

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

THAYSSA DALLA COSTA ESCOBAR

**EFEITO DO PROBIÓTICO *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG*
SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS EM FÍGADO DE RATOS
SUBMETIDOS AO MODELO DE LIGADURA DO DUCTO BILIAR**

Porto Alegre

DEZEMBRO/2013

THAYSSA DALLA COSTA ESCOBAR

**EFEITO DO PROBIÓTICO *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG*
SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS EM FÍGADO DE RATOS
SUBMETIDOS AO MODELO DE LIGADURA DO DUCTO BILIAR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial para obtenção do título de Bacharel(a)
em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Themis Reverbél da Silveira

Co-orientadora: Dra. Renata Leke

Porto Alegre

DEZEMBRO/2013

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à minha família que sempre me proporcionou absolutamente todas as condições para que alcançasse essa etapa.

À minha segunda família: o grupo do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia. Esse grupo foi de suma importância para a minha formação profissional, pois me deu lições não apenas sobre a pesquisa, mas também como trabalhar como uma verdadeira equipe. Obrigada por todos esses anos!

Meus sinceros agradecimentos à Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira, a qual tenho muito orgulho de dizer que é minha orientadora e que me acompanha desde o início de minha graduação.

À Dra. Renata Leke, que sempre me ajudou em tudo que precisava, me corrigindo quando estava errada, me orientando, sendo quase uma mãe durante esse tempo. Sem ela, esse trabalho não seria possível.

À Thais Ortiz Hammes, que foi a primeira pessoa com a qual trabalhei e com a qual aprendi muito durante esse tempo. Muito obrigada por todos os conselhos dados!

Além disso, não poderia deixar de agradecer às minhas amigas Gabriela, Juliana, Lais, Laura, Nathália e Vanessa, que estiveram ao meu lado durante boa parte dessa trajetória acadêmica e que, com certeza, sem elas, nada disso teria tido a mesma graça.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
Cirrose	6
Fibrose hepática	7
Inflamação.....	12
Eixo êntero-hepático.....	15
Probióticos	18
Modelo de ligadura do ducto biliar.....	21
2. OBJETIVO	23
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	24
INTRODUÇÃO	27
OBJETIVO.....	29
MATERIAIS E MÉTODOS	29
Animais.....	29
Cirurgia de ligadura do ducto biliar comum.....	29
Grupos de animais e tratamento	30
Coleta das amostras	31
Expressão gênica	31
Análise estatística.....	32
RESULTADOS	33
Expressão Gênica de TNF- α , IL-1 β e TLR4	33
DISCUSSÃO	35
AGRADECIMENTOS.....	39
LEGENDA DAS FIGURAS.....	40
LEGENDA DAS FIGURAS.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
4. CONCLUSÃO	45
5. PERSPECTIVAS	46
6. BIBLIOGRAFIA.....	47
7. ANEXOS.....	52

ABREVIATURAS

BGN: Bacilos Gram-negativos

CHE: Células hepáticas estreladas

CGP: Cocos Gram-positivos

CK: Células de Kupffer

CME: Componentes da matriz extracelular

IFN- γ : Interferon γ

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-6: interleucina 6

iNOS: Óxido nítrico sintase

LDB: Ligação do ducto biliar

LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG

LPS: Lipopolissacarídeo

MF: Miofibroblasto

MMPs: Metaloproteinases da matriz

NK: *Natural killers*

PAMPS: Padrões moleculares associados aos patógenos

PBS: Tampão fosfato salina

TGF- β : Fator de transformação do crescimento β

Th1: Linfócito auxiliar do tipo 1

Th2: Linfócito auxiliar do tipo 2

TIMPs: Inibidores de metaloproteinases da matriz

TLR: Receptores tipo Toll

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

UFC: Unidades formadoras de colônias

RESUMO

Introdução: A cirrose é uma hepatopatia crônica consequente à lesão do fígado, caracterizada pela modificação da arquitetura do parênquima devido à fibrose difusa e à presença de nódulos regenerativos. A sua patogênese é complexa, sendo que diversos fatores influenciam na ativação e progressão da fibrose, incluindo componentes inflamatórios. Em estudo experimental em ratos submetidos ao modelo de ligadura do ducto biliar (LDB), observou-se que a colestase extrahepática desenvolvida nesse modelo produziu um aumento dos níveis de TNF- α e IL-1 circulantes, que poderiam ocorrer através da ativação de receptores do tipo Toll (TLR). Probióticos são micro-organismos que, em concentrações adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro. Acredita-se que eles atuem através da redução do pH intestinal, modulação da microbiota intestinal e imunomodulação. Desta forma, a sua utilização poderia ser benéfica ao reduzir a inflamação e a permeabilidade intestinal. **Objetivo:** avaliar o efeito do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) sobre a expressão gênica de TNF- α , IL-1 β e TLR4 em fígado de ratos submetidos ao modelo de LDB. **Animais e Métodos:** foram utilizados 24 ratos Wistar machos de 60 dias, submetidos à ligadura do ducto biliar comum. O grupo controle consistiu em “sham-operados”. Duas semanas depois do procedimento cirúrgico, metade dos animais controle e LDB receberam dose diária de LGG de $2,5 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia (UFC), pelo método de gavagem, durante 4 semanas, enquanto a outra metade recebeu apenas solução veículo (PBS). Após esse período, os fígados desses animais foram coletados para análise de expressão gênica de TNF- α , IL-1 β e TLR4. Os resultados foram calculados pelo método comparativo utilizando a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$. **Resultados:** Em relação ao TLR4 e IL-1 β , observou-se que não houve alteração de expressão gênica entre os quatro grupos. Entretanto, os grupos submetidos à LDB apresentaram níveis de TNF- α significativamente maiores do que as encontradas nos grupos controles. **Conclusão:** Foi observado o aumento da citocina inflamatória TNF- α no fígado dos animais submetidos à LDB, mas o tratamento com LGG não alterou esse padrão de expressão. A inflamação provavelmente não foi decorrente da ativação por endotoxinas, visto que os níveis de expressão gênica de TLR4 não foram diferentes entre os grupos controles e doentes.

1. INTRODUÇÃO

Cirrose

A cirrose é uma hepatopatia crônica consequente à lesão do fígado, caracterizada pela modificação da arquitetura do parênquima hepático devido à fibrose difusa e à formação de nódulos regenerativos. Nessa doença, há a formação de cicatrizes no tecido hepático, alterando a estrutura desse órgão e prejudicando o fluxo sanguíneo (1). Neste caso, o fluxo torna-se diminuído pelo aumento da resistência intra-órgão, determinando a hipertensão portal (2). Histologicamente, a cirrose é definida pela formação de nódulos regenerativos, que são “ilhas” de hepatócitos circundadas por fibrose, originadas em resposta ao dano hepático crônico e desprovidas de veia central (3). A fibrose hepática resulta da propagação da resposta de cicatrização derivada da contínua produção e deposição de tecido conectivo da matriz extracelular (3). A cirrose representa um estado dinâmico resultante do processo de desequilíbrio entre dano (necrose celular), resposta ao dano (fibrose) e tentativa de regeneração (formação de nódulos) (4,5).

A cirrose apresenta uma significativa taxa de morbidade e mortalidade. Ela pode ser causada por uma diversidade de fatores, sendo o consumo abusivo de álcool e as hepatites virais B e C nos adultos as causas mais comuns (6). Em países industrializados, o etilismo e a hepatite C são os principais responsáveis pelo desenvolvimento dessa alteração do tecido hepático (6). Contudo, a doença hepática gordurosa não alcoólica também está emergindo como uma importante causa da cirrose em todo o mundo (7). Além disso, outras causas incluem: hepatites autoimunes, intoxicação por drogas e obstrução de vias biliares. Estima-se que a prevalência da cirrose seja de 4,5 a 9,5%, o que poderia corresponder a 100 milhões de pessoas acometidas em todo o mundo (8). Desta forma, a cirrose tem um grande impacto na saúde pública, pois de acordo com o “*Center for Disease Control*” (CDC-NIH) é a 14ª causa de óbito no mundo e acredita-se que será a 12ª causa de morte no mundo no ano de 2020 (8).

As complicações mais comumente enfrentadas por esses pacientes incluem: peritonite bacteriana espontânea, ascite, síndrome hepatorenal, encefalopatia hepática e hipertensão portal (9). A hipertensão portal é descrita como o aumento do gradiente de pressão porto-sistêmico em qualquer porção do sistema venoso. Esta complicação da cirrose é decorrente de um aumento da resistência do fluxo e um aumento do afluxo do sangue portal (10,11). A hipertensão portal é um fator essencial para o surgimento de varizes esofágicas, que, quando rompidas, são responsáveis pela significativa parcela de mortalidade dessa doença (10).

Fibrose hepática

O fígado recebe um suprimento sanguíneo duplo: a veia porta, que traz sangue rico em nutrientes oriundos do intestino, e a artéria hepática, que distribui o sangue saturado em oxigênio (12). O suprimento sanguíneo proveniente da veia porta corresponde a aproximadamente 70% da irrigação hepática, enquanto que o arterial contribui em 30% (1). O parênquima hepático normal é composto por um componente epitelial (hepatócitos), um revestimento endotelial fenestrado (células sinusoidais), macrófagos teciduais (células de Kupffer) e pericitos específicos (células estreladas hepáticas). Pelos sinusóides, circulam todos os nutrientes, oxigênio, e células do sistema imune. Entre eles e os hepatócitos, está o espaço de Disse, onde se localiza a matriz extracelular, essencial para a manutenção das diversas funções das células residentes do fígado e para a realização da troca de metabólitos entre a corrente sanguínea e os hepatócitos (Figura 1) (1,13,14). Os principais tipos celulares encontrados no fígado e as suas funções estão demonstrados na Tabela 1.

