os demais pacientes apresentam hepatite alcoólica persistente²⁵.

As interações entre o intestino, sistema imunológico, o fígado são componentes críticos da DHA³. A primeira etapa a ser reconhecida no processo de lesão alcoólica no fígado é a esteatose ³⁰, a qual é caracterizada pelo acúmulo de gordura, principalmente triglicerídeos, fosfolipídios e ésteres de colesterol, no interior dos hepatócitos. Após o desenvolvimento da esteatose, um fator importante a ser destacado na progressão da doença é a translocação bacteriana intestinal. Tal ação promove a elevação dos níveis de endotoxinas no fígado e no sangue, acionando a produção de citocinas e de espécies reativas de oxigênio, iniciando a cascata inflamatória³¹.

O álcool e seus metabólitos podem provocar o crescimento de bactérias no intestino delgado e promover disbiose da microbiota intestinal, levando ao aumento da permeabilidade e translocação de endotoxinas do intestino para o fígado. Através da ativação das Células de Kupffer (CKs) e a ação dos macrófagos no fígado por meio do Toll-like receptor 4 (TLR4), ocorre a eliminação de endotoxinas provindas da microbiota intestinal, e a indução do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL)-6, IL-8 e IL-17. Assim, promove o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e hepatotoxicidade induzida pelo álcool ³².

As citocinas desempenham papel importante na primeira resposta do organismo à infecção, por atraírem e ativarem componentes do sistema imunológico. Com a ingestão de álcool, ocorre a produção acentuada de citocinas no fígado, levando à hepatotoxicidade³³, entre elas, o TNF- α representa fator chave que influencia

vigorosamente o processo de disfunção hepática³³. As interleucinas podem ser ativadas de diferentes mecanismos, entre eles a ativação dos inflamassomas.

2.3 Inflamassomas e DHA

A inflamação é uma característica comum da maioria das doenças crônicas do fígado e ocorre como uma resposta à lesão provocada por bactérias patogênicas. Moléculas derivadas de patógenos microbianos ou virais, comumente conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), ou estímulos estéreis liberados de células hepáticas danificadas, conhecidas como padrões moleculares associados a danos (DAMPs) podem desencadear a ativação da inflamação³⁴. As citocinas pró-inflamatórias apresentam papéis importantes na homeostase tecidual. Sua expressão é controlada pelo inflamassoma, um complexo multicomponente que promove o amadurecimento, principalmente, da IL-1 β e IL-18²¹.

O inflamassoma é um complexo proteico constituído por receptores intracitoplasmáticos do tipo NOD (NLRs) e proteína speck-like associada a apoptose com domínio de recrutamento de caspase (ASC). Este complexo promove a ativação de caspases inflamatórias³⁷. Após a detecção dos PAMPs, o NLR forma um complexo com a molécula efetora, procaspase-1, com ou sem a contribuição de uma molécula adaptadora associada a apoptose contendo o domínio Card²². A montagem do complexo inflamassoma leva à clivagem da procaspase-1 em sua forma ativa de caspase-1 (**Figura 3**). Uma vez ativada, a caspase-1 promove a maturação proteolítica e a ativação de IL-1 β , IL-18. Considera-se que a ativação de grande parte dos inflamassomas ocorra em duas etapas. O primeiro passo é impulsionado pela

sinalização gerada por receptores toll-like ou IL-1R, e promove a expressão de componentes do inflamassoma como NLRs, ASC, pró-caspase-1, pro-IL-1 e pro-IL-18. O segundo sinal é proporcionado por sinalização mediada por DAMP e PAMP, resultando na formação do inflamassoma NLR que implica a ativação e clivagem da pro-caspase-1 de pro-IL-1 β e pro-IL18. A IL-1 β ativa, pode ainda estimular o receptor da IL-1 β , levando à amplificação da sinalização do inflamassoma^{38,39}.

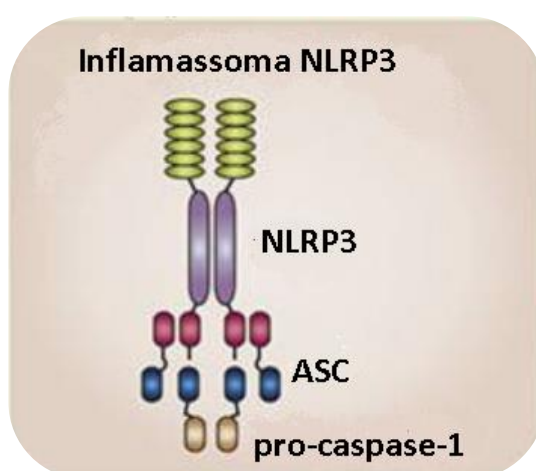


Figura 3. O inflamassoma é constituído por receptores do tipo NOD (NLRs) e proteína speck-like associada a apoptose com domínio de recrutamento de caspase (ASC). A montagem do complexo inflamassoma leva à clivagem da procaspase-1 em sua forma ativa de caspase-1. Fonte adaptado: Jo ET, et al. 2016⁴⁰

O sistema inflamassoma tem sido implicado em diferentes condições de lesão hepática, tais como esteato-hepatite alcoólica e não alcoólica. Cui e colaboradores (2012) mostraram expressão gênica aumentada dos componentes do inflamassoma NLRP3, ASC, Caspase-1 e IL-1 β em camundongos tratados com etanol⁵. Pacientes com DHA e com esteato-hepatite não alcoólica (NASH) apresentam relação entre aumento da expressão dos componentes do inflamassoma NLRP3 e níveis séricos de IL-1 β com o desenvolvimento do dano hepático⁴¹. Os inflamassomas detectam sinais

associados à infecção e estresse e ainda promovem respostas inflamatórias imediatas

39.

2.4 Barreira e Permeabilidade intestinal

O epitélio intestinal promove absorção de nutrientes e fluidos, além de bloquear a entrada de patógenos e toxinas na circulação sistêmica que podem promover danos ao organismo. O epitélio intestinal refere-se a uma função regulatória, possui absorção seletiva sobre íons, moléculas e outros componentes, bloqueando ou permitindo sua passagem como forma de preservação da estrutura e função de barreira^{42,43}.

A barreira intestinal é composta principalmente da camada de muco, da camada epitelial e da lâmina própria subjacente. Compreende uma estrutura que divide o meio interno do lúmen intestinal, impede a perda de água e eletrólito, além da entrada de bactérias patógenas no organismo⁴⁴. Proteínas TJ conectam as células epiteliais intestinais e regulam a permeabilidade paracelular. Além disso, componentes como as células do sistema imunológico, a microbiota intestinal e os peptídeos antimicrobianos têm papéis cruciais no suporte da função adequada de barreira intestinal⁴⁵.

O termo permeabilidade intestinal se refere a função de barreira, capaz de permitir ou não a passagem de moléculas ⁴³. Diferentes fatores podem alterar a permeabilidade intestinal, tais como, microbiota intestinal, alterações na camada de muco e danos epiteliais, procedendo na translocação do conteúdo luminal em direção às camadas internas da parede intestinal. Demais fatores importantes como fatores dietéticos e ingestão de álcool podem aumentar a permeabilidade⁴⁶.

A função de estabilizar e manter a estrutura da barreira depende de dois elementos centrais. Capacidade de renovação das células obtida a partir do controle entre a proliferação celular e a apoptose, e a presença de junções intercelulares efetivas que interatuam com outros componentes encontrados no epitélio intestinal, assim criando uma barreira semipermeável ⁴⁷.

2.4.1 Estrutura da barreira intestinal

Uma camada única de células epiteliais compõe a barreira física entre o lúmen e os tecidos da mucosa. O espaço entre as células é composto pelas TJ que promovem a regulação do fluxo paracelular a partir da constituição de Claudinas e diferentes proteínas no complexo juncional ⁴⁸. Junto às TJ, se encontram as junções de aderência (JA), essenciais na sinalização célula-célula e na restituição epitelial, e desmossomos que sustentam a estabilidade epitelial. As TJ são espaços nos quais as membranas de duas células adjacentes se aproximam para formar uma barreira. As células são conectadas por filamentos de proteínas transmembrana, como a JAM, Claudinas e Ocludinas (**Figura 4**). As TJ aproximam as células, impedem a passagem de moléculas e auxiliam a manter a polaridade das células⁴³. São essenciais para que as células epiteliais e endoteliais estabeleçam compartimentos teciduais distintos dentro do corpo e mantenham a homeostase ⁴⁹.

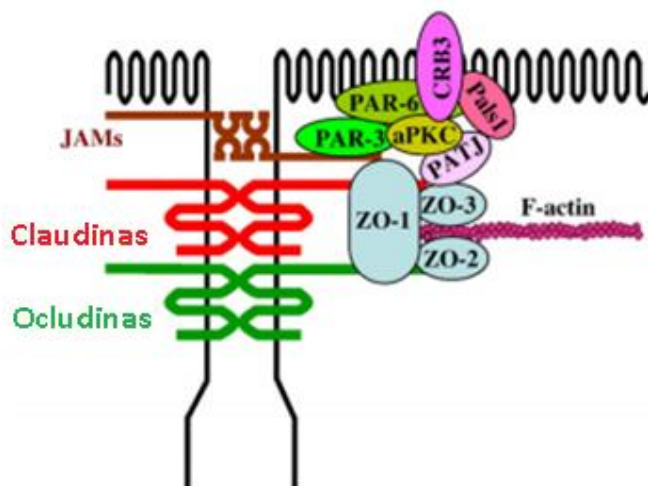


Figura 4. Composição das proteínas transmembrana das TJ (*tight junctions*): ocludina, claudinas e JAMs (*junctional adhesion molecule*) e zona de oclusão. Fonte: Chiba H, et al, 2008 ⁴⁹.

As Claudinas são uma família de mais de 20 proteínas, necessárias para a formação das TJ, consistindo em moléculas de vedação e poros que facilitam a perda de água e eletrólitos. As Claudinas são descritas como importantes proteínas responsáveis pela função de barreira intestinal, desempenhando função decisiva na permeabilidade das células endoteliais e epiteliais⁴⁸.

As TJ reagem a condições patológicas, como infecção por vírus da hepatite C e rearranjo estrutural do parênquima hepático na cirrose. A composição das cadeias de Claudina e possíveis interações entre elas pode influenciar profundamente a morfologia das TJ. Assim, a diferente expressão tecidual das Claudinas sob condições patológicas pode ser responsável por refletir alteração da função das TJ⁵⁰.

Atualmente, há em torno de 63 genes que codificam as Claudinas nas TJ em 16 espécies de teleósteos, entretanto genes selecionados mostram padrões de expressão limitados. As Claudinas exercem funções vitais no crescimento embrionário de peixes teleósteos e na fisiologia dos tecidos e órgãos⁵¹.

2.4.2 Molécula de adesão Juncional (JAM)

As TJ desempenham um papel vital na regulação do fluxo paracelular de íons, de pequenas moléculas e de células inflamatórias, bem como definem domínios de membrana distintos e facilitam a sinalização bidirecional entre os compartimentos intracelular e extracelular. As JAMs são uma família de proteínas das imunoglobulinas que se localizam nas TJ ao longo da membrana lateral das células epiteliais ⁵².

Têm sido atribuídas às proteínas JAMs, funções que envolvem a adesão célula-célula, incluindo a função de barreira, a migração de leucócitos, a ativação plaquetária e a angiogênese. Os mecanismos pelos quais as proteínas JAMs contribuem para esses processos são amplamente desconhecidos, mas as evidências sugerem que as interações homofílicas e heterofílicas são importantes para sua função⁵³.

As JAMs são descritas em três classes no genoma humano, codificados a um receptor de superfície celular tipo I associados a dois domínios de imunoglobulina, um único domínio transmembrana e uma região citoplasmática curta, formando uma ligação ao domínio PDZ c-terminal. São classificadas como JAM A (f11r), JAM B (JAM2) e JAM C (JAM3), sendo que em pacientes com doença hepática é possível avaliar uma estreita relação com níveis de proteína e transcrição de JAM-A, estas apresentam níveis significativamente menores na mucosa intestinal⁵⁴.

2.4.3. Permeabilidade intestinal e álcool

O trato gastrointestinal (TGI) pode ser uma importante fonte de inflamação em lesões de órgãos mediadas pelo álcool. Ele é considerado a maior e mais complexa comunidade microbiana do corpo, incluindo gatilhos pró-inflamatórios, como endotoxinas, como o Lipopolissacarídeo (LPS)⁵⁵. O consumo agudo e crônico de álcool promove a modificação da barreira epitelial intestinal, resultando em aumento da sua permeabilidade e desencadeando alterações pró-inflamatórias sistêmicas por meio de dois mecanismos: 1) alteração da composição e/ou função da microbiota intestinal, ou seja, aparecimento de disbiose, que pode resultar no aumento da produção de LPS; 2) alteração da integridade da barreira intestinal permitindo a passagem do LPS luminal para a circulação sistêmica (**Figura 5**). Estudos indicam que a translocação bacteriana induzida pelo álcool é devida à liberação de citocinas pró-inflamatórias a partir da ativação imune pelo LPS, um componente crítico da membrana externa de bactérias Gram-negativas⁵⁶. De fato, há uma associação direta entre a administração de etanol e aumento dos níveis plasmáticos de LPS em estudos com animais⁵⁵.

O álcool provoca o aumento da permeabilidade e leva a uma perda anormal de endotoxinas bacterianas, estimulando assim a lesão hepática⁵⁷. O consumo crônico de álcool também pode acelerar a progressão da DHA via estresse oxidativo, aumentar a permeabilidade intestinal e provocar risco elevado de endotoxemia^{58,59}. Portanto, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no aumento da permeabilidade intestinal induzida pelo álcool pode levar ao desenvolvimento de estratégias mais eficazes de prevenção e tratamento da DHA.

Wang e colaboradores utilizaram um modelo *in vitro* de monocamada de células epiteliais Caco-2 tratadas com álcool para observar os efeitos do mesmo na permeabilidade da barreira epitelial intestinal e a expressão de proteínas associadas

à TJ. Os resultados deste estudo indicam que o álcool é capaz de aumentar a permeabilidade da barreira epitelial intestinal, na qual induz uma mudança na expressão das proteínas associadas TJ, ocludina e claudina-1, que são dois importantes locais de ação do álcool, aumentando assim a permeabilidade da barreira epitelial intestinal⁶⁰.

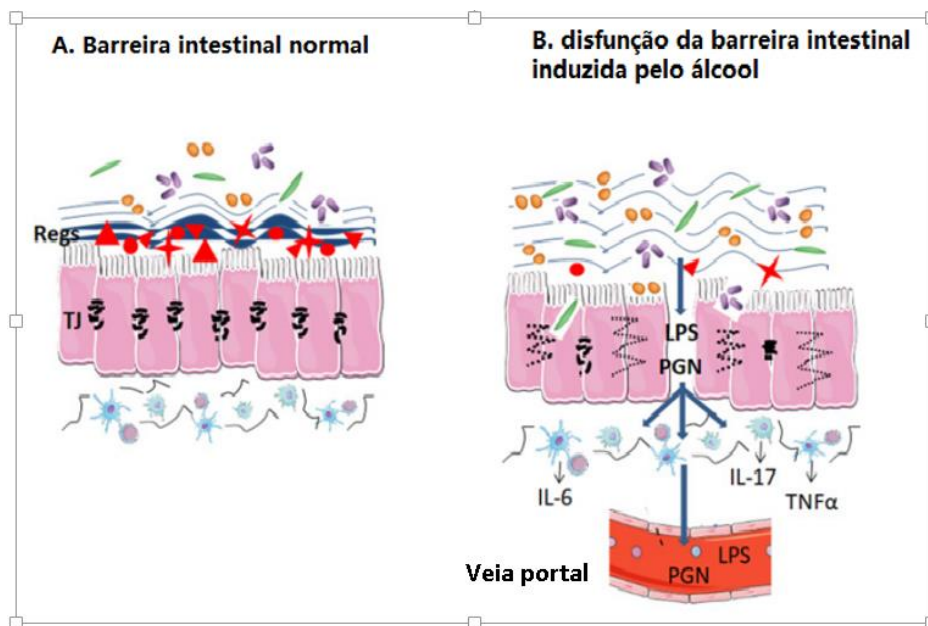


Figura 5. Função de barreira intestinal normal e associada ao álcool. (A) Barreira intestinal normal representado por TJ intactas que impedem a invasão e translocação epitelial bacteriana bem como a estimulação de células imunes. (B) Barreira intestinal representada pela ruptura das TJ levando ao aumento da permeabilidade epitelial. TJ, *tight junctions*.

2.4.4 Avaliação da permeabilidade intestinal

As técnicas utilizadas para avaliação de permeabilidade e integridade da função de barreira do epitélio intestinal variam dependendo da configuração (medições *in vitro* versus *in vivo*), das espécies (modelos humanos ou animais), das moléculas marcadoras utilizadas para avaliação (íons, carboidratos de diferentes tamanhos, macromoléculas e antígenos, produtos bacterianos e bactérias), e dos

compartimentos utilizados para a medição das moléculas marcadoras (sangue periférico, sangue da veia porta, urina)⁴³.

Para avaliar disfunções de barreira diretamente em tecido intestinal *ex-vivo*, obtido a partir de biópsias, a **Câmara de Ussing** (*Ussing chambre*), é indicada tanto para estudos em humanos quanto animais. Permite a mensuração de correntes com curtos-circuitos como indicador da atividade de transporte de íons através do epitélio⁴³.

A avaliação *in vivo* da função de barreira intestinal e de permeabilidade é possível através da avaliação de biomarcadores de integridade epitelial, como moléculas de adesão solúveis, biomarcadores de imunidade ou inflamação, ou marcadores bacterianos como endotoxina circulante⁴³.

O **teste de lactulose e manitol** é considerado padrão ouro para mensuração da permeabilidade intestinal em humanos. Consiste na administração de oligossacarídeos com pesos moleculares elevados, como a lactulose, e açúcares de tamanho pequeno, como o manitol. A molécula de tamanho grande atravessa a via paracelular intestinal somente se a função de barreira estiver comprometida. Atualmente têm sido utilizado “teste multi açúcar”, baseado na administração simultânea de sacarose, lactulose, sucralose, eritritol e rhamnose para avaliar a permeabilidade de diferentes segmentos do trato gastrointestinal⁶¹.

Ensaio para de medição de LPS são utilizados para demonstrar endotoxemia, indicando translocação bacteriana do lúmen intestinal para a circulação em função de falhas na função de barreira do epitélio celular. Possui como limitação o fato de que os LPSs são detectáveis apenas em baixos níveis no sangue periférico. Já em modelos experimentais, é facilmente medido através da veia porta dos animais⁴³. Em humanos, tem sido utilizado com sucesso para demonstrar

endotoxemia em pacientes com sepse (Bates DW 1998) e níveis aumentados de LPS em pacientes com obesidade e síndrome metabólica^{62,63}. Anticorpos de núcleo de endotoxina circulante – **EndoCAb**, são utilizados para o dano da barreira intestinal de fase aguda, como medida alternativa aos ensaios de endotoxemia⁴³.

Como **biomarcadores de integridade celular epitelial** são utilizadas diversas partículas para avaliar a função de barreira intestinal em humanos, como a citrulina, proteínas ligadoras de ácidos graxos, TJ, entre outras. Entretanto, as TJ são os principais marcadores utilizados para avaliar alterações na função de barreira do epitélio intestinal, e entre as TJ, as claudinas são proteínas determinantes para a integridade da barreira⁶⁴.

Segue abaixo tabela resumo com as características dos principais testes de permeabilidade intestinal:

Tabela 1. Métodos para a avaliação da permeabilidade intestinal (testes funcionais, testes relacionados com bactérias, biomarcadores, histologia)

Amostras	H	A	Moléculas de teste	Local de teste	Material necessário	Desvantagens
Ex-vitro						
<i>Ussing chamber</i>	x	x	H ₂ O, ions, açúcar, etc.	Local específico	Biópsia	Invasivo
In vivo - ensaios de permeabilidade						
Lactulose/ Manitol	x	x	Oligossacarídeos de diferentes MW	Intestino delgado	Urina	Demanda de tempo
Sacarose	x	x	Sacarose	Colón	Urina	Demanda de tempo
Sacarose	x	x	Sacarose	Estômago	Urina	Demanda de tempo
PEG4000/400	x	x	Polietilenoglicóis	Intestino inteiro	Urina	Demanda de tempo
In vivo - relacionado a bactérias						
Ensaio LAL	x	x	Endotoxina (LPS)	Intestino inteiro	Plasma	Limitação de ensaio
EndoCAb	X	X	Anticorpos anti-LPS	Intestino inteiro	Sérum	Apenas na fase aguda

D-lactato	X	X	Lactato bacteriano	Intestino inteiro	Plasma	Baixa especificidade
Produção de butirato	X	X	BPB (PCR)	Colón	Fezes	Laboratórios especializados, dados limitados
Esteatose hepática	X	X	Teor de gordura no fígado	Intestino inteiro	TRM/US	Alto custo
In vivo - biomarcadores de dano celular epitelial						
Citrulina	X	X	Produto endógeno	Intestino delgado	Plasma	-
Claudina-3	X	X	Proteína <i>tight junction</i>	n.a.	Urina	Dados limitados
In vivo - abordagens histológicas						
Expressão <i>Tight junction</i>	X	X	RNA (qPCR), <i>Western blot</i>	Local específico	Biópsia	Invasivo
Análise do muco			Histologia / coloração	Local específico	Biópsia	Invasivo

Abreviações: H: adequado para o sistema humano; A: adequado para modelos animais; BPB: Bactérias produtoras de butirato; EndoCAb: anticorpos do núcleo da endotoxina circulante; n.a.: não aplicável; PEG: Polietilenoglicóis; qPCR: PCR quantitativo; TRM: Tomografia por ressonância magnética; US: Ultrassom.

Fonte: Bischoff et al, 2014⁴³

2.5 Zebrafish como modelo experimental

Nos últimos 20 anos, o *Zebrafish* (*Danio rerio*) é utilizado como modelo animal de experimentação para o estudo de diversas doenças^{31,65,66}. Também conhecido como paulistinha, ele pertence à família Cyprinidae e é considerado um peixe teleosteo pequeno com média de 3 a 4 cm, de água doce, que apresenta diversas facilidades quanto ao seu manejo, reprodução e manutenção^{67,68}.

O crescente aumento de estudos utilizando o *zebrafish* está ligado ao fato de seu genoma já ser inteiramente sequenciado. O sequenciamento do genoma, a partir do Instituto Senger em 2001, possibilitou a utilização do *zebrafish* em diferentes estudos genéticos⁶⁹. Estudos associados com genes humanos podem ser cada vez

mais vistos utilizando este modelo, isto por seu genoma apresentar alto grau de similaridade com os genomas humanos ^{70,71}.