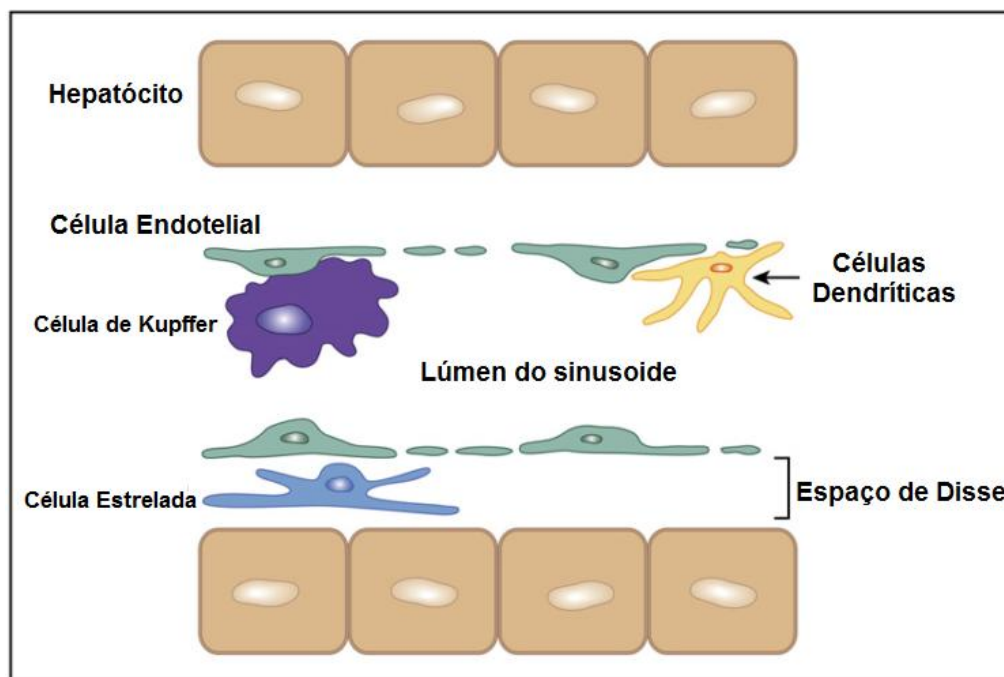


Figura 1. Células dos sinusóides hepáticos. Células estreladas hepáticas compreendem aproximadamente 5% – 8% do número total de células do fígado e estão localizadas no espaço de Disse, que é separado do lúmen por um endotélio fenestrado. Células de Kupffer e células dendríticas estão em contato com as células endoteliais (15).

Tipo celular	Funções
Hepatócito	Maior parte das funções do fígado; metabolismo intermediário
Células de Kupffer	Macrófagos residentes do fígado. Fagocitose de patógenos e partículas.
Célula Endotelial	Célula endotelial fenestrada que limita os sinusóides.
Célula Hepática Estrelada	Armazenamento de vitamina A. Diferenciação em miofibroblasto no dano hepático.
Fibroblasto Portal	Integridade dos tratos portais. Função de suporte.
Células Dendríticas	Células apresentadoras de antígenos. Início e regulação da resposta imune.

Tabela 1. Tipos celulares do fígado e suas respectivas funções (1).

Quando o fígado sofre uma injúria e torna-se fibrótico, ocorrem alterações na composição de sua matriz extracelular. Fibrose é definida como uma deposição excessiva de componentes da matriz extracelular (CMEs) em órgãos e tecidos, como consequência da proliferação e ativação de células hepáticas, tais como fibroblastos e miofibroblastos (MFs) (16). Ela pode apresentar-se em diferentes

padrões histopatológicos, dependendo de sua etiologia, localização do dano hepático, concentração e ativação de fatores pró-fibrogênicos (17). Nessa condição, o conteúdo de componentes de colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos aumentam 3 a 4 vezes, além de o tipo de CME tornar-se mais eletrodense (17). Esse acúmulo de CMEs ocorre na tentativa de isolar o dano hepático. Entretanto, ao fazer isso, o fígado tem a sua função comprometida devido a alterações no parênquima e o desaparecimento das fenestrações (18). A alteração no microambiente do espaço de Disse resulta em diferenças no fenótipo das células residentes no fígado, que vão contribuir para a perpetuação do estado fibrótico (19).

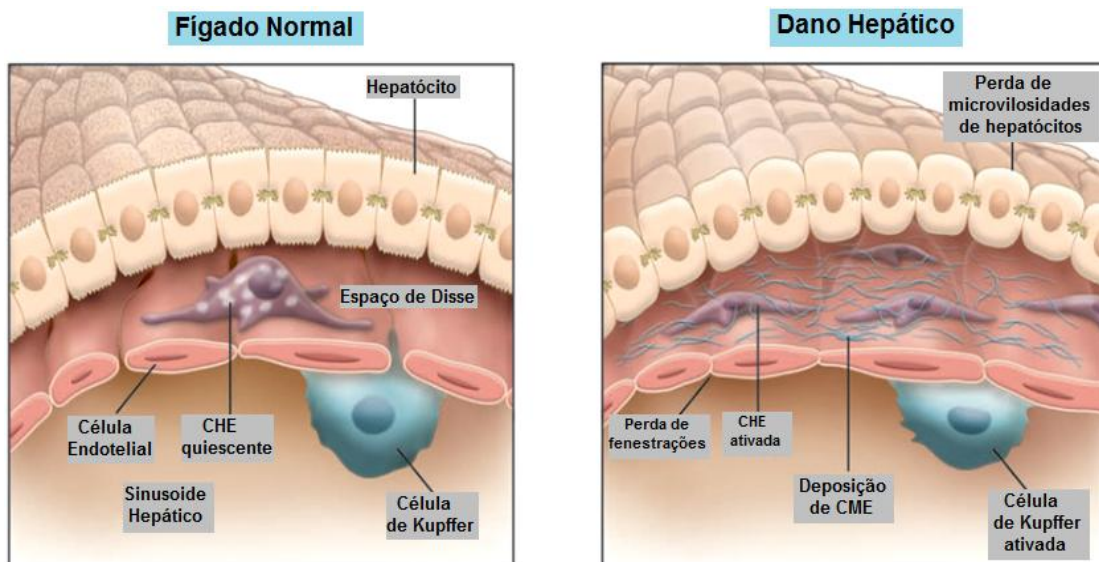


Figura 2. Eventos que ocorrem nos sinusóides hepáticos durante a fibrose. A resposta às alterações no espaço de Disse e à fibrose incluem respostas celulares e de composição da matriz extracelular. Células esteladas hepáticas (CHE), ao serem ativadas, depositam componentes da matriz extracelular (CME) no espaço de Disse. Isso, por sua vez, contribui para a perda das fenestrações, levando à deterioração da função hepática. A ativação de células de Kupffer acompanha o dano hepático e contribui para a ativação de CHEs (18).

As células envolvidas nos mecanismos fibrogênicos se originam de células hepáticas esteladas (CHE), mas outros tipos celulares também estão envolvidos como, por exemplo, MFs, fibroblastos portais, colangiócitos, hepatócitos, fibrócitos circulantes e células tronco mesenquimais (Figura 3). Quando ativadas,

essas células aumentam de uma forma significativa a síntese de colágenos tipos I e III, que se tornam predominante sobre a síntese de colágeno tipo IV (17). Apesar da complexa interação entre essas células e o processo de fibrose, sabe-se que a fibrogênese hepática é ancorada e perpetuada principalmente pelos MFs (13). Os MFs são células altamente proliferativas e contráteis, que contribuem ativamente para a progressão da fibrose. Estas células ocasionam o depósito excessivo de CMEs e a liberação de forma parácrina e/ou autócrina de fatores de crescimento. Esses mecanismos são cruciais para a sustentação e perpetuação não somente da fibrogênese, como também das respostas inflamatórias e da neo-angiogênese (5,20).

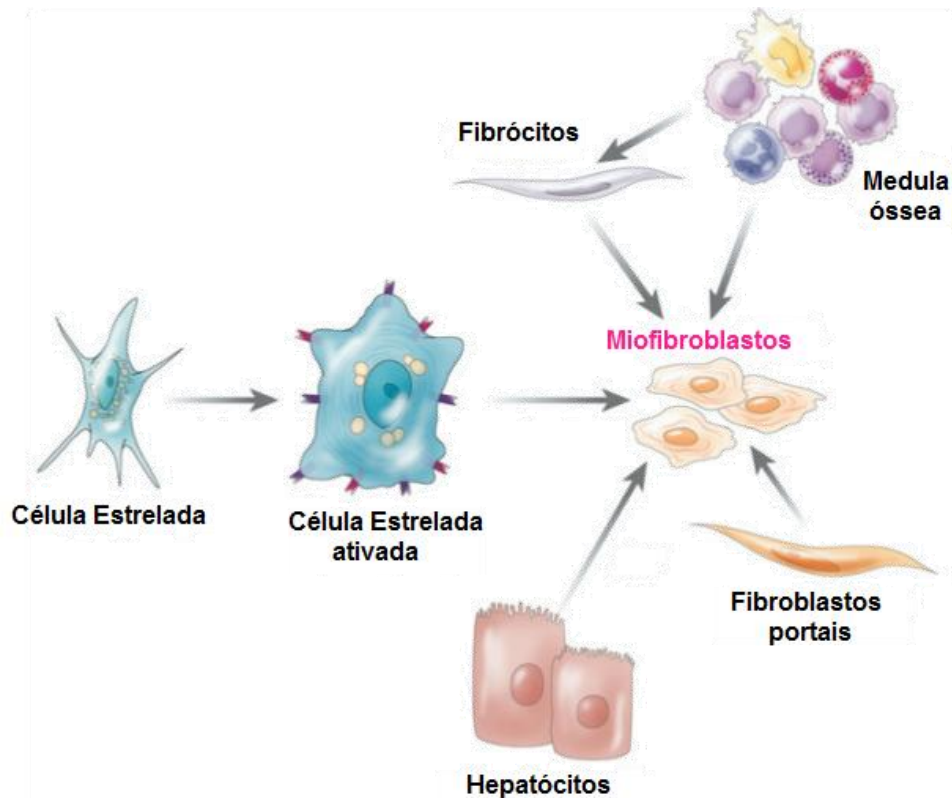


Figura 3. Contribuição de células hepáticas estreladas e outros tipos celulares para a fibrose hepática. A ativação de células hepáticas estreladas é iniciada por mediadores solúveis, tais como espécies reativas de oxigênio, lipopolissacarídeos, e sinalização parácrina. Através de estímulos por citocinas inflamatórias, ocorre a diferenciação dessas células em miofibroblastos, que contêm filamentos contráteis. Com a progressão da lesão, outras fontes também contribuem para a população fibrogênica no fígado, incluindo a medula óssea (provavelmente através de liberação de fibrócitos circulantes), fibroblastos portais e hepatócitos. Estes últimos podem diferenciar-se em miofibroblastos através de um processo denominado transdiferenciação epitélio-mesenquimal (20).