Devido ao fato de ser considerado importante modelo na pesquisa, foi desenvolvido um site especializado em estudos utilizando o *zebrafish*, conhecido como ZFIN, o qual é composto por um banco alimentado de informações necessárias para o seu uso. Além disso, é possível encontrar diversos estudos utilizando este modelo em patologias humanas⁷².

Dentro da Hepatologia e da Gastroenterologia, os processos da embriogênese pode permitir a determinação de diversos defeitos nas funções dos sistemas gastrintestinal e hepatobiliar⁷³. O fígado dos peixes e dos mamíferos possuem as mesmas funções metabólicas, como no processamento e armazenamento de nutrientes, síntese de enzimas e cofatores, formação de bile e metabolismo de composto xenobióticos⁷⁴ (**Figura 6**).



Figura 6. Danio rerio, o *zebrafish*.

Fonte: Baatrup E & Henriksen PG (2015)⁷⁵.

Nosso grupo de pesquisa padronizou a utilização do *zebrafish* como modelo experimental de estudo no Centro de Pesquisa Experimental (CPE) – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)⁷³, além de padronizar a melhor forma da coleta de

sangue no *modelo*⁷⁶. A partir de então foram desenvolvidos diferentes modelos experimentais de doença hepática, com administração de Tioacetamida⁷⁷ e etanol⁷⁸.

2.6 Probióticos

Probióticos são micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios para a saúde do hospedeiro^{79,80}. Os probióticos se destacam por sua ação na regulação da microbiota intestinal, imunomodulação e proteção da barreira intestinal^{43,81}. A manutenção da homeostase ou equilíbrio da microbiota intestinal é vital para o desempenho de funções fisiológicas e, por esta razão, tem se dado atenção especial ao potencial de probióticos como prováveis agentes preventivos e terapêuticos⁴³. Terapias adjuvantes com o uso de probióticos tem sido aplicados tanto para prevenir o desenvolvimento de doenças hepáticas e/ou minimizar a sua progressão^{82,83}.

Os probióticos demonstraram ser eficazes em uma variedade de condições, incluindo diarreia dos viajantes, diarreia associada a antibióticos, infecções do trato respiratório superior e condições inflamatórias. Seus potenciais mecanismos de ação incluem a modulação do sistema imune intestinal e a exclusão de patógenos¹⁰.

O álcool induz o supercrescimento bacteriano (especialmente o das bactérias gram-negativas) promovendo disbiose e consequente aumento da permeabilidade intestinal e a translocação do LPS do intestino para o fígado, (**Figura 7**)⁸⁴.

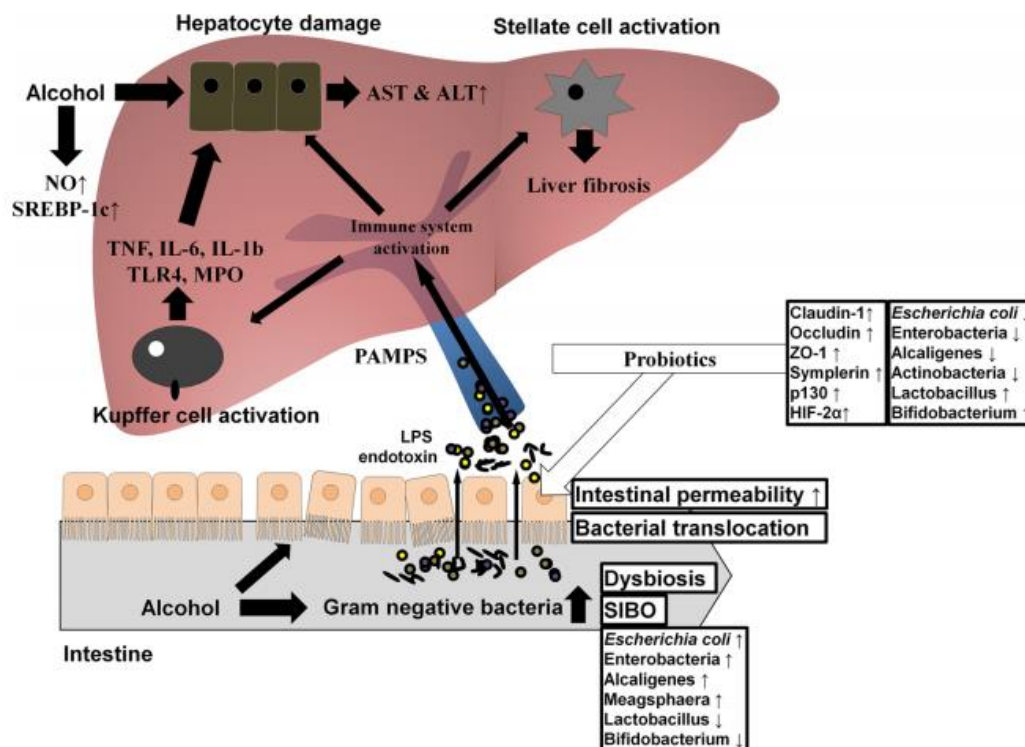


Figura 7. O consumo de álcool leva a proeminentes alterações na composição de microbiomas que induzem crescimento excessivo de bactérias intestinais e promovem a disbiose. Os probióticos possuem a capacidade de modificar as composições da comunidade da microbiota intestinal, o que leva à redução da disbiose induzida pelo álcool, permeabilidade intestinal, translocação bacteriana, endotoxemia e por fim, o desenvolvimento de DHA. Fonte: Sung e colaboradores (2016)⁸⁵.

O intestino está diretamente ligado ao fígado por meio do trato portal, e a presença de disbiose pode resultar no aparecimento de doenças hepáticas, incluindo a DHA. A modulação da microbiota intestinal para tratamento da disbiose com base na administração de probióticos pode ser eficaz na terapia da DHA⁸⁴.

Em estudo clínico prospectivo, randomizado, foram avaliados os efeitos do álcool e o uso de probióticos sobre a microbiota intestinal em pacientes com lesão hepática alcoólica. Inicialmente, os pacientes com a doença hepática apresentaram disbiose intestinal em comparação com controles saudáveis. A suplementação com probióticos foi associada com a restauração da microbiota e maior redução na lesão

hepática em relação ao grupo controle⁸⁶. O consumo de etanol contínuo tem sido associado à redução de várias *Firmicutes* (*Lactococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*) e um aumento de *Verrucomicrobia* e *Bacteroides* como *Bacteroidales* e *Porphyromonadaceae*⁸⁷. Outro estudo usando uma dieta de etanol em modelo de camundongo demonstrou mudanças de filo induzidas pelo álcool, envolvendo uma redução significativa em *Firmicutes*, mas notável expansão de *Proteobacteria* e *Actinobacteria*⁸⁸.

Várias cepas de lactobacilos probióticos promovem diferentes efeitos ao hospedeiro, possivelmente por ações anti-inflamatórias e pela estabilização da barreira intestinal. Os lactobacilos desempenham papel importante na homeostase intestinal, mostrando níveis reduzidos no processo inflamatório, entretanto quando suplementados de forma oral, apresenta resultados importantes na melhora da inflamação⁸⁹.

O LGG, caracterizado como uma bactéria Gram-positiva, pertencente ao filo *Firmicutes*, tem como características o crescimento preferencial anaeróbico, a produção de substâncias antibacterianas e a fermentação de xilose, trealose, sorbitol, manitol, glicose, frutose, ramnose, entre outros.

O uso em especial do probiótico LGG vem sendo relacionado com a melhora da barreira intestinal em animais expostos ao álcool, promovendo o aumento dos fatores de muco intestinal, e ainda, da expressão das proteínas TJ, levando a redução dos níveis de endotoxina circulatória^{3,11,12}. O LGG vem sendo utilizado nos estudos com DHA ou DHGNA (Tabela 2).

Tabela 2. - Estudos experimentais com uso do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG na Doença Hepática Alcoólica e na Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica.

Modelo	Modelo animal	Dose diária	Tempo	Desfecho
DHGNA	Camundongos C57BL / J6	5 x 10 ⁷ UFC	8 semanas	↑ bactérias benéficas Restabelecimento das TJ ²⁴
DHA	Camundongos C57BL/6	1 x 10 ⁹ UFC	2 semanas	↓ inflamação e lesão hepática ↓ expressão de TNFα ¹²
DHGNA	Ratos C57BL/6J	1 x 10 ⁸ UFC	13 semanas	Melhora da dislipidemia e da DHGNA. ⁹⁰
DHA	Zebrafish	1 x 10 ¹⁰ UFC	28 dias	↓ níveis lipídicos séricos e hepáticos ⁷⁸
DHA	Ratos C57/B6	2,5 x 10 ⁷ UFC	10 semanas	↓ estresse oxidativo hepático Preservação da barreira intestinal ¹³
DHA	Camundongos C57BL/6	1 x 10 ⁹ UFC	4 semanas	Melhora da barreira intestinal ↓ endotoxemia ¹¹

DHA: Doença hepática alcoólica; DHGNA: Doença hepática gordurosa não alcoólica; UFC: unidades formadoras de colônia.

Em modelo experimental de DHA em ratos, o tratamento com LGG tem sido associado a uma redução da hiperpermeabilidade intestinal induzida por álcool, além do estresse oxidativo e gravidade da esteatose alcoólica¹³. Estudo de Wang e colaboradores (2013) investigou os efeitos do LGG na inflamação através dos níveis de TNF-α em resposta a ingestão crônica de álcool. Camundongos foram alimentados com dieta líquida de Lieber DeCarli contendo 5% de álcool por 8 semanas, causando um aumento significativo na inflamação hepática, demonstrado pela avaliação histológica. Após duas semanas de suplementação com LGG, houve redução da

lesão e dos níveis de inflamação hepática, além da redução da expressão de TNF α ¹². Também foi identificada ação benéfica na administração do LGG em modelo de esteatose hepática induzida por álcool em *zebrafish*, onde a suplementação com o probiótico demonstrou redução dos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol e esteatose hepática nos animais tratados com o probiótico⁷⁸.

A realização de estudos experimentais e ensaios clínicos são necessários para melhor compreensão dos mecanismos de ação do probiótico sobre a patogênese da DHA.

3. JUSTIFICATIVA

A doença hepática atribuída ao álcool é a maior causa de morbimortalidade entre as doenças hepáticas no mundo, afetando uma grande parcela da população, com impacto social, econômico e no setor de saúde. Apesar da alta prevalência, a literatura e as pesquisas nessa área são limitadas e não há, até o presente momento, uma terapia eficaz para o tratamento desses pacientes.

Em modelos experimentais, a suplementação com probióticos, especialmente com LGG, tem se demonstrado efetiva como agente hepatoprotetor na DHA, entretanto os mecanismos de ação envolvidos ainda não foram elucidados por completo. Nesse sentido, com este trabalho optamos por avaliar se a suplementação com o probiótico LGG poderia conferir benefícios na modulação dos inflamassomas e na permeabilidade intestinal, fatores envolvidos na progressão da DHA.

4. QUESTÃO DA PESQUISA

O probiótico LGG apresenta efeito benéfico sobre marcadores dos inflamassomas e de permeabilidade intestinal em um modelo experimental de doença hepática alcóolica em *zebrafish*?

5. HIPÓTESE

A suplementação com o probiótico LGG promove melhora na resposta inflamatória demonstrada por meio dos níveis de marcadores dos inflamassomas, assim como na regulação dos marcadores de permeabilidade intestinal em um modelo experimental de doença hepática alcóolica em *zebrafish*.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito do probiótico LGG em marcadores do inflamassoma NLRP3 e de permeabilidade intestinal em um modelo experimental de doença hepática alcóolica em *zebrafish*.

6.2 Objetivos específicos

1. Avaliar uma dose eficaz do probiótico LGG para promover a colonização intestinal no modelo *zebrafish*.
2. Avaliar o efeito do probiótico LGG na progressão da doença hepática alcoólica;
3. Avaliar o efeito do probiótico LGG na via dos inflamassomas com base na expressão gênica *pycard*, *caspase*, *tnf- α* , *il-10* e *il-1 β* .
5. Avaliar o efeito do probiótico LGG na permeabilidade intestinal com base na expressão gênica dos marcadores *tight junctions cldn15a*, *cldn15b* e *JAM- f11r*.

7. ARTIGO

Título: *Lactobacillus rhamnosus* GG, modulation of gut permeability and inflammasomes in experimental model of alcoholic liver disease.

Periódico: Liver International

ISSN: 1478-3231

Página na internet: <https://onlinelibrary.wiley.com/journal/14783231>

Status: Submetido

Title page

***Lactobacillus rhamnosus* GG, modulation of gut permeability and inflammasomes in experimental model of alcoholic liver disease.**

Juliana Paula Bruch-Bertani^{1,2}, Amanda Pasqualotto^{1,2}, Larisse Longo^{1,2}, Raquel Ayres¹, Carolina Bortolin Beskow^{1,2}, Afonso Luis Barth³, Daiana Lima-Morales³, Fábio Meurer⁵, Themis Reverbel da Silveira^{1,2}, Mário Reis Álvares-da-Silva^{1,2,6}, Carolina Uribe-Cruz^{1,2}, Valesca Dall'Alba^{1,2,7}

1. Experimental Laboratory of Hepatology and Gastroenterology, *Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)*, Porto Alegre, Brazil

2. Post Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, *Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)*, Porto Alegre, Brazil

3. Research Laboratory on Bacterial Resistance (LABRESIS), *Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)*, Porto Alegre, Brazil.

5. Post Graduate Program in Sustainable Development of Aquaculture, *Universidade Federal do Paraná, Campus de Palotina, Paraná*, Brazil

6. Department of Internal Medicine, Gastroenterology and Hepatology Unit. School of Medicine, *UFRGS*. Gastroenterology and Hepatology Division, *HCPA*, Porto Alegre, Brazil

7. Department of Nutrition. School of Medicine, *UFRGS*. Nutrition Division. *Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS*. Porto Alegre, Brazil.

Declared conflict of interest of all authors: none

Financial Support: This study was supported by a grant from CAPES and FIFE/HCPA. The funding sources were not involved in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the paper for publication.

Address for correspondence:

Valesca Dall'Alba

Rua Ramiro Barcelos, 2400, Santana - CEP: 90035-003 - Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: valba@hcpa.edu.br

Word count: 3253 words

Number of figures: 1

Number of tables: 4

List of abbreviations:

ALD - Alcoholic liver disease

LGG - *Lactobacillus rhamnosus* GG

E - Ethanol group

EP - Ethanol + probiotic group

C - Control group

Il – Interleukin

TJ - tight junctions

JAM - junctional adhesion molecules

LPS - Lipopolysaccharide

NLR - Intracytoplasmic NOD-type receptors

ASC - Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain

DAMP - Padrões moleculares associados a danos

PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos exógenos

ABSTRACT:

Background & Aims: Alcoholic liver disease (ALD) is among the leading causes of death from liver disease in the world. Among the factors involved in its pathogenesis, inflammation and increased gut permeability are related to hepatic fibrosis. Here assess the effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) on hepatic lipid accumulation, activation of inflammasomes and gut permeability markers in experimental model of ALD with zebrafish. **Methods:** An experiment was conducted to assess the effective LGG dose capable of promoting intestinal colonization by microbiological analysis and PCR. Animals were divided into three groups (n=64/group): Ethanol group (E), Ethanol + probiotic group (EP) - supplemented with $1,55 \times 10^6$ UFC LGG/fish/day, and control group (C) - without ethanol and without LGG. Groups E and EP were exposed to 0.5% ethanol concentration for 28 days. At the end of this period, animals were euthanized, and livers were collected for Oil Red staining and assessment of the inflammasome system through *Pycard*, *tnf- α* , *Caspase*, Interleukin-10, and Interleukin-1 β (*il-1 β*) markers. Intestines were collected for evaluation of gut permeability markers *cldn-c*, *cldn15a*, *cldn15b*, and F11 Receptor. **Results:** The dose of $1,55 \times 10^6$ UFC LGG/fish/day promoted intestinal colonization. Group EP presented lower hepatic lipid accumulation, lower *il-1 β* expression and higher *cldn15a* expression when compared to Group E. **Conclusions:** Supplementation with LGG was protective for hepatic steatosis in ALD model. In addition, LGG influenced the modulation of the inflammatory response, promoting reduction of proinflammatory cytokine *il-1 β* and markers of gut permeability, *cldn15a*, improving the gut barrier structure.

Keywords: probiotics; *Lactobacillus rhamnosus* GG; Alcoholic Liver Disease; Inflammasomes;

Word count: 249 words

INTRODUCTION

Alcoholic liver disease (ALD), characterized by excessive alcohol consumption, is among the leading causes of liver disease mortality. The World Health Organization estimates that excessive alcohol consumption is responsible for 5.1% of the global burden of disease and about 5.9% of all deaths worldwide¹. ALD comprises a clinical-histological spectrum, ranging from steatosis to cirrhosis and hepatocellular carcinoma².

Due to the anatomical organization of the portal system, the liver is continually exposed to blood flow from the intestine and with it intestinal products^{3,4}. In this sense, in addition to promoting direct liver damage, it may also contribute to the progression of ALD through the toxic compounds generated by its metabolism, such as acetaldehyde, which promotes dysbiosis and increased intestinal permeability⁵. In addition to chronic alcohol consumption, changes in diet, environmental, and genetic factors may promote changes in the microbiota. Dysbiosis can contribute to the breakdown of gut barrier integrity, inducing bacterial translocation and triggering an inflammatory response in the liver⁶. The integrity of the intestinal epithelium is determined mainly by tight junctions (TJ), a selectively permeable protein complex, among which we can highlight junctional adhesion molecules (JAM) and claudins. Those previously mentioned have a key role in the permeability of endothelial and epithelial cells, both in humans and in animal models⁷.

Patients with ALD present increased gut permeability evidenced by higher levels of plasma endotoxin. In addition, increased levels of lipopolysaccharide (LPS) and translocation of bacterial products were detected in rat models with ALD^{8,9}. This

fact can be explained by the activation of inflammasomes, which is composed of a two-step process. The first step is driven by the signaling generated by toll-like or IL-1R receptors, and promotes the expression of inflammasome components such as NLRs (Intracytoplasmic NOD-type receptors), ASC (Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain), pro-caspase-1, pro-IL-1 and pro-IL-18. The second signal is provided by damage-associated molecular patterns (DAMP) and pathogen-associated molecular patterns (PAMP) mediated signaling, resulting in the formation of the NLR inflammasome that causes the activation and cleavage of pro-caspase-1 from pro-IL-1 β and pro-IL18. Active IL-1 β can further stimulate the IL-1 β receptor, leading to amplification of inflammasome signaling.

Inflammasome is a protein complex consisting of NLRs, ASC, and pro-caspase-1 it controls the production and maturation of proinflammatory cytokines¹⁰. There are four main prototypes of inflammasomes, NLRP3 inflammasome has been the most studied one so far. Activation of NLRP3 inflammasome results in stimulation of caspase, which promotes maturation and secretion proinflammatory cytokines, including IL-1 β ¹¹. Cui et al., showed increased levels of inflammasome components *NLRP3*, *ASC* and *Caspase-1*, and increased expression of IL-1 β in Kupffer cells of mice fed with ethanol¹². The effect of diet on inflammasomes activation in the liver has been the subject of intense investigation¹².

Probiotics use as an adjuvant therapy has been studied in ALD prevention. It is possible to verify positive effects in experimental studies, however they lack evidence in humans^{13,14}. These results are due to the action of probiotics in the modulation of intestinal microbiota, in which its effects have been attributed to mechanisms involving host nutrients metabolism and energy homeostasis¹⁵.

Different strains of probiotic lactobacilli provide different effects on the host, possibly due to anti-inflammatory actions and the stabilization of gut barrier. The use of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) has been related to the reduction in the effects of alcohol exposure effects on gut barrier dysfunction, elevating intestinal mucus factors, as well as the expression of TJ proteins, promoting reduction of circulatory endotoxin levels¹⁵. Among the factors involved in the pathogenesis of ALD, both inflammasomes and increased gut permeability, have been involved in the development of hepatic fibrosis¹⁶. In this sense, supplementation with probiotics, especially *Lactobacillus rhamnosus* GG, could confer benefits through modulation of the intestinal microenvironment.

The objective of this study was to evaluate the effect of probiotic LGG supplementation on the accumulation of hepatic lipids, activation of inflammasomes and in gut permeability markers in an experimental model of ALD with zebrafish.

ANIMALS AND METHODS

This study was performed using an adult 4-5 cm wild-type zebrafish experimental model, obtained from a commercial establishment in Porto Alegre, Brazil. The animals underwent a 14-day adaptation period, and were housed in static system tanks, constantly aerated, at a temperature of $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, and a light cycle of 14 hours. The temperature, pH and ammonia, nitrate, and nitrite levels were monitored periodically¹⁷. Animals were fed ration equivalent to 7% of their body weight (51 calories) distributed four times a day. The ration was formulated by the Laboratory of Nutrition of Aquatic Organisms, Federal University of Paraná- Brazil, from the following ingredients: Fish meal, soybean meal, corn, soy oil, dicalcium phosphate, limestone,

mineral and vitamin mix, salt, BHT (antioxidant)¹⁸. The freeze-dried probiotic LGG was used, which is commercially available (Culturelle; Amerifit, Cromwell, CT) at a concentration of 1×10^{10} CFU.

Two different experiments were conducted, one to define the dose of probiotic to be used and one to evaluate the effect of supplementation with probiotic LGG on the activation of inflammasomes and gut permeability markers of ALD model. The studies were approved by the Research Ethics Committee of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, Brazil (numbers 15-0615, 16-0420 and 17-0143), and conducted in accordance with international guidelines for the care and use of laboratory animals.

Determination of probiotic dose by intestinal colonization analysis

To assess the effective dose of probiotic LGG capable of colonizing the intestine, an experiment was performed with protocols previously standardized in our research group¹⁹. To achieve this, the animals were divided into four groups (n=8/group): 3 groups received different LGG doses: 0.4 mg LGG/fish/day ($5,8 \times 10^5$ CFU), 1 mg LGG/fish/day ($1,55 \times 10^6$ CFU), 2 mg LGG/fish/day ($3,1 \times 10^6$ CFU), and one group received only probiotic-free ration (Group 0 mg). LGG was added to the ration at feeding time. After 14 days, the animals were euthanized by immersion in tricaine (L, Sigma Aldrich, Missouri, USA) at a concentration of $400 \mu\text{g}/\text{kg}$ and euthanized by exsanguination²⁰. The intestines were completely removed aseptically for the analysis.