Outra célula fundamental para o processo fibrogênico é a CHE. Em um fígado normal, essas células são responsáveis pela síntese de componentes da matriz extracelular e pelo armazenamento de vitamina A e retinoides (21). Todavia, em condições de doença crônica do fígado, as CHEs quiescentes sofrem um processo de ativação própria, que envolve tanto alterações significativas na sua morfologia, como no tipo de resposta ao dano (18). Essa ativação ocorre em processos graduais, conhecidos como ativação, iniciação e perpetuação. A ativação corresponde à transição do perfil de células ricas em vitamina A para o perfil de miofibroblastos fibrogênicos e contráteis (21). Já a etapa da iniciação refere-se às alterações iniciais no fenótipo e na expressão gênica, que torna as células mais responsivas a outras citocinas, enquanto que a proliferação resulta dos efeitos desses estímulos na manutenção do fenótipo ativado e da geração de fibrose (22).

Durante o estágio da progressão do dano hepático, o número de células hepáticas estreladas aumenta, enquanto que, durante a resolução, esse número tende a diminuir (21). A regressão da fibrose requer que haja a ativação de dois mecanismos: a remoção de miofibroblastos através da apoptose e a remodelação do colágeno, por meio de um processo conhecido como fibrólise (23). Dois importantes componentes envolvidos na regulação desse processo de resolução do dano hepático compreendem as metaloproteinases (MMPs), que irão degradar os componentes da matriz extracelular, e os respectivos inibidores dessas enzimas, conhecidos como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (13,18). Entretanto, ainda não se sabe exatamente todos os mecanismos envolvidos nesse processo e outras células, tais como células de Kupffer (CK) e células hepáticas estreladas, também podem contribuir para a ativação da fibrólise (23).

O sistema imune desempenha um importante papel na fibrose, visto que a resposta inflamatória persistente é considerada uma das principais forças que sustentam a fibrogênese (24). Inicialmente, a resposta à injúria hepática se dá através da apoptose e/ou necrose de hepatócitos, que conseqüentemente liberam os componentes intracelulares e desencadeiam a liberação de citocinas e o recrutamento de leucócitos como (leucócitos polimorfonucleares e linfócitos,

especialmente os linfócitos auxiliares tipo 2 (Th2)) (25). Com a morte dessas células, os corpos apoptóticos são fagocitados pelas CHEs e pelas CKs, liberando citocinas, que estimularão a fibrose, tais como fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β) (26). Além disso, o sistema imune inato, envolvendo a sinalização por células *natural killers* (NK), células dendríticas e receptores tipo Toll (*Toll Like Receptors*, TLR) presentes em diversas células, também influencia os mecanismos pelos quais há a progressão da fibrose (27).

Inflamação

O fígado desempenha funções metabólicas vitais para o organismo e também é considerado um sítio estratégico para o sistema imune (28,29). O sangue proveniente do trato gastrointestinal é rico em antígenos, e as células imunes hepáticas têm o potencial de iniciar respostas do sistema imune inato ou adaptativo, bem como a tolerância a uma variedade de antígenos durante a homeostase (29,30). A patogênese da fibrose hepática é orquestrada em grande parte por mecanismos imunológicos, visto que a interação entre CHE, CK, linfócitos, células NK tem sido identificada nas principais rotas do desenvolvimento da fibrose. Entretanto, a completa caracterização de contribuições e interações dos sistemas imunes inato e adaptativo para a fibrogênese ainda não está totalmente esclarecida (30).

No fígado, o sistema imune inato é constituído por CKs, células dendríticas, células NK, citocinas inflamatórias, complemento e proteínas de fase aguda. Este sistema é caracterizado por uma resposta rápida e inicial do organismo a estímulos potencialmente perigosos, incluindo patógenos, dano tecidual, estresse oxidativo e desempenha um papel central na resposta inflamatória. Após esse reconhecimento de fatores danosos, ocorre a ativação de fagócitos locais e a produção de citocinas inflamatórias, proteínas de fase aguda e peptídeos antimicrobianos. Se a resolução da inflamação não ocorrer, os mediadores inflamatórios vão induzir a síntese e a liberação dessas proteínas de fase aguda e

citocinas para a circulação sistêmica, que vão estimular a produção de células inflamatórias na medula óssea, como os neutrófilos (31).

Na inflamação aguda, os neutrófilos são grandes responsáveis por promover a resposta inflamatória e a fibrogênese. Essas células, ao serem ativadas, podem produzir citocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral TNF- α e IL-1, que atuarão sobre os fibroblastos, estimulando-os a produzir proteínas da matriz extracelular. Não somente, essa sinalização induz a superexpressão de receptores para citocinas inflamatórias e para constituintes bacterianos em hepatócitos, células dendríticas e CK, que amplificarão a resposta sistêmica (31).

Na inflamação crônica, o infiltrado inflamatório é constituído predominantemente por células mononucleares. Dentre elas, os macrófagos parecem ser as principais células envolvidas na progressão da fibrogênese e são os principais produtores de MMPs e TIMPs (25,32). Sabe-se que há duas subpopulações de macrófagos que podem tanto mediar a destruição da matriz extracelular, contribuindo para a resolução do dano, quanto estimular a síntese e a proliferação de CMEs (31). Um balanço entre MMP/TIMP é fundamental para o equilíbrio de deposição e quebra de CMEs e, portanto, do desenvolvimento da fibrose. Além disso, as CKs possuem ampla capacidade de fagocitar e secretar diversas citocinas inflamatórias, que determinam as reações subsequentes do sistema imune e dos hepatócitos (30). Tanto nas doenças hepáticas agudas quanto crônicas, as CKs podem promover a cascata inflamatória, com a liberação de mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-1, que conseqüentemente irão atrair outras células para o local da inflamação, induzir a apoptose de hepatócitos e a ativação de CHEs (33–35).

A imunidade inata pode fornecer uma defesa inicial contra infecções, porém, quando há uma invasão por micro-organismos, cujos processos imunológicos iniciais não são suficientes para combatê-los, é necessária a resposta imunológica adaptativa. A resposta imune adaptativa contribui tanto para uma defesa mais eficaz contra a invasão de patógenos quanto para a proteção em outros estados patológicos. Ela pode ser classificada em imunidade humoral, mediada por

linfócitos B, e imunidade celular, mediada por linfócitos T. Aspectos importantes que distinguem esses dois tipos de resposta imune é que a imunidade adaptativa apresenta especificidade, diversidade e memória, enquanto que a inata não possui tais características (31).

O fígado saudável é sede para um conjunto de linfócitos, representando aproximadamente 25% das células não parenquimatosas. Dentre esses linfócitos, 64% correspondem a células T, enquanto que apenas 6% são células B. O restante, 31%, são linfócitos NK (36). Os linfócitos T presentes no fígado apresentam uma diferença na sua proporção de CD4⁺ e CD8⁺ quando comparado à razão no sangue periférico. A circulação sanguínea possui razão 2:1, enquanto que, em um fígado normal, essa taxa inverte-se, correspondendo 1:2,5 (37). Entretanto, apesar da diferença de proporções, a orquestração das respostas imunes de células T CD4⁺ em linfócitos auxiliares 1 (Th1) / linfócitos auxiliares 2 (Th2), linfócitos auxiliares 17 (Th17) e linfócitos auxiliares 22 (Th22) e suas funções reguladoras desempenham um papel central na fibrose hepática (38).

Na iniciação e na perpetuação da fibrose, em geral as respostas celulares tipo Th2 promovem mais efetivamente a fibrose do que as respostas tipo Th1. As células Th2 atuam ativando macrófagos e induzindo a produção de colágeno pelas CHE por meio de IL-4 e IL-12 e IL-13. Essas citocinas vão ativar os macrófagos e induzir a produção de colágeno pelas CHEs. Os linfócitos Th1 parecem estar envolvidos na resolução da fibrose, uma vez que secretam citocinas anti-fibrogênicas como, como IFN- γ , que inibe a produção de colágeno pelas CHEs (38). Esta citocina também estimula fortemente os macrófagos a secretarem óxido nítrico e intermediários reativos de oxigênio, através da indução da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) [24]. Além de IFN- γ , as células Th1 também liberam TNF- α , que ativa macrófagos e amplifica a resposta inflamatória, através da indução de diversas citocinas e quimiocinas, moléculas de adesão, iNOS e eicosanoides. Na regeneração hepática, o TNF- α é importante para proliferação de hepatócitos e funciona como um mitógeno e indutor de inibidores de apoptose (39).