The intestines (n=5/group) were macerated with $0.5 \mu\text{l}$ of Phosphate Buffered Saline (PBS), of these, $10 \mu\text{l}$ were smeared on a slides and Gram-stained, and $20 \mu\text{l}$ were inoculated onto plates containing Lactobacilli MRS agar (de Man, Rogosa, Sharp,

Difco® Germany), specific medium for lactobacillus, in triplicate per animal. The plates were incubated in microaerophilic environment at 37°C for 48 hours. As a positive control (+ Control), a 1g dilution of the LGG probiotic was used in 9 ml of sterile saline solution and appropriate dilutions of 10⁻¹ to 10⁻¹⁰ were inoculated as previously described¹⁹.

To confirm the identification of the *Lactobacillus rhamnosus* GG strain a PCR was performed with species-specific 16S ribosomal primers. Colonies of each group and also of the positive control, isolated from cultivation on MRS agar medium, were collected with swab and resuspended. Bacterial suspensions, equivalent to 1.0 McFarland scale standard, were prepared in 200 µl of TE (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), homogenized with vortex heated at 100°C for 10 min and frozen at -80°C for 2 hours. From each suspension, DNA extraction with QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen Corporation, Madison, USA) was performed according to the manufacturer's instructions. PCR amplification conditions were as follows: reaction with a final volume of 50 µl containing 5 µl of DNA, 67 mM Tris-HCl, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% (w/w) Tween-20 (pH 8.8 at 25°C), 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTP, 1 pmol of each primer (FW TGCATCTTGATTTAATTTTG; REV CCGTCAATTCCTTTGAGTTT) and 2.5 U of Super-Term enzyme. The amplification protocol consisted of incubation at 94°C for 5 minutes, followed by 30 amplification cycles: 40s of denaturation at 94°C, 30 seconds of annealing (62°C in cycles 1 to 10, at 60°C in cycles 11 to 20, and at 58°C in cycles 21-30), 60s of synthesis at 72°C and a final extension of 10 min at 72°C. PCR products were visualized on 1.5% agarose gel in 0.5% Tris-borate-EDTA buffer¹⁹.

Experimental Model of ALD

The ALD model was previously standardized in our research group^{19,21}. Animals exposed to ethanol were placed in aquariums with 0.5% (v/v) ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) directly added to the water. Every two days the water was changed from the aquariums and the alcohol concentration readjusted to maintain alcohol levels.

Once the dose of $1,55 \times 10^6$ UFC LGG/fish/day was defined, a new experiment was carried out to assess the inflammasomes pathway and gut permeability. Animals were divided into three groups (n=64/group): Ethanol group (E) - animals exposed to 0.5% of ethanol; Ethanol + probiotic group (EP)- animals exposed to 0.5% of ethanol and treated with 1mg/fish/day of probiotic; and Control group (C)- animals without exposure to ethanol or LGG. After 28 days, animals were euthanized as previously described. Livers and intestines were completely removed aseptically and stored for further analysis.

Histological analysis

To assess the presence of hepatic steatosis, livers (n=5) were fixed in Tissue Tek® O.T.C. Compound (Sakura, California, USA) and stored at -20°C, subsequently sectioned in cryostat (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) at a thickness of 3 µm. The slides were stained with Mehlem's modified Oil Red (5mg/mL in propylene glycol),²². The microphotographs were obtained by optical microscope (Olympus, Japan).

Assessment of the gene expression of inflammasomes and gut permeability markers

For both experiments, samples were grouped into 10 pools of 3 intestines or of 3 liver. RNA extraction with the RNeasy Mini Kit (Invitrogen, USA), 2µg of RNA was converted to cDNA with High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Termo Fisher Scientific, USA), according to the manufacturer's instructions, in order to analyze gene expression of hepatic and intestinal tissues. To study the inflammasomes pathway, we evaluated gene expression of *pycard*, *tnf-α*, *caspase*, *il-10*, *il-1β* in hepatic tissue. To study gut permeability, we evaluated gene expression of the following markers: *cldn-c*, *cldn15a*, *cldn15b* and *JAM f11r* in the intestine Gene expression was assessed by RT-qPCR with TaqMan probes (Life Technologies, USA) (**Table 1**). according to the manufacturer's instructions. As standardizer, *efa-1* (Elongation Factor 1 alpha) was used. Values were calculated by the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Table 1. Probes identification tests:

Gene	Test ID
<i>cldn-c</i>	dr03138426
<i>cldn15a</i>	dr03145240
<i>cldn15b</i>	dr03072501
<i>f11r</i>	dr03118078
<i>tnf-α</i>	dr03126848
<i>Caspase</i>	dr03125123
<i>Pycard</i>	dr03125114
<i>il-10</i>	dr03103209
<i>il-1β</i>	dr03114368
<i>efa-1</i>	dr03432748

Statistical Analyzes

Results were described in means \pm SD and medians and interquartile range. Differences between groups were measured using the Kruskal-Wallis test and ANOVA test. The SPSS (Statistical Package for Social Sciences) program, version 18.0 was used to process and analyze the data. The level of significance was 5%.

RESULTS

Confirmation of probiotic LGG colonization

Gram staining tests on Lactobacilli MRS agar medium and determination of strain specificity by PCR, were positive for the doses (1 and 2 mg but negative for the dose of 0.4 mg and the group which did not receive LGG added to the ration (0 mg). Once the two probiotic doses assessed were positive for the colonization test the minimum dose of 1mg/fish/day was chosen for the next experiments (**Table 2**),

Table 2. Results summary obtained from the colonization test of the different groups.

Technique	LGG dose				
	+ Control	0 mg	0.4 mg	1 mg	2 mg
Positive Gram Stain		Negative	Negative	Positive	Positive
Growth on Lactobacilli MRS agar medium	Positive	Negative	Negative	Positive	Positive
PCR	Positive	Negative	Negative	Positive	Positive

PCR: Polymerase chain reaction; LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG

Reduction of hepatic lipid accumulation in ALD model by LGG

Histological analyses of liver sections in the control group, presented hepatocytes with preserved characteristics, with no signs of lipid deposition. After the exposure period to ethanol, increased lipid droplets infiltrated into hepatocytes could be observed causing displacement of the nucleus to the periphery of the cytoplasm. No signs of inflammatory infiltrates were identified by optical microscopy. On the other hand, the EP Group showed a reduction in lipid accumulation (**Figure 1 A-C**).

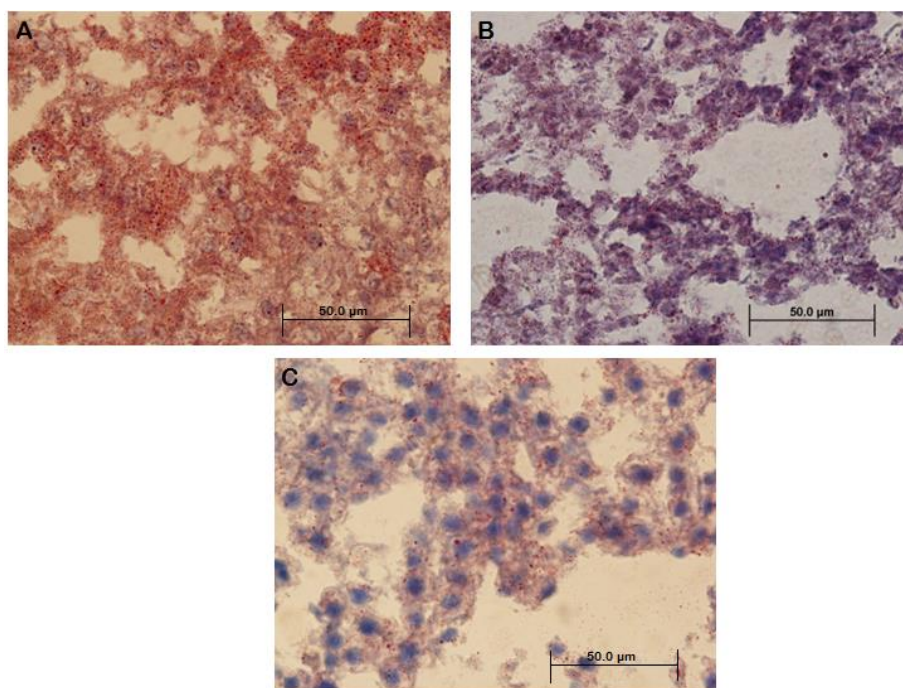


Figure 1: Oil Red staining in hepatic tissue (100x). E Group (A) presented accumulation of lipids, whereas EP Group (B) present lower accumulation of lipids. Group C (C) did not present accumulation of lipids. E Group: group exposed to ethanol; EP Group: group exposed to ethanol receiving probiotic LGG; C Group: control group.

Gene Expression of Inflammasomes

In relation to the assessment of hepatic gene expression of inflammasomes (**Table 3**), the EP group presented lower *il-1 β* expression when compared to E Group

($p < 0.05$). There was also a lower expression of *pycard*, *tnf- α* and *il-10* in relation to E Group, however, these differences were not statistically significant. It was also observed that there was an increase in expression of the *caspase* marker, both in E Group and in EP Group in relation to the control, but also without statistical significance.

Table 3. Assessment of gene expression of inflammasomes markers of the different groups.

Variables	E Group	EP Group	Group C	p
	Md (P25 – P75)	Md (P25 – P75)	Md (P25 – P75)	
<i>pycard</i>	1,37 (0,11-5,47)	1,31 (0,54-2,23)	1,39 (0,37-2,57)	0,999
<i>tnf-α</i>	1,82 (0,43-4,06)	0,86 (0,32-1,82)	0,87 (0,25-1,40)	0,296
<i>caspase</i>	2,25 (1,37-18)	2,70 (1,76-3,15)	0,98 (0,33–2,17)	0,060
<i>il-10</i>	1,38 (0,26-4,84)	1,04 (0,61-1,66)	1,12 (0,66-1,63)	0,752
<i>il-1β</i>	3,61 (2,16-8,63) ^b	0,81 (0,40-0,99) ^a	0,42 (0,27-2,02) ^a	0,020

Kruskal-Wallis test.

^{a, b} Distinctive letters represent different statistical mean ($p < 0.05$) by the Kruskal-Wallis test at 5% significance.

Group E: group exposed to ethanol; Group EP: group exposed to ethanol receiving probiotic LGG; Group C: control group.

Gene Expression of intestinal permeability markers

In the assessment of gut permeability markers, EP group presented *cldn15a* expression significantly higher than E Group and C Group ($p \leq 0,05$). Regarding *cldn-c* and *cldn-15b* expression, only C Group presented significantly higher values when compared to E and EP Groups. In the expression of JAM *f11r*, C Group showed significant higher values when compared to E Group (**Table 4**).

Table 4. Assessment of the gene expression of gut permeability markers of the different groups.

Variables	E Group	EP Group	C Group	p
<i>Cldn-c</i>	0,03 (0,2 – 0,07) ^b	0,30 (0,17 – 0,30) ^b	1,44 (0,34 – 3,00) ^a	0,001 ₂
<i>cldn15a</i>	0,66 ± 0,33 ^{a,b}	1,35 ± 0,80 ^b	1,18 ± 0,69 ^a	0,050 ₁
<i>cldn15b</i>	0,49 ± 0,27 ^b	0,72 ± 0,44 ^b	1,55 ± 1,18 ^a	0,009 ₁
<i>f11r</i>	0,08 (0,05 – 0,45) ^b	0,29 (0,15 – 0,59)	1,39 (0,28 – 3,01) ^a	0,009 ₂

¹Anova test; ²Kruskal-Wallis test

^{a, b} Distinctive letters represent different statistical mean ($p < 0.05$) by the ANOVA and Kruskal-Wallis test.