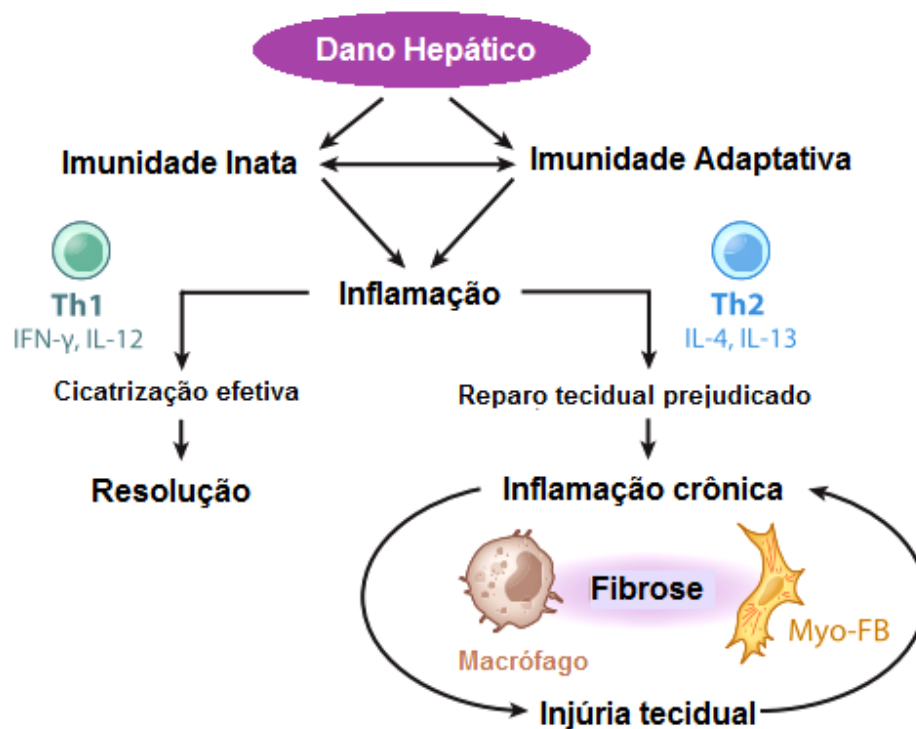


Figura 4. Patogênese da fibrose. O dano hepático, de diversas etiologias, ativa o sistema imune e o reparo tecidual. Quando o reparo é efetivo, há predomínio da resposta de linfócitos Th1, enquanto que uma resposta mediada por linfócitos Th2 tende a levar à inflamação crônica, que pode, então, levar à fibrose (16).

Eixo êntero-hepático

A homeostase intestinal está intimamente relacionada ao fígado, uma vez que este recebe o sangue proveniente do intestino, bem como é responsável pela secreção de bile para o lúmen, influenciando, portanto, as funções do intestino (40). Devido à grande quantidade de micro-organismos que coloniza o intestino, o sangue proveniente desse órgão contém não apenas produtos da digestão, mas também produtos microbianos. Os produtos microbianos presentes no sistema porta conseguem alcançar os sinusóides hepáticos, onde há diversas células imunologicamente competentes. Entre elas, as células de Kupffer, células dendríticas, linfócitos T, células hepáticas estreladas e células endoteliais sinusoidais, que expressam receptores de endotoxinas, ajudam a remover os patógenos, protegendo a circulação sistêmica da endotoxemia (41). A microbiota

intestinal participa, em condições fisiológicas, da produção de vitaminas, da degradação dos ácidos biliares, da digestão de nutrientes e da imunidade local e geral (42). O sistema imune intestinal compreende o tecido linfoide associado ao intestino, composto por quatro elementos: placas de Peyer, linfócitos da lâmina própria, linfócitos intraepiteliais e nódulos linfáticos mesentéricos (41). Em um indivíduo saudável, a translocação de produtos prejudiciais do intestino para sítios extraintestinais é eficientemente evitado pelos nossos mecanismos de defesa: a função da barreira intestinal e a detoxificação hepática (43).

Alterações no microbioma e/ou na permeabilidade intestinal podem promover a translocação de micro-organismos ou componentes derivados do seu metabolismo para a circulação portal em direção ao fígado, desempenhando assim um importante papel sobre a progressão do dano hepático. Em pacientes com cirrose, a microbiota intestinal assim como a permeabilidade desse órgão estão afetadas. Há supercrescimento de bactérias intestinais patogênicas que contribuem para o aumento de endotoxinas. Além disso, a hipertensão portal pode favorecer a translocação bacteriana para espaços extra-intestinais, tais como linfonodos mesentéricos, fígado e baço (44). A translocação bacteriana no fígado leva à ativação das células do sistema imune como, por exemplo, células de Kupffer, e acarreta a liberação de diversas citocinas e quimiocinas inflamatórias. Essas alterações de sistema e permeabilidade resultam em altos níveis plasmáticos de endotoxinas bacterianas, como lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos e lipopeptídeos, conhecidos como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Esses produtos bacterianos podem, então, ativar o sistema imune hepático através de TLR (45).

Os TLRs fazem parte de uma família de receptores transmembrana, que receberam esse nome em analogia aos receptores Toll de *Drosophila*. Suas funções incluem o reconhecimento e a produção de peptídeos antimicrobianos contra infecções por micro-organismos. Nas lesões hepáticas, ocorre a super expressão de TLR4 e seus co-receptores, o que sensibiliza a cascata inflamatória mediada por esses receptores (46). São conhecidos mais de 10 tipos diferentes de TLRs, cada um reconhecendo várias estruturas conservadas de patógenos. Os receptores tipo

Toll mais estudados na cirrose são o TLR4, que reconhece LPS; o TLR2 que é ativado por peptídeoglicano; e o TLR9, que reconhece DNA bacteriano (41). Na tabela abaixo, estão os principais TLRs e seus respectivos peptídeos que podem ser reconhecidos.

Receptor Toll-like	Localização do receptor	Molécula reconhecida	Origem do patógeno
TLR2	Membrana celular	Peptideoglicano	CGP (e BGN)
TLR4	Membrana celular	LPS	BGN
TLR9	Compartimento endossomal	DNA bacteriano	CGP e BGN

Tabela 2. Principais receptores ativados na cirrose. LPS, lipopolissacarídeo. CGP, cocos Gram-positivos. BGN, bacilos Gram-negativos.

Após a ligação de PAMPs aos TLRs, ocorre a ativação do sistema imune inato, com a produção de citocinas que irão gerar resposta inflamatória. No fígado, células que expressam TLR4, tais como as CKs e CHEs ativam a expressão de diversas citocinas inflamatórias, mantendo a inflamação e propagando o estado pró-fibrótico. As CKs respondem ao LPS produzindo principalmente TNF- α , IL-1 β , IL-6 e espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, como superóxido e óxido nítrico respectivamente (47). A endotoxemia estimula a produção destas citocinas ao ativarem as CK e diminuírem o *clearance* hepático (48). Já as CHEs contribuem para a fibrose, produzindo TNF- α , IL-6, IL-8, quimiocinas e moléculas de adesão (49). A ativação de CHEs é importante para o processo da fibrogênese, visto que ela também leva à diminuição da expressão de inibidores de fator de transformação do crescimento β (TGF-1 β). Entretanto, os mecanismos envolvidos na promoção da fibrose através de TLR4, no fígado, ainda não estão totalmente elucidados.

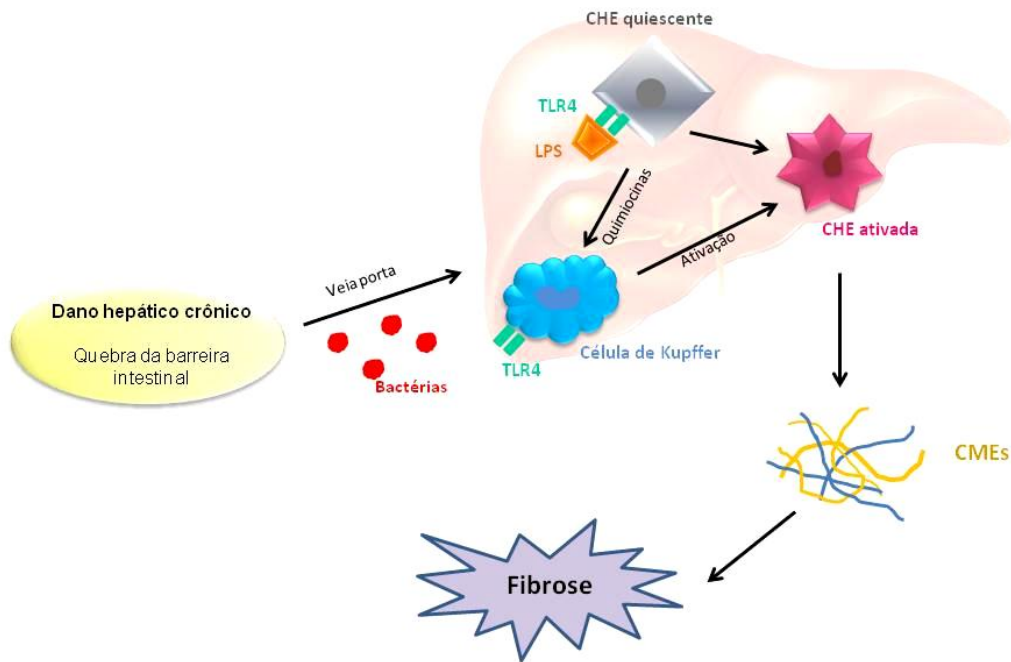


Figura 5. Mecanismos de ativação do sistema imune na fibrose hepática. O dano crônico leva à destruição da barreira intestinal, levando à liberação de toxinas bacterianas, como lipopolissacarídeo (LPS), do microbioma intestinal até a circulação através da veia portal. O LPS ativa os receptores tipo Toll 4 (TLR4) nas células hepáticas estreladas quiescentes (CHE), que, então, vão produzir quimiocinas e atrair células de Kupffer. As CHEs ativadas tornam-se muito sensíveis a citocinas produzidas pelas células de Kupffer e começam a secretar componentes da matriz extracelular (CMEs), principalmente o colágeno, resultando, então, na fibrose (16).

Probióticos

O trato gastrointestinal possui um ecossistema de micro-organismos (microbiota) bastante diverso e complexo. A microbiota normal pode ser definida como todas as espécies desse sistema que estão envolvidas numa relação simbiótica com o hospedeiro. A sua composição varia, entre outros fatores, conforme a localização no trato digestivo e a idade dos indivíduos (44). Os hábitos alimentares, o estresse, a presença de doenças e o uso de medicamentos também podem alterar a composição da microbiota intestinal (40). No estômago e no

intestino delgado, o ambiente é desfavorável para a colonização e proliferação bacteriana, que é reduzida pela ação bactericida do suco gástrico, da bile, da secreção pancreática, e pelo intenso peristaltismo do intestino delgado. O cólon é o local onde as bactérias encontram condições mais favoráveis, devido ao abundante suprimento nutricional (50).