Group E: group exposed to ethanol; Group EP: group exposed to ethanol receiving probiotic LGG; Group C: control group.

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated in the experimental model of alcohol-induced steatosis, LGG supplementation with probiotic LGG for 28 days had beneficial effects on the pathogenesis of ALD. LGG was able to confer protection to hepatic accumulation of lipid, decreased hepatic expression of *il-1 β* and increased gut permeability markers by TJ *cldn15a* expression.

This study demonstrated there was colonization by LGG probiotic in the animals intestines. The adhesion of probiotic bacteria to the intestinal epithelium is an essential condition for colonization and the effectiveness of the probiotic seems to depend on the administered dose applied, formulation, duration of treatment, among other variables²³. In a previous study conducted by our group, Schneider et al.¹⁹ also evaluated the colonization by LGG probiotic by the PCR technique. However, at that time, the animal diet had not yet been standardized in terms of quantity offered/fish, since the animals were fed to satiety. Although assessing the presence of the probiotic

in the intestine is recommended before beginning an intervention, not all studies apply these tests, such as some studies with rodents, where LGG was also used^{24,25}. Probiotic intestinal colonization is essential for the entire tropism of the small intestine and colorectal tract, for obtaining local and systemic immune defenses, for protection against violation of the epithelial barrier and for improving the balance between immune response and tolerance towards non-pathogenic agents. Thus, confirming the intestinal colonization of LGG prior to its use as treatment becomes an indispensable evaluation to obtain safe results²⁶.

In the last decades, there has been a considerable increase in the number of experimental studies using zebrafish (*Danio rerio*) as a model to elucidate mechanisms of many diseases, including liver diseases²⁷. The liver of fish and mammals have the same metabolic functions regarding processing and storage of nutrients, synthesis of enzymes and cofactors, formation of bile and metabolism of xenobiotic compounds. These advantages reduce the time and cost of investigations *in vivo* and even compared to other animal models^{28,29}.

Our results demonstrated the animals exposed to alcohol developed hepatic steatosis after 28 days, however this did not occur with the animals which had the ration supplemented with probiotic. These results were also reported by Schneider et al¹⁹. Other studies with rats also confirmed the hepatoprotective effects from the probiotic LGG^{15,30,31}. Shi et al., described that probiotic use for four weeks prevented the increase of hepatic fat concentration in C57BL/6 mice exposed to ethanol in relation to the exposed group without LGG¹⁵.

It is known that patients with severe alcoholic hepatitis present an increase in serum levels of IL-1 β , compared to healthy individuals³², this is due in part to the

activation of the expression of the inflammasome components³³. In our study, probiotic supplementation also resulted in improvement of the inflammatory response, by a reduced the expression of *il-1 β* in the treated EP group compared to the E group ($P < 0.05$). There was a significant increase in *caspase* expression in E and EP groups, which may indicate that the probiotic has no effect on this specific inflammatory pathway. Petrasek et al., showed that the activation of inflammasomes and IL-1 β act in the pathogenesis of alcohol-induced inflammation, steatosis, injury, and fibrogenesis of the liver in mice, and that *caspase* reduction prevents alcoholic hepatitis. The decrease in IL-1 β expression had protective effects in different stages of ALD in the study, since its development, progression and recovery from alcoholic liver injury. Based on these results, the authors identified inflammasome and IL-1 β as possible therapeutic targets in ALD³⁴.

There are indications in the literature that LGG has a protective effect on the *tnf- α* and *pycard* expression. In the present study, the expression of *tnf- α* and *pycard* in the animals of E Group seems larger than in the EP Group, however this result was not statistically significant. On the other hand, Wang et al., reported that mice exposed to alcohol and after two weeks of LGG supplementation had less hepatic tissue damage, in addition to a lower expression of *tnf- α* ³⁵. Furthermore, in a model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) induced by a fructose-rich diet for 8 weeks, Ritze et al.,³⁶ evaluated the effect of LGG as a protective agent in C57BL/J6 mice and observed that probiotics reduced LPS and consequently there was an attenuation of TNF- α and IL-1 β mRNA expression in the liver of the animals.

Alcohol and its metabolites can lead to the growth of bacteria in the small intestine, leading to intestinal microbiota dysbiosis, and increased gut permeability with endotoxin translocation from the intestine to the liver³⁷. In our experiment, we observed

a significantly higher *cldn15a* expression in EP group compared to the E Group, demonstrating that probiotics decrease gut permeability, promoting an improvement of the gut barrier. The expression of the other assessed TJ (*cldn-C*, *cldn15b* and *f11r*) also appear larger in the EP Group compared to E group, however without statistical significance. LGG supplementation also promoted benefits related to barrier integrity in mice, with increase of Firmicutes and Bacteroidetes phyla in the small intestine and restored the concentration of TJ³⁰ proteins. Additionally, the Bull-Otterson et al., showed that rats exposed to ethanol and fed with diet enriched with probiotic LGG, presented improvement in the TJ protein expression³⁸.

Probiotics are mostly consumed in the form of supplements, however they can also be added to foods during the manufacturing process, providing better conditions to the product and greater acceptance of its therapeutic properties by consumers³⁹. High number of probiotic food products and beverages have been put on the market in recent years, with emphasis on yogurts, probiotic cheeses and fermented beverages⁴⁰. There is increasing evidence on the benefits of ingestion of probiotics in food, however, there is still a need for further studies in the area ^{41,41}.

Possible limitations of this study are related to the experimental model with zebrafish, the fact of not being able to determine exactly how much of the ration was consumed by each animal, since it was added directly in the water, having to use averages. Also, regarding the selection of the LGG dose used, in addition to the performed tests, the ideal would have been to quantify the colonies, which we suggest for future studies in order to evaluate if smaller doses would also be effective. Evaluating the composition of the intestinal microbiota and the presence of dysbiosis in zebrafish is a great challenge, this is certainly a point to be explored, especially in

the sense of studying the effects of the use of LGG in both prevention and treatment of dysbiosis in different liver disease models.

The data of this study collaborate to elucidate the pathways by which the probiotic LGG acts in ALD and reinforce the idea of its use as preventive agent. Further studies both in experimental models and clinical trials should be carried out.

CONCLUSION

It was possible to verify that the supplementation of probiotics with LGG was protective for hepatic steatosis in fish exposed to ethanol. In addition, LGG had effect in the modulation of the inflammatory response promoting a reduction of the proinflammatory cytokine *il-1 β* and gut permeability markers, improving the structure of the gut barrier.

REFERENCES

1. World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2014. 2014.
2. O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ. Alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2010;51(1):307-328. doi:10.1002/hep.23258
3. Kirpich IA, Feng W, Wang Y, et al. The Type of Dietary Fat Modulates Intestinal Tight Junction Integrity , Gut Permeability , and Hepatic Toll-Like Receptor Expression in a Mouse Model of Alcoholic Liver Disease. 2012;36(5):835-846. doi:10.1111/j.1530-0277.2011.01673.x
4. Xue L, He J, Gao N, et al. Probiotics may delay the progression of nonalcoholic fatty liver disease by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal endotoxemia. *Sci Rep*. 2017;7(March):1-13. doi:10.1038/srep45176
5. Ceccarelli S, Nobili V, Alisi A. Toll-like receptor-mediated signaling cascade as a regulator of the inflammation network during alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(44):16443-16451. doi:10.3748/wjg.v20.i44.16443
6. Chen P, Stärkel P, Turner JR, Ho SB, Schnabl B. Dysbiosis-induced intestinal inflammation activates tumor necrosis factor receptor I and mediates alcoholic liver disease in mice. *Hepatology*. 2015;61(3):1-8. doi:10.1002/hep.27489
7. Günzel D, Yu ASL. Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiol Rev*. 2013;93(2):525-569.
8. Guarner F, Khan AG, Garisch J, et al. Probiotics and Prebiotics. *World Gastroenterol Organ Pract Guidel*. 2008:1-22.
9. Brandl K, Schnabl B. Is intestinal inflammation linking dysbiosis to gut barrier dysfunction during liver disease? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;9(8):1069-1076. doi:10.1586/17474124.2015.1057122
10. Davis, BK., Wen, H., Ting J. The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases. *Annu Rev Immunol*. 2011:707-735. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101405.The
11. Wu X, Dong L, Lin X, Li J. Relevance of the NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of chronic liver disease. *Front Immunol*. 2017;8(DEC):1-10. doi:10.3389/fimmu.2017.01728

12. Cui K, Yan G, Xu C, et al. Invariant NKT cells promote alcohol-induced steatohepatitis through interleukin-1 β in mice. *J Hepatol.* 2015;62(6):1311-1318. doi:10.1016/j.jhep.2014.12.027
13. Ma Y-Y, Li L, Yu C-H, Shen Z, Chen L-H, Li Y-M. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2013;19(40):6911. doi:10.3748/wjg.v19.i40.6911
14. Chu H, Williams B, Schnabl B. Gut microbiota, fatty liver disease, and hepatocellular carcinoma. *Liver Res.* 2018;https://:1-9. doi:10.1016/j.livres.2017.11.005
15. Shi X, Wei X, Yin X, et al. Hepatic and fecal metabolomic analysis of the effects of lactobacillus rhamnosus GG on alcoholic fatty liver disease in mice. *J Proteome Res.* 2015;14(2):1174-1182. doi:10.1021/pr501121c
16. Wree A, Marra F. The inflammasome in liver disease Financial support Conflict of interest Acknowledgements. *J Hepatol.* 2018;63(5):5-7.
17. WESTERFIELD M. The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*). Disponível em < <https://zfin.org/ZDB-PUB-101222-52> >. 2000.
18. Meurer F, Hayashi C, Boscolo WR. Digestibilidade aparente de alguns alimentos protéicos pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev Bras Zootec.* 2003;32(6):1-11.
19. Schneider ACR, Machado ABMP, de Assis AM, et al. Effects of Lactobacillus rhamnosus GG on hepatic and serum lipid profiles in zebrafish exposed to ethanol. *Zebrafish.* 2014;11(4):371-378. doi:10.1089/zeb.2013.0968
20. Wilson JM, Bunte RM, Carty AJ. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2009;48(6):785-789. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19930828>5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2786934>.
21. Schneider ACR, Greg??rio C, Uribe-Cruz C, et al. Chronic exposure to ethanol causes steatosis and inflammation in zebrafish liver. *World J Hepatol.* 2017;9(8):418-426. doi:10.4254/wjh.v9.i8.418
22. Mehlem A, Hagberg CE, Muhl L, Eriksson U, Falkevall A. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat Protoc.* 2013;8(6):1149-1154. doi:10.1038/nprot.2013.055