A importância da conservação de uma microbiota intestinal saudável é de extrema importância para o desempenho de diversas funções fisiológicas e, por isso, recentemente tem se dado especial atenção ao potencial de probióticos como possíveis agentes preventivos e terapêuticos. Probióticos são micro-organismos vivos (bactérias ou leveduras) que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios para a saúde do hospedeiro (*Food and Agriculture Organization of United Nations; World Health Organization, 2002*). As bactérias mais frequentemente empregadas como probióticos são aquelas isoladas do trato gastrointestinal de seres humanos saudáveis. Os probióticos comumente utilizados pertencem às espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus lactis* e algumas espécies de *Enterococcus* (51).

Os principais mecanismos de ação dos probióticos são: regulação da microbiota intestinal, imunomodulação e proteção da barreira intestinal (52). Como exemplo de regulação da flora intestinal, pode-se citar o fato de que esses micro-organismos têm a capacidade de aumentar a concentração de bactérias benéficas e antagonizar as patogênicas, reduzindo o pH do lúmen intestinal e liberando peptídeos antimicrobianos. Além disso, eles podem competir por substratos necessários à sobrevivência e inibir a adesão de patógenos à mucosa do intestino (53). Para promover um aumento na função da barreira intestinal, os probióticos podem aumentar a síntese de muco e reforçar as *tight junctions* existentes entre as células epiteliais presentes nesse órgão, reduzindo a possibilidade de translocação bacteriana (53,54). Na Figura 6, estão demonstrados esses principais mecanismos de ação.

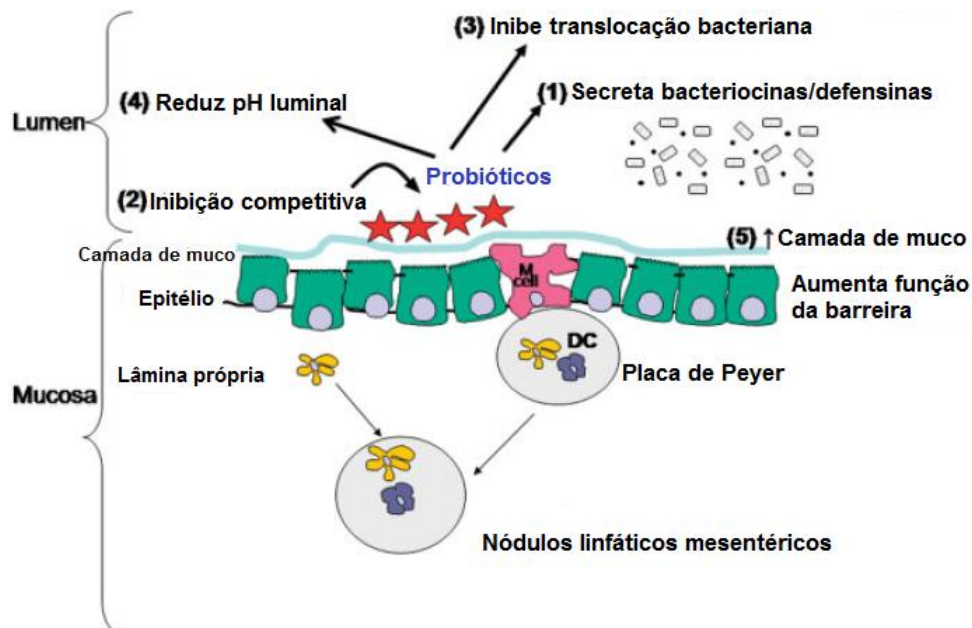


Figura 6. Principais mecanismos de ação dos probióticos. Os probióticos atuam, entre outros mecanismos, através de imunomodulação, redução do pH luminal, inibição de translocação bacteriana e secreção de bacteriocinas e defensinas (53).

É postulado tradicionalmente que para o uso de um probiótico, este deve, entre outros efeitos, apresentar efeito benéfico no hospedeiro; ser não-patogênico, não-tóxico e livre de efeitos adversos; ser capaz de sobreviver no trato gastrointestinal; estar presente em uma quantidade suficiente (55).

O probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia, isolado pela primeira vez de fezes humanas em 1985. O LGG foi descrito inicialmente como a subespécie *rhamnosus* do *Lactobacillus casei*. No entanto, os pesquisadores Sherwood Gorbach e Barry Goldin observaram que a cepa GG (Gorbach Goldin), diferente de outras espécies ácido lácticas, não era capaz de fermentar lactose, maltose e sacarose (56). Essa característica permite a utilização do teste de fermentação de lactose para sua identificação (57). Outras características do LGG incluem crescimento preferencial em ambiente anaeróbico, produção de substâncias antibacterianas e fermentação de xilose, trealose, sorbitol, manitol, glicose, frutose entre outros (56). O LGG demonstrou melhor tolerância às condições no trato digestivo quando comparado a outras cepas de probióticos,

possuindo boa capacidade de aderir e colonizar a mucosa intestinal (58). Do mesmo modo, Alander e colaboradores demonstraram que essa cepa de *Lactobacillus* foi capaz de permanecer aderido à mucosa intestinal em humanos por mais de uma semana após o fim da sua administração (57).

Modelo de ligadura do ducto biliar

O modelo de ligação do ducto biliar (LDB) é um clássico modelo animal para o desenvolvimento de cirrose biliar secundária. Ele vem sendo utilizado para diversos estudos, incluindo colestase hepática e fibrogênese (59). Sua técnica requer uma laparotomia mediana ventral e isolamento do ducto biliar comum, acima do duodeno, seguida por uma dupla ligação do ducto biliar e dissecação entre essas ligaduras. Devido à prolongada obstrução da via biliar extra-hepática, há o desenvolvimento progressivo de fibrose que culmina em cirrose biliar. Neste modelo, os animais desenvolvem um quadro de hepatopatia muito semelhante ao dos pacientes que sofrem de cirrose biliar secundária, apresentando icterícia, hipertensão porta, translocação bacteriana, ativação do sistema imunológico, hiperamonemia e encefalopatia hepática (60,61).

A obstrução biliar encontrada nesse modelo, além de aumentar a pressão nos ductos e impedir o acesso das substâncias excretadas na bile ao trato intestinal superior, causa uma elevação de bilirrubina, fosfatase alcalina e ácidos biliares (60). O acúmulo de sais biliares hidrofóbicos tóxicos no interior dos hepatócitos, decorrente do refluxo da bile em direção ao fígado, desencadeia uma reação inflamatória, fibrose periductular e necrose de hepatócitos, o que ocasiona a liberação de transaminases do interior das células hepáticas (62). Desta forma, o modelo acima descrito é uma ferramenta experimental relevante, pois mimetiza o quadro clínico de pacientes com cirrose secundária a colestase crônica, sendo um modelo aceitável para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos da doença, assim como de possíveis estratégias terapêuticas.

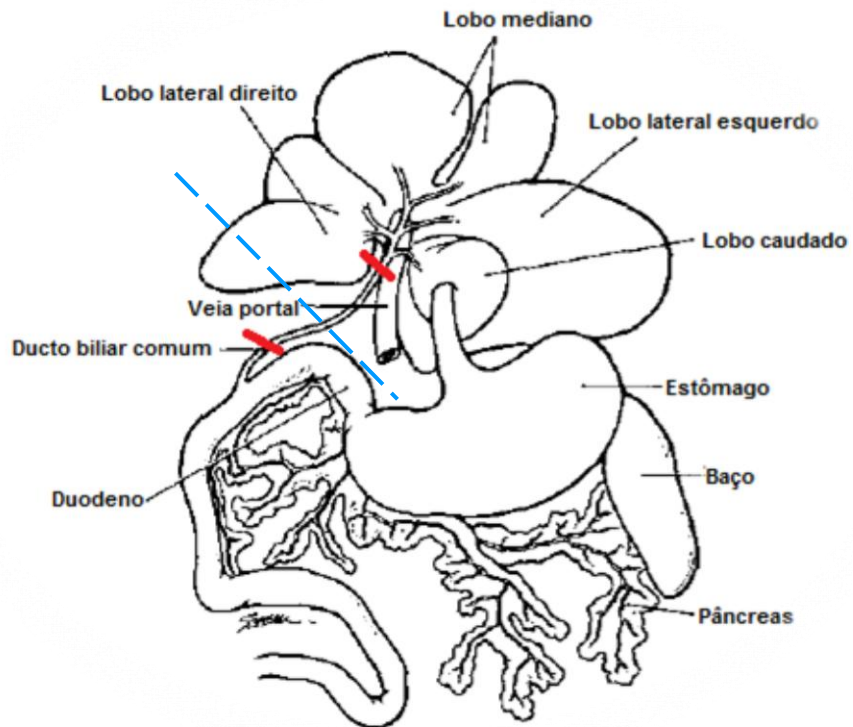


Figura 7. Esquema da anatomia do sistema entero-hepático de ratos e cirurgia de ligadura do ducto biliar (LDB). A cirurgia de LDB é feita através de duas ligaduras: uma superior próxima aos ductos hepáticos; e uma inferior, próxima aos ductos pancreáticos. Após, é feita a transecção do ducto biliar comum entre essas duas ligaduras (60).

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o efeito do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG sobre parâmetros inflamatórios no fígado de ratos submetidos ao modelo de ligadura do ducto biliar (LDB).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do tratamento da hepatopatia colestática crônica com probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG através da análise da expressão gênica das citocinas TNF- α e interleucina 1 β no fígado dos ratos.
- Avaliar a ativação de receptores TLR4 através da análise de sua expressão gênica.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

O presente trabalho será apresentado conforme as normas da revista *Annals of Hepatology*.

EFEITO DO *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG* SOBRE A INFLAMAÇÃO EM FÍGADO DE RATOS SUBMETIDOS À LIGADURA DO DUCTO BILIAR

Thayssa Dalla Costa Escobar¹, Thais Ortiz Hammes^{1,2}, Fabíola Schons Meyer³, Renata Leke¹, Themis Reverbel da Silveira^{1,3,4}

1. Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia. Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. 90035-903 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
2. Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
3. Unidade de Experimentação Animal, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
4. Programa de Pós-Graduação Saúde da Criança e do Adolescente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.ⁱ

Palavras-chave: fibrose, probióticos, expressão gênica.

Informações para contato com o autor correspondente:

Thayssa Dalla Costa Escobar,

Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia,

Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Avenida Ramiro Barcelos, 2350 Porto Alegre – RS – Brasil

CEP: 90035-903

Telefone: 55 51 33598847

E-mail: thayssadcescobar@gmail.com

Apoio financeiro:

Este estudo foi apoiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

RESUMO

Introdução: A inflamação é um processo significativo em doenças hepáticas crônicas. A colestase extra-hepática do modelo de ligadura do ducto biliar (LDB) determina um estado inflamatório do fígado, que poderia ocorrer devido à ativação de receptores do tipo Toll. Probióticos são bactérias comensais e acredita-se que atuem através de imunomodulação, podendo reduzir a inflamação hepática.

Objetivo: avaliar o efeito do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), no processo inflamatório, através da análise da expressão gênica de TNF- α , IL-1 β e TLR4 em fígado de ratos submetidos ao modelo de LDB. **Animais e Métodos:** 12 ratos machos *Wistar* submetidos à LDB e outros 12 animais “sham-operados”. Duas semanas após a cirurgia, metade dos animais controle e LDB receberam dose diária de LGG de $2,5 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia durante 4 semanas, enquanto a outra metade recebeu PBS 1%. Após a eutanásia, os fígados foram coletados para análise de expressão gênica de TNF- α , IL-1 β e TLR4. **Resultados:** não houve alteração de expressão gênica de TLR4 e IL-1 β entre os grupos. Entretanto, os grupos LDB e LDB P apresentaram níveis de TNF- α significativamente maiores do que os controles ($p < 0,05$). **Conclusão:** Os parâmetros inflamatórios nos grupos submetidos à LDB não foram alterados pelo LGG ao final de 6 semanas. Os níveis de expressão gênica de TLR4 não foram diferentes entre os grupos.

INTRODUÇÃO

A cirrose é uma hepatopatia crônica consequente a um dano hepático, caracterizada histologicamente pela presença de nódulos regenerativos, ilhas de hepatócitos circundados por fibrose [1]. A fibrose hepática, encontrada na cirrose, resulta da propagação da resposta de cicatrização derivada da contínua produção e deposição do tecido conectivo de matriz extracelular [1]. Ela representa um estágio dinâmico que resulta do processo de desequilíbrio entre dano (necrose celular), resposta ao dano (fibrose) e tentativa de regeneração (formação de nódulos) [2].

Pacientes cirróticos muitas vezes apresentam reduzidas motilidade intestinal e secreção de ácido gástrico, podendo acarretar supercrescimento bacteriano [3]. Além disso, a permeabilidade intestinal também se encontra aumentada, favorecendo a passagem de patógenos para fora do lúmen intestinal e o aumento de endotoxinas no sangue portal [4]. A translocação bacteriana para espaços extra-intestinais, tais como linfonodos mesentéricos, fígado e baço, ocasionam a inflamação [5 – 8].

Uma das endotoxinas envolvidas na ativação da inflamação e fibrose hepática é o lipopolissacarídeo (LPS), componente estrutural da parede celular de bactérias Gram-negativas. No fígado, o LPS leva à ativação de células hepáticas estreladas (CHEs) e células de Kupffer (CK), através principalmente de sua ligação com receptores tipo Toll (TLR) [9].

TLRs são receptores transmembrana que reconhecem moléculas derivadas de patógenos (componentes estruturais de bactérias, fungos e vírus) e ativam a resposta inflamatória através da produção de citocinas [10]. Dentre esses

receptores, o TLR4 desempenha um papel fundamental na ativação do sistema imune em resposta ao LPS, através da ligação desse componente bacteriano a co-receptores do TLR4 para a posterior ativação desse receptor [11].

Peritonite bacteriana espontânea e bacteremia são importantes complicações da cirrose, indicando que a translocação bacteriana é um dos principais contribuintes para a alta mortalidade e morbidade dessa doença. [12, 13]. Os antibióticos podem eficientemente diminuir a incidência dessas complicações através do seu efeito sobre a microbiota intestinal [3, 4]. Porém, a sua administração pode estar relacionada com o desenvolvimento de resistência bacteriana e dano renal [14, 15] e justifica-se a procura por terapêuticas alternativas que diminuam a translocação bacteriana [16].

Probióticos são micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios para a saúde do hospedeiro. Eles atuam sob diversos mecanismos, incluindo regulação do pH intestinal, imunomodulação e inibição da translocação bacteriana [17]. Dentre eles, o *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) demonstrou melhor tolerância às condições no trato digestivo quando comparado a outras cepas de probióticos, possuindo boa capacidade de aderir e colonizar a mucosa intestinal [18]. Em um estudo experimental de indução de cirrose por CCl₄ e fenobarbital, foi observado que ratos tratados com a combinação de probióticos VSL#3 apresentaram menor incidência de ascite, translocação bacteriana e menores níveis de TNF- α após 20 semanas de indução da cirrose [19]. Utilizando a mesma combinação de probióticos, Loguercio e colaboradores observaram que houve uma diminuição nos níveis plasmáticos de TNF- α , IL-6 e IL10 em pacientes com cirrose de etiologia alcoólica após 30 dias de

tratamento [20]. Nesse cenário, a modulação da microbiota intestinal parece representar um aspecto promissor no manejo da fibrose e inflamação hepática.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo é avaliar o efeito do probiótico do tipo *Lactobacillus rhamnosus* GG sobre a expressão gênica de TNF- α , IL-1 β e TLR4 em ratos submetidos ao modelo de ligadura do ducto biliar (LDB).

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 24 ratos machos adultos da linhagem *Wistar* obtidos da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os animais foram alimentados com ração padrão e mantidos em gaiolas localizadas em um ambiente controlado (temperatura de 20°C \pm 2°C e ciclo de claro/escuro de 12h). Todos os procedimentos realizados durante os experimentos estão de acordo com o *National Guidelines on Animal Care* e foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Este trabalho está aninhado ao projeto de Pós-Doutorado da Dra. Renata Leke intitulado “Probiótico no tratamento da encefalopatia hepática em ratos com cirrose biliar secundária”.

Cirurgia de ligadura do ducto biliar comum

O modelo de LDB foi realizado conforme anteriormente descrito para ratos adultos [8] [21]. Os ratos foram anestesiados pela administração intraperitoneal de

quetamina (90 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg). Para a cirurgia, os animais foram mantidos na posição supina em uma placa térmica a 37°C para garantir a manutenção da temperatura corporal durante o procedimento. O ducto biliar comum foi, em seguida, isolado e duas ligaduras foram realizadas, utilizando-se fio seda 4-0, uma próxima à junção dos ductos biliares hepáticos e outra acima da junção com os ductos pancreáticos. Após, o ducto biliar foi seccionado entre essas duas ligaduras. A camada muscular abdominal foi suturada com pontos contínuos, e posteriormente a camada cutânea com pontos individuais utilizando fio de mononylon 4-0. Ao término da cirurgia, foi administrado, por via subcutânea, analgésico do tipo opióide tramadol (dose 5mg/kg) e os animais foram levados para incubadoras aquecidas com o intuito de evitar hipotermia, e permaneceram lá até retomarem a consciência. O grupo controle consistiu de animais que tiveram o ducto biliar comum isolado e manipulado, porém não foram realizadas as ligaduras. Todos os animais foram mantidos no mesmo ambiente durante 6 semanas após a cirurgia.

Grupos de animais e tratamento

Após a cirurgia, os animais foram alocados em 4 grupos: controle, controle + probiótico LGG (Controle P), LDB e LDB + probiótico LGG (LDB P). Cada grupo foi constituído por um total de 6 animais. Duas semanas após a cirurgia, iniciou-se o tratamento. Para os grupos tratados com probiótico, foi administrado diariamente 1mL de uma solução contendo $2,5 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia (UFC) de LGG. Os animais que não receberam probiótico foram tratados com solução veículo. Estes grupos receberam diariamente 1mL de PBS 1% (0,1 M tampão fosfato

contendo 23 mM Na₂HPO₄ e 77 mM NaH₂PO₄, pH 7,4). As soluções foram administradas por gavagem durante um período de 4 semanas.

Coleta das amostras

Na sexta semana após a cirurgia de LDB, os animais foram anestesiados através de administração intraperitoneal de quetamina (90 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg). Em seguida, foi realizada perfusão cardíaca com 50 ml de tampão fosfato gelado (0,1 M tampão fosfato contendo 23 mM Na₂HPO₄ e 77 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) e, então, os animais foram decapitados. Amostras do lobo mediano do fígado foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e subsequentemente armazenadas em freezer a -80°C para posteriormente serem processadas para os ensaios de expressão gênica.

Expressão gênica

O RNA total do fígado foi isolado pelo método de Trizol (Ambion[®], Life Technologies TM, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizada uma quantidade de 1,5 µg do RNA extraído para a realização da transcrição reversa, usando o kit *High Capacity cDNA reverse Transcription* (Invitrogen[™], Life Technologies[™], Carlsbad, CA, USA). As amostras de cDNA ficaram armazenadas em freezer -20°C até as suas análises. A expressão gênica foi realizada através da técnica de PCR Real-time. Esta foi feita como um ensaio multiplex em um StepOne[™] (Applied Biosystems[®], Life Technologies[™], Carlsbad, CA, USA) de 48 poços, utilizando-se *primers* específicos para TNF-α

(Rn01525859_g1), IL-1 β (Rn00580432_m1) e TLR4 (Rn00569848_m1). O gene constitutivo utilizado para todos os genes foi a β -actina (Rn00667869_m1). Cada reação foi composta por 5 μ L de TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies™, CA, USA), 0,5 μ L de *primers* TaqMan para ambos o gene alvo e para o controle endógeno e 2 μ L de cDNA que havia sido diluído 4 vezes para um volume total de reação de 10 μ L. As amostras foram pipetadas em triplicata e o programa para a reação de PCR foi 2 minutos a 50 °C, seguido de 10 minutos a 95 °C e, então, 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C. Os resultados foram calculados pelo método comparativo da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que fornece quantas vezes mais o gene alvo é expresso em relação ao gene constitutivo, relativos a um calibrador. O calibrador utilizado nesse estudo foi o grupo controle [22].