23. Ouwehand A, Saxelin M, Salminen S. Phenotypic differences between commercial *Lactobacillus rhamnosus* GG and *L. rhamnosus* strains recovered from blood. *Clin Infect Dis*. 2004;15(39):1858-1860.
24. Zhang M, Wang C, Wang C, et al. Enhanced AMPK phosphorylation contributes to the beneficial effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supernatant on chronic-alcohol-induced fatty liver disease. *J Nutr Biochem*. 2015;26(4):337-344. doi:10.1016/j.jnutbio.2014.10.016
25. Kim B, Kun-Young Park, Yosep Ji, Soyoung Park, Wilhelm Holzapfel CH. Protective effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG against dyslipidemia in high-fat diet-induced obese mice. *Arch Biochem Biophys*. 2016;473(2):530-536. doi:10.1016/j.abb.2016.02.028
26. Sekirov I, Russell L, Antunes CM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. *PHYSIOLOGY*. 2010;90(859-904).
27. Cinaroglu A, Gao C, Imrie D, Sadler KC. Atf6 plays protective and pathologic roles in fatty liver disease due to endoplasmic reticulum stress. *Hepatology*. 2011;54(2):1-42. doi:10.1002/hep.24396.Atf6
28. Silveira TR da, Schneider AC, Hammes TO. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. *Cienc Cult*. 2012;64(2):4-5. http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252012000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=pt.
29. Shimada Y, Kuninaga S, Ariyoshi M, et al. E2F8 promotes hepatic steatosis through FABP3 expression in diet-induced obesity in zebrafish. *Nutr Metab (Lond)*. 2015;12(1):17. doi:10.1186/s12986-015-0012-7
30. Nanji AA, Khettry U, Sadrzadeh SMH. *Lactobacillus* Feeding Reduces Endotoxemia and Severity of Experimental Alcoholic Liver (Disease). *Exp Biol Med*. 1994;205(3):243-247. doi:10.3181/00379727-205-43703
31. Forsyth CB, Farhadi A, Jakate SM, Tang Y, Shaikh M, Keshavarzian A. *Lactobacillus* GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol*. 2009;43(2):163-172. doi:10.1016/j.alcohol.2008.12.009
32. McClain CJ, Cohen DA, Dinarello CA, Cannon JG, Shedlofsky SI, Kaplan AM. Serum interleukin-1 (IL-1) activity in alcoholic hepatitis. *Life Sci*. 1986;39(16):1479-1485. doi:10.1016/0024-3205(86)90554-0

33. Szabo G, Petrasek J. Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(7):387-400. doi:10.1038/nrgastro.2015.94
34. Petrasek J, Bala S, Csak T, et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3476-3489. doi:10.1172/JCI60777
35. Wang Y, Liu Y, Kirpich I, et al. Lactobacillus rhamnosus GG reduces hepatic TNF α production and inflammation in chronic alcohol-induced liver injury. *J Nutr Biochem*. 2013;24(9):1609-1615. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.02.001
36. Ritze Y, Bárdos G, Claus A, et al. Lactobacillus rhamnosus GG Protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice. *PLoS One*. 2014;9(1):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0080169
37. Volynets V, Louis S, Pretz D, et al. Intestinal Barrier Function and the Gut Microbiome Are Differentially Affected in Mice Fed a Western-Style Diet or Drinking Water Supplemented with Fructose. *J Nutr*. 2017;147(5):770-780. doi:10.3945/jn.116.242859
38. Bull-Ottersen L, Feng W, Kirpich I, et al. Metagenomic Analyses of Alcohol Induced Pathogenic Alterations in the Intestinal Microbiome and the Effect of Lactobacillus rhamnosus GG Treatment. *PLoS One*. 2013;8(1):4-13. doi:10.1371/journal.pone.0053028
39. Singh V, Sharma J, Babu S, Singla A. Role of probiotics in health and disease: a review. *JPMA J*. 2013:253-257. <http://europepmc.org/abstract/med/23894906>.

8. CONCLUSÕES

1. As doses 1 e 2 mg/peixe/dia, foram positivas para os testes de colonização intestinal.
2. A partir da suplementação com 1 mg/peixe/dia de LGG, foi possível verificar uma ação protetora no acúmulo de lipídeos hepático nos animais expostos ao etanol.
3. O LGG reduziu a expressão dos marcadores dos inflamassomas, em especial a *il-1 β* .
4. O LGG promoveu aumento de expressão dos marcadores de permeabilidade intestinal, em especial a *cln15a*, indicando possivelmente, melhora da estrutura da barreira intestinal.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do probiótico LGG nos marcadores dos inflamassomas e também nos marcadores de permeabilidade intestinal em um modelo experimental de doença hepática alcóolica em *zebrafish*.

A partir das análises realizadas, verificou-se que a suplementação do probiótico LGG foi protetora para a esteatose hepática em animais expostos ao etanol. Além disso, o LGG teve ação na modulação da resposta inflamatória promovendo diminuição da citocina pró-inflamatória *il-1 β* e de marcadores de permeabilidade intestinal, em especial a *cldn15a*, melhorando assim, a estrutura da barreira intestinal.

Futuramente seria importante avaliar se esses mesmos marcadores, dos inflamassomas e de permeabilidade intestinal, apresentam comportamento similar em outros modelos de doença hepática, como por exemplo, na DHGNA a partir da obesidade. E a partir daí pensar em novas formas de tratamento com esses alvos-terapêuticos.

Adicionalmente, avaliar a composição da microbiota intestinal e a presença de disbiose em *zebrafish* é um grande desafio, que foi iniciado neste trabalho, mas infelizmente não tivemos sucesso com as técnicas utilizadas. Este com certeza é um ponto a ser explorado, especialmente no sentido de estudar os efeitos da utilização de LGG tanto na prevenção quanto no tratamento da disbiose em diferentes modelos de DH.

Estudar os mecanismos envolvidos na patogênese da DHA através de estudos experimentais tem ainda mais relevância quando os resultados dessas pesquisas dão suporte para que novos projetos sejam desenvolvidos e nesse sentido, sugerimos que

sejam realizados ensaios clínicos para avaliar o efeito da suplementação de probióticos em pacientes com DHA.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global status report. Geneva: World Health Organization. 2014.
2. Rehm J, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J. Alcohol and Global Health 1: Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet*. 2009;373(9682):2223-2233. doi:10.1016/S0140-6736(09)60746-7
3. Kirpich IA, Feng W, Wang Y, et al. The Type of Dietary Fat Modulates Intestinal Tight Junction Integrity , Gut Permeability , and Hepatic Toll-Like Receptor Expression in a Mouse Model of Alcoholic Liver Disease. 2012;36(5):835-846. doi:10.1111/j.1530-0277.2011.01673.x
4. Wu X, Dong L, Lin X, Li J. Relevance of the NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of chronic liver disease. *Front Immunol*. 2017;8(DEC):1-10. doi:10.3389/fimmu.2017.01728
5. Cui K, Yan G, Xu C, et al. Invariant NKT cells promote alcohol-induced steatohepatitis through interleukin-1 β in mice. *J Hepatol*. 2015;62(6):1311-1318. doi:10.1016/j.jhep.2014.12.027
6. Wree A, McGeough MD, Peña C a., et al. NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J Mol Med*. 2014;92(10):1069-1082. doi:10.1007/s00109-014-1170-1
7. Günzel D, Yu ASL. Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiol Rev*. 2013;93(2):525-569.
8. Ceccarelli S, Nobili V, Alisi A. Toll-like receptor-mediated signaling cascade as a regulator of the inflammation network during alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(44):16443-16451. doi:10.3748/wjg.v20.i44.16443
9. Chen P, Stärkel P, Turner JR, Ho SB, Schnabl B. Dysbiosis-induced intestinal inflammation activates tumor necrosis factor receptor I and mediates alcoholic liver disease in mice. *Hepatology*. 2015;61(3):1-8. doi:10.1002/hep.27489
10. McFarland L V., Evans CT, Goldstein EJC. Strain-Specificity and Disease-Specificity of Probiotic Efficacy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Med*. 2018;DOI: 10.33:1-20.
11. Shi X, Wei X, Yin X, et al. Hepatic and fecal metabolomic analysis of the effects

- of lactobacillus rhamnosus GG on alcoholic fatty liver disease in mice. *J Proteome Res.* 2015;14(2):1174-1182. doi:10.1021/pr501121c
12. Wang Y, Liu Y, Kirpich I, et al. Lactobacillus rhamnosus GG reduces hepatic TNF α production and inflammation in chronic alcohol-induced liver injury. *J Nutr Biochem.* 2013;24(9):1609-1615. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.02.001
 13. Forsyth CB, Farhadi A, Jakate SM, Tang Y, Shaikh M, Keshavarzian A. Lactobacillus GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol.* 2009;43(2):163-172. doi:10.1016/j.alcohol.2008.12.009
 14. Moss HB. The impact of alcohol on society: A brief overview. *Soc Work Public Health.* 2013;28(3-4):175-177. doi:10.1080/19371918.2013.758987
 15. Joffe AH. Alcohol and Social Complexity in Ancient Western Asia. *Curr Anthropol.* 1998;39(3):297-322. doi:10.1086/204736
 16. Ritchie H, Roser M. Alcohol consumption. *Publ online OurWorldInData.org Retrieved from "https://ourworldindata.org/alcohol-consumption" [Online Resour.* 2018.
 17. Ministério da Justiça. Efeito das substâncias psicoativas. 2014.
 18. Centro de Informações sobre Saúde e Álcool. 2018.
 19. Kelly-Weeder S, Phillips K, Rounseville S. Effectiveness of public health programs for decreasing alcohol consumption. *Patient Intell.* 2011;2011(3):29. doi:10.2147/PI.S12431
 20. World Health Organization. Global status report on alcoholic and health. Geneva. Department of Mental Health and Substance Abuse. 2011.
 21. World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2014. 2014.
 22. Gonçalves AM, Porto AC, Assunção PG, Oliveira TM, Silva TPR da. Capacitação sobre alcoolismo para profissionais da atenção básica *. *Cad Bras Saúde Ment.* 2017;9(22):29-35.
 23. Drogas (Instituto Nacional de Políticas Públicas do Álcool e Outras. Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD). 2012.
 24. Ritze Y, Bárdos G, Claus A, et al. Lactobacillus rhamnosus GG Protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice. *PLoS One.* 2014;9(1):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0080169

25. O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ. Alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2010;51(1):307-328. doi:10.1002/hep.23258
26. Bruha R, Dvorak K, Petryl J. Alcoholic liver disease. 2012;4(3):81-90. doi:10.4254/wjh.v4.i3.8
27. Kachani AT, Brasiliano S, Hochgraf PB. O impacto do consumo alcoólico no ganho de peso The impact of alcohol consumption on weight gain. *Rev Psiq Clín*. 2008;35(1):21-24.
28. Lieber CS. Alcohol and the Liver : Metabolism of Alcohol and Its Role in Hepatic and Extrahepatic Diseases. *Mt Sinai J Med*. 2000;67(1):84-94.
29. Matos LC. Alcoholic Liver Disease (ALD). *Rev Soc Port Med Interna*. 2014;13(3):207-216.
30. Tsukamoto H, Ph D, Machida K, Ph D, Dynnyk A, Mkrtchyan H. “ Second Hit ” Models of Alcoholic Liver Disease. 2009;1(212):178-187. doi:10.1055/s-0029-1214373.
31. Cinaroglu A, Gao C, Imrie D, Sadler KC. Atf6 plays protective and pathologic roles in fatty liver disease due to endoplasmic reticulum stress. *Hepatology*. 2011;54(2):1-42. doi:10.1002/hep.24396.Atf6
32. Song Z, Zhou Z, Deaciuc I, Chen T, McClain CJ. Inhibition of adiponectin production by homocysteine: A potential mechanism for alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2008;47(3):867-879. doi:10.1002/hep.22074
33. An L, Wang X, Cederbaum AI. Cytokines in alcoholic liver disease. *Arch Toxicol*. 2012;86(9):1337-1348. doi:10.1007/s00204-012-0814-6
34. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature*. 2012;481(7381):278-286. doi:10.1038/nature10759
35. Rathinam VAK, Chan FK. In fl ammasome , In fl amimation , and Tissue Homeostasis. 2018;xx:1-15.
36. Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519–50. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132612
37. Davis, BK., Wen, H., Ting J. The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases. *Annu Rev Immunol*. 2011:707-735. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101405.The
38. KUBES P, MEHAL WZ. Reviews in Basic and Clinical. *Gastroenterol Hepatol*.