Análise estatística

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados como média \pm erro padrão ou mediana e intervalo interquartil. Os dados dos grupos estudados, cujos valores apresentaram distribuição Gaussiana e homocedasticidade, foram analisados por ANOVA de uma via, seguido do *post hoc* Tukey. Para aqueles que apresentaram heterocedasticidade, foi empregado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Para todos os parâmetros, o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). Os programas utilizados para o processamento das análises foram Excel 2007, GraphPad Prism 5.0 e SPSS 17.

RESULTADOS

Expressão Gênica de TNF- α , IL-1 β e TLR4

A expressão de TNF- α , no tecido hepático, foi significativamente maior nos grupos LDB e LDB + P, quando comparado aos grupos controles (controle $1,0693 \pm 0,1642$; controle P $0,9623 \pm 0,2084$; LDB $5,4681 \pm 1,6060$; LDB P $6,1151 \pm 1,8154$; $p < 0,05$, Figura 1A). Entretanto, não houve uma diferença significativa de expressão gênica de TNF- α entre o grupo LDB e o grupo LDB P. Quando analisados a expressão dos genes IL-1 β e TLR4, observou-se que não houve diferença significativa na expressão destas citocinas entre os quatro grupos (IL-1 β : controle $1,0608 \pm 0,1629$; controle P $0,8525 \pm 0,1482$; LDB $0,8880 \pm 0,1342$; LDB P $1,1747 \pm 0,2064$; Figura 1B. TLR4: controle $1,1278 \pm 0,2526$; controle P $1,007 \pm 0,1722$; LDB $1,5958 \pm 0,5653$; LDB P $1,7603 \pm 0,4331$; Figura 1C).

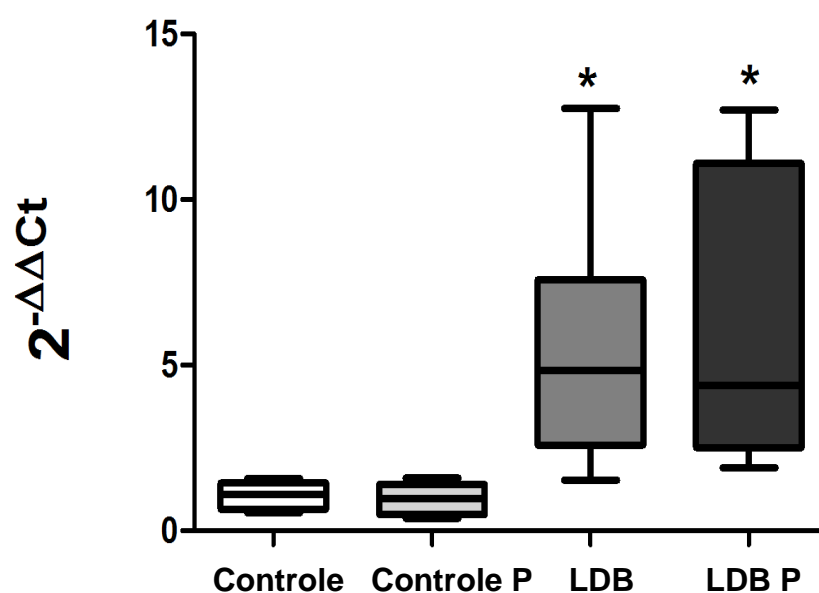


Figura 1A. Bloxplot da expressão hepática de mRNA TNF- α .

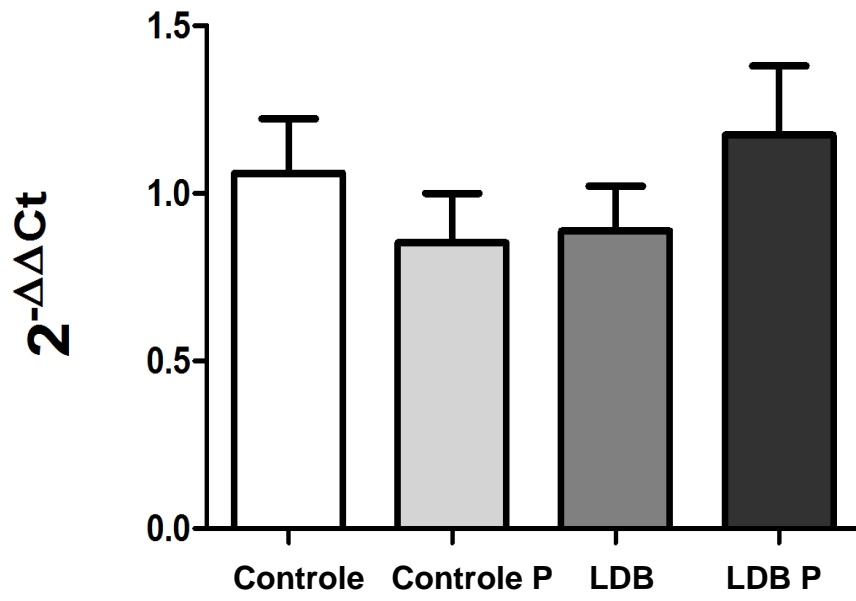


Figura 1B. Expressão hepática de mRNA IL-1 β .

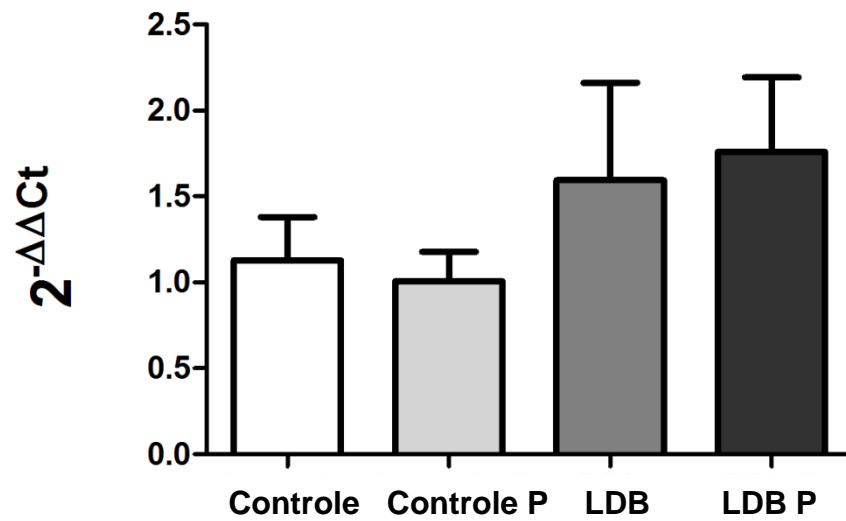


Figura 1C. Expressão hepática de mRNA TLR4.

DISCUSSÃO

A ligadura do ducto biliar é um modelo experimental já bem estabelecido utilizado para induzir colestase extra-hepática, juntamente com inflamação e fibrose [8]. A colestase desenvolvida interrompe o fluxo normal da bile para o intestino superior, acarretando um aumento prejudicial de sais biliares no interior dos hepatócitos e levando à ativação de rotas de sinalização inflamatória [23, 24].

O papel das citocinas pró-inflamatórias frente ao dano hepático é complexo, pois elas podem ser responsáveis tanto pelo estabelecimento e progressão da injúria e da fibrose, quanto podem participar da regeneração hepática. TNF- α e IL-1 β são responsáveis pela ativação das células hepáticas estreladas, que desempenham um importante papel na inflamação e na fibrose [25]. No presente estudo, observamos que os níveis de expressão de IL-1 β , nos ratos com doença hepática crônica, não estavam diferentes daqueles encontrados nos grupos controles. Contudo, Fernández-Martínez e colaboradores encontraram um aumento dessa citocina pró-inflamatória em fígado de ratos após 4 semanas submetidos ao mesmo modelo animal [26], e os nossos resultados foram obtidos ao final de 6 semanas. A diferença dos resultados encontrados pode ser devido aos distintos tempos avaliados entre os dois trabalhos. A expressão gênica desta citocina talvez esteja aumentada nas fases iniciais do processo colestático, o que corroboraria com a observação de Fernández-Martínez.

Com relação à expressão gênica de TNF- α , esta mostrou-se elevada nos grupos submetidos à ligadura do ducto biliar quando comparado aos grupos controles. De forma semelhante, Jover e colaboradores encontraram um aumento

significativo de TNF- α no soro de ratos LDB após 3 semanas da ligadura do ducto biliar [27]. Hsieh e colaboradores não observaram aumento dos níveis plasmáticos dessa citocina pró-inflamatória ao final de 10 semanas em ratos submetidos à LDB quando comparado ao grupo controle. Entretanto, foi encontrado aumento da expressão gênica de TNF- α no fígado desses animais [28]. Novamente, é importante considerar as diferenças dos delineamentos experimentais utilizados. O TNF- α também vem sendo associado com a necrose hepática, pois ele é encontrado aumentado local ou sistemicamente quando há necrose do fígado e aumento dos níveis séricos de transaminases [29]. No presente trabalho não foi avaliado a presença de necrose no tecido hepático.

Considerando que os TLRs indicam para o hospedeiro a presença de patógenos e de translocação bacteriana, investigamos se o TLR4 estaria envolvido na sinalização inflamatória do dano hepático na colestase crônica. Não foi encontrado diferença entre os níveis de expressão gênica de TLR4 entre os grupos. Em um trabalho de Huang e colaboradores, foi observado que ratos submetidos à LDB apresentaram níveis de expressão gênica de TLR4 no fígado significativamente maiores do que os grupos controles [30]. Entretanto, o tempo de avaliação desse estudo foi de apenas 2 semanas após o dano hepático, enquanto que, no nosso, esse período estendeu-se para 6 semanas. Hua e colaboradores avaliaram a cinética de ativação de TLR4 em modelo de fibrose induzida por CCl₄ e observaram que a expressão de mRNA aumentou até 6 semanas e, na oitava, esse nível decaiu [31]. Mesmo utilizado um modelo experimental diferente do empregado no presente trabalho, Hua e colaboradores encontraram uma diferença temporal de ativação do TLR4. Esse receptor talvez exerça um papel diferente ao longo da progressão da

doença. Desta forma, talvez o TLR4 apresente um perfil de ativação precoce, sendo ativado apenas nos estágios iniciais da lesão.