- 2012;143(2):1158-1172. doi:10.1053/j.gastro.2010.12.001
39. Wree A, Marra F. The inflammasome in liver disease Financial support Conflict of interest Acknowledgements. *J Hepatol.* 2018;63(5):5-7.
 40. Jo E-K, Kim JK, Shin D-M, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol.* 2016;13(2):148-159. doi:10.1038/cmi.2015.95
 41. Voican CS, Njiké-Nakseu M, Boujedidi H, et al. Alcohol withdrawal alleviates adipose tissue inflammation in patients with alcoholic liver disease. *Liver Int.* 2015;35(3):967-978. doi:10.1111/liv.12575
 42. Bischoff S. Bischoff SC. 'Gut health': a new objective in medicine? *BMC Med.* 2011;9:24.
 43. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, et al. Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.* 2014;14(1):1-29. doi:10.1186/s12876-014-0189-7
 44. Brandtzaeg P. The gut as communicator between environment and host: Immunological consequences. *Eur J Pharmacol.* 2011;668(SUPPL. 1):2-3. doi:10.1016/j.ejphar.2011.07.006
 45. König J, Wells J, Cani PD, et al. Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clin Transl Gastroenterol.* 2016;7(10). doi:10.1038/ctg.2016.54
 46. Pendyala S, Walker JM, Holt PR. A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology.* 2012;142(5):9-11. doi:10.1053/j.gastro.2012.01.034
 47. Manresa MC, Taylor CT. Hypoxia Inducible Factor (HIF) Hydroxylases as Regulators of Intestinal Epithelial Barrier Function. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2017;3(3):303-315. doi:10.1016/j.jcmgh.2017.02.004
 48. Kolosov D, Bui P, Kelly SP. Claudins in teleost fishes Claudin Diversity in Teleost Fishes Claudin Nomenclature in Teleost Fishes Tissue-Specific Claudin Expression in Teleost Fishes. 2018:1-14.
 49. Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2008;1778(3):588-600. doi:10.1016/j.bbamem.2007.08.017
 50. Holczbauer Á, Gyöngyösi B, Lotz G, et al. Increased Expression of Claudin-1 and Claudin-7 in Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Pathol Oncol*

- Res. 2014;20(3):493-502. doi:10.1007/s12253-013-9683-4
51. Kolosov D, Bui P, Kelly SP. Claudins in teleost fishes Claudin Diversity in Teleost Fishes Claudin Nomenclature in Teleost Fishes Tissue-Specific Claudin Expression in Teleost Fishes. *Tissue Barriers*. 2013;1(3):1-14.
 52. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intracellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol*. 1998;142(1):117-127. doi:10.1083/jcb.142.1.117
 53. Mandell KJ, Parkos CA. The JAM family of proteins. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(6):857-867. doi:10.1016/j.addr.2005.01.005
 54. Rahman K, Desai C, Iyer SS, et al. Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol. *Gastroenterology*. 2016;151(4):733-746.e12. doi:10.1053/j.gastro.2016.06.022
 55. Patel S, Behara R, Swanson GR, et al. Alcohol and the Intestine. *Biomolecules*. 2015;5:2573-2588. doi:10.3390/biom5042573
 56. Keshavarzian A, Farhadi A, Forsyth CB, et al. Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress , intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats q. *J Hepatol*. 2009;50:538-547. doi:10.1016/j.jhep.2008.10.028
 57. Purohit V, Bode JC, Turner JR. Alcohol , Intestinal Bacterial Growth , Intestinal Permeability to Endotoxin , and Medical Consequences Summary of a Symposium Suppression of Bacterial Growth by Probiotics The Leaky Epithelial Barrier in Intestinal Diseases. *Alcohol*. 2008;42(5):349-361.
 58. Parlesak A, Schäfer C, Schtitz T, Christian J. liver disease *. *J Hepatol*. 2000;32(5):742-747.
 59. Zima T, Kalousova M. Oxidative Stress and Signal Transduction Pathways in. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005;29(11):110-115. doi:10.1097/01.alc.0000189288.30358.4b
 60. Wang Y, Tong J, Chang B, Wang B, Zhang DAI, Wang B. Effects of alcohol on intestinal epithelial barrier permeability and expression of tight junction - associated proteins. *Mol Med Rep*. 2014;9:2352-2356. doi:10.3892/mmr.2014.2126

61. van Wijck K, Verlinden TJM, van Eijk HMH, et al. Novel multi-sugar assay for site-specific gastrointestinal permeability analysis: A randomized controlled crossover trial. *Clin Nutr.* 2013;32(2):245-251. doi:10.1016/j.clnu.2012.06.014
62. Bergheim I, Weber S, Vos M, et al. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: Role of endotoxin. *J Hepatol.* 2008;48(6):983-992. doi:10.1016/j.jhep.2008.01.035
63. Thuy S, Ladurner R, Volynets V, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Humans Is Associated with Increased Plasma Endotoxin and Plasminogen Activator Inhibitor 1 Concentrations and with Fructose Intake 1. 2008;(February):1452-1455.
64. Volynets V, Louis S, Pretz D, et al. Intestinal Barrier Function and the Gut Microbiome Are Differentially Affected in Mice Fed a Western-Style Diet or Drinking Water Supplemented with Fructose. *J Nutr.* 2017;147(5):770-780. doi:10.3945/jn.116.242859
65. Amali AA, Rekha RD, Lin CJF, et al. Thioacetamide induced liver damage in zebrafish embryo as a disease model for steatohepatitis. *J Biomed Sci.* 2006;13(2):225-232. doi:10.1007/s11373-005-9055-5
66. Thakur PC, Stuckenholz C, Rivera MR, et al. Lack of de novo phosphatidylinositol synthesis leads to endoplasmic reticulum stress and hepatic steatosis in cdIPT-deficient zebrafish. *Hepatology.* 2011;54(2):452-462. doi:10.1002/hep.24349
67. Silveira TR da, Schneider AC, Hammes TO. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. *Cienc Cult.* 2012;64(2):4-5. http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252012000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=pt.
68. Shimada Y, Kuninaga S, Ariyoshi M, et al. E2F8 promotes hepatic steatosis through FABP3 expression in diet-induced obesity in zebrafish. *Nutr Metab (Lond).* 2015;12(1):17. doi:10.1186/s12986-015-0012-7
69. Stern HM, Zon LI. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(7):533-539. doi:10.1038/nrc1126
70. Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 2000;10:1351-1358. doi:10.1101/gr.144700.1

71. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.* 2007;8(5):353-367. doi:10.1038/nrg2091
72. Bradford Y, Conlin T, Dunn N, et al. ZFIN: Enhancements and updates to the zebrafish model organism database. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(SUPPL. 1):822-829. doi:10.1093/nar/gkq1077
73. Schneider ACR, Santos J dos, Porawski M, et al. Implementação de um novo modelo de experimentação animal - Zebrafish. *ReV HCPA.* 2009;29(2):100-103.
74. Parnig C, Seng WL, Semino C, Mcgrath P. Zebrafish : A Preclinical Model for Drug Screening. 2002;1(1):41-48.
75. Baatrup E, Henriksen PG. Disrupted reproductive behavior in unexposed female zebrafish (*Danio rerio*) paired with males exposed to low concentrations of 17 α -ethinylestradiol (EE2). *Aquat Toxicol.* 2015;160:197-204. doi:10.1016/j.aquatox.2015.01.020
76. Pedroso GL, Hammes TO, Escobar TDC, Fracasso LB, Forgiarini LF, da Silveira TR. Blood collection for biochemical analysis in adult zebrafish. *J Vis Exp.* 2012;(63):e3865. doi:10.3791/3865
77. Hammes TO, Pedroso GL, Hartmann CR, et al. The effect of taurine on hepatic steatosis induced by thioacetamide in Zebrafish (*Danio rerio*). *Dig Dis Sci.* 2012;57(3):675-682. doi:10.1007/s10620-011-1931-4
78. Schneider ACR, Machado ABMP, de Assis AM, et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on hepatic and serum lipid profiles in zebrafish exposed to ethanol. *Zebrafish.* 2014;11(4):371-378. doi:10.1089/zeb.2013.0968
79. Falcinelli S, Rodiles A, Unniappan S, et al. Probiotic treatment reduces appetite and glucose level in the zebrafish model. *Nat Publ Gr.* 2016;(August 2015):1-13. doi:10.1038/srep18061
80. JOINT FAO/WHO Food and Agricultural Organization/World Health Organization. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. *London, Ontario, Canada April 30 May 1.* 2012:11.
81. Sanchez B, Delgado S, Blanco-Míguez A, Lourenço A, Gueimonde M, Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol Nutr Food Res.* 2017;61(1):2017-2018. doi:10.1002/mnfr.201600240

82. Chu H, Williams B, Schnabl B. Gut microbiota, fatty liver disease, and hepatocellular carcinoma. *Liver Res.* 2018;https://:1-9.
doi:10.1016/j.livres.2017.11.005
83. Ma Y-Y, Li L, Yu C-H, Shen Z, Chen L-H, Li Y-M. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2013;19(40):6911. doi:10.3748/wjg.v19.i40.6911
84. Hong M, Han DH, Hong J, Kim DJ, Suk KT. Are Probiotics Effective in Targeting Alcoholic Liver Diseases ? *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2018;doi: 10.10:1-13.
85. Sung H, Kim SW, Hong M, Suk KT. Microbiota-based treatments in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2018;22(29):6673-6682.
doi:10.3748/wjg.v22.i29.6673
86. Kirpich IA, Solovieva N V., Leikhter SN, et al. Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol.* 2008;42(8):675-682. doi:10.1016/j.alcohol.2008.08.006
87. Yan AW, Fouts DE, Brandl J, et al. Enteric Dysbiosis Associated with a Mouse Model of Alcoholic Liver Disease. *Steatohepatitis/Metabolic Liver Dis.* 2010;53(1):96-105.
88. Bull-Otterson L, Feng W, Kirpich I, et al. Metagenomic Analyses of Alcohol Induced Pathogenic Alterations in the Intestinal Microbiome and the Effect of Lactobacillus rhamnosus GG Treatment. *PLoS One.* 2013;8(1):4-13.
doi:10.1371/journal.pone.0053028
89. Patten DA, Laws AP. Lactobacillus-produced exopolysaccharides and their potential health benefits: A review. *Benef Microbes.* 2015;6(4):457-471.
doi:10.3920/BM2014.0117
90. Kim B, Kun-Young Park, Yosep Ji, Soyoung Park, Wilhelm Holzapfel CH. Protective effects of Lactobacillus rhamnosus GG against dyslipidemia in high-fat diet-induced obese mice. *Arch Biochem Biophys.* 2016;473(2):530-536.
doi:10.1016/j.abb.2016.02.028