Sabe-se que probióticos apresentam a habilidade de modular a flora intestinal, bem como a resposta inflamatória [32]. Nesse estudo, foi avaliado o efeito do probiótico *Lactobacillus rhamnosus GG* sobre a resposta inflamatória no fígado decorrente de doença hepática crônica. O principal resultado encontrado foi que o uso de probiótico não foi capaz de atenuar os níveis de expressão gênica de TNF- α . Em relação a IL-1 β e TLR4, não foram encontradas diferenças entre os grupos. Bauer e colaboradores e Soriano & Guarner também não encontraram resultados promissores com essa cepa de probiótico em diferentes modelos de cirrose experimental [33, 34.] No presente estudo, a hipótese para o resultado encontrado é que possivelmente o estágio da doença hepática crônica, após 6 semanas da cirurgia de LDB, já esteja bastante avançado e o uso de probióticos não seria mais capaz de atenuar esse processo. Não se pode descartar a possibilidade de que a terapêutica com o LGG exerça alguma influência benéfica sobre a doença hepática crônica em estágios mais iniciais da doença.

Até o momento, não encontramos na literatura nenhum estudo avaliando o efeito do probiótico LGG sobre parâmetros inflamatórios após ligadura do ducto biliar. Desta forma, o presente estudo é original e verificou que o tratamento com o LGG não alterou o padrão de expressão de TNF- α , que se encontrava aumentado nos ratos com cirrose biliar secundária. Entretanto, são necessárias outras análises para determinar o estado da inflamação destes animais, como análise de expressão proteica das interleucinas hepáticas e séricas, assim como análise histológica do

fígado. Estamos atualmente trabalhando neste sentido, para melhor elucidar o papel do LGG na cirrose biliar secundária.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos cordialmente ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul pelo apoio financeiro que proporcionou a realização deste estudo.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Análise da expressão gênica de parâmetros inflamatórios no fígado.

O mRNA foi isolado de fígado dos quatro grupos (controle, controle P, LDB e LDB P) e submetido à reação reversa para a síntese de cDNA. A análise da expressão gênica foi realizada empregando ensaios multiplex de qPCR para os genes TNF- α (1A), IL-1 β (1B) e TLR4 (1C), utilizando o gene β -actina como controle endógeno. A análise dos resultados foi realizada através do método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Resultados são expressos como mediana e intervalo interquartilico (1A, boxplot apresentando os valores mínimo e máximo) ou média \pm erro padrão (1B e 1C). * $p < 0,05$ quando comparado aos grupos controles.

REFERÊNCIAS

- [1] Detlef Schuppan and Nezam H.Afdhal. Liver Cirrhosis. *Lancet*. 2008;371(9615):838–51.
- [2] Hardy SMD, Kleinman REMD. Liver Disease in Children [Internet]. Suchy FJ, Sokol RJ, Balistreri WF, editors. Cambridge: Cambridge University Press; 2007 [cited 2013 Nov 24]. p. 97–137.
- [3] Bellot P, Francés R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int*. [Internet]. 2013 Jan [cited 2013 Aug 31];33(1):31–9.
- [4] Guarner C, Soriano G. Bacterial translocation and its consequences in patients with cirrhosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol*. [Internet]. 2005 Jan;17(1):27–31.
- [5] Lata J, Jurankova J, Kopacova M, Vitek P. Probiotics in hepatology. *World J. Gastroenterol*. [Internet]. 2011 Jun 28 [cited 2013 Sep 28];17(24):2890–6.
- [6] Assimakopoulos SF, Tsamandas AC, Tsiaoussis GI, Karatza E, Triantos C, Vagianos CE, et al. Altered intestinal tight junctions' expression in patients with liver cirrhosis: a pathogenetic mechanism of intestinal hyperpermeability. *Eur. J. Clin. Invest*. [Internet]. 2012 Apr [cited 2013 Nov 24];42(4):439–46.
- [7] Benjamin J, Singla V, Arora I, Sood S, Joshi YK. Intestinal permeability and complications in liver cirrhosis: A prospective cohort study. *Hepatol. Res*. [Internet]. 2013 Feb [cited 2013 Nov 14];43(2):200–7.
- [8] Scott-Conner CE GJ. The pathophysiology of biliary obstruction and its effect on phagocytic and immune function. *J Surg Res*. 1994;57(2):316–36.
- [9] Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 Aug [cited 2013 Aug 14];7(8):425–36.

- [10] Guo J, Friedman SL. Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2010 Jan [cited 2013 Sep 28];3(1):21.
- [11] Seo YS, Shah VH. The role of gut-liver axis in the pathogenesis of liver cirrhosis and portal hypertension. 2012;337–46.
- [12] Madsen BS, Havelund T, Krag A. Targeting the gut-liver axis in cirrhosis: antibiotics and non-selective β -blockers. *Adv. Ther.* [Internet]. 2013 Jul [cited 2013 Nov 24];30(7):659–70.
- [13] Bajaj JS, O’Leary JG, Reddy KR, Wong F, Olson JC, Subramanian RM, et al. Second infections independently increase mortality in hospitalized patients with cirrhosis: the North American consortium for the study of end-stage liver disease (NACSELD) experience. *Hepatology* [Internet]. 2012 Dec [cited 2013 Nov 24];56(6):2328–35.
- [14] Fernández J, Acevedo J, Castro M, Garcia O, de Lope CR, Roca D, et al. Prevalence and risk factors of infections by multiresistant bacteria in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology* [Internet]. 2012 May [cited 2013 Nov 7];55(5):1551–61.
- [15] Almeida J, Galhenage S, Yu J, Kurtovic J, Riordan SM. Gut flora and bacterial translocation in chronic liver disease. *World J. Gastroenterol.* [Internet]. 2006 Mar 14;12(10):1493–502.
- [16] Jonkers D, Stockbrügger R. Review article: Probiotics in gastrointestinal and liver diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.* [Internet]. 2007 Dec [cited 2013 Nov 17];26 Suppl 2(August):133–48.
- [17] Ng SC, Hart a L, Kamm M a, Stagg a J, Knight SC. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm. Bowel Dis.* [Internet]. 2009 Feb [cited 2013 Sep 20];15(2):300–10.
- [18] Landersjö C, Yang Z, Huttunen E, Widmalm G. Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103). *Biomacromolecules* [Internet]. 2002;3(4):880–4.

- [19] Sánchez E, Boullosa A, Nieto JC, Vidal S, Mirelis B, Juárez C, et al. VSL#3 probiotic treatment decreases bacterial translocation and proinflammatory state in rats with experimental cirrhosis. *J. Hepatol.* [Internet]. Elsevier; 2012 Apr 1 [cited 2013 Nov 17];56:S268.
- [20] Loguercio C, Federico A, Tuccillo C, Terracciano F, D'Auria MV, De Simone C, et al. Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. *J. Clin. Gastroenterol.* [Internet]. 2005 Jul;39(6):540–3.
- [21] Leke R, Oliveira DL, Forgiarini LF, Escobar TDC, Hammes TO, Meyer FS, et al. Impairment of short term memory in rats with hepatic encephalopathy due to bile duct ligation. *Metab. Brain Dis.* [Internet]. 2013 Jun [cited 2013 Dec 1];28(2):187–92..
- [22] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* [Internet]. 2001 Dec [cited 2013 Sep 19];25(4):402–8.
- [23] Webster CR, Anwer MS. Cyclic adenosine monophosphate-mediated protection against bile acid-induced apoptosis in cultured rat hepatocytes. *Hepatology* [Internet]. 1998 May;27(5):1324–31.
- [24] Allen K, Jaeschke H, Copple BL. Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *Am. J. Pathol.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Jan [cited 2013 Aug 31];178(1):175–86.
- [25] Simpson KJ, Lukacs NW, Colletti L, Strieter RM, Kunkel SL. Cytokines and the liver. *J. Hepatol.* [Internet]. 1997 Dec;27(6):1120–32.
- [26] Eduardo Fernández-Martínez, Víctor Pérez-Álvarez VT, Mineko Shibayama PM. Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2006;58:49–58.
- [27] Jover R, Rodrigo R, Felipe V, Insausti R, Sáez-Valero J, García-Ayllón MS, et al. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-

- induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* [Internet]. 2006 Jun [cited 2013 Nov 10];43(6):1257–66.
- [28] Hsieh H-G, Huang H-C, Lee F-Y, Chan C-Y, Lee J-Y, Lee S-D. Kinetics of cytokine expression in cirrhotic rats. *J. Chin. Med. Assoc.* [Internet]. Elsevier Taiwan LLC and the Chinese Medical Association; 2011 Sep [cited 2013 Oct 13];74(9):385–93.
- [29] Bradham CA, Plümpe J, Manns MP, Brenner DA, Westbrook AM, Wei B, et al. Mechanisms of Hepatic Toxicity I. TNF-induced liver injury. *Am. Physiol. Soc.* 1998;275.
- [30] Huang Y-H, Wang P-W, Tiao M-M, Chou M-H, Du Y-Y, Huang C-C, et al. Glucocorticoid modulates high-mobility group box 1 expression and Toll-like receptor activation in obstructive jaundice. *J. Surg. Res.* [Internet]. Elsevier Inc; 2011 Sep [cited 2013 Oct 16];170(1):e47–55.
- [31] Hua J, Qiu DK, Li JQ, Li EL, Chen XY, Peng YS. Expression of Toll-like receptor 4 in rat liver during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury. *J. Gastroenterol. Hepatol.* [Internet]. 2007 Jun [cited 2013 Oct 16];22(6):862–9.
- [32] Wong VW, Martindale RG, Longaker MT, Gurtner GC. From germ theory to germ therapy: skin microbiota, chronic wounds, and probiotics. *Plast. Reconstr. Surg.* [Internet]. 2013 Nov [cited 2013 Nov 10];132(5):854e–61e.
- [33] Bauer TM, Fernández J, Navasa M, Vila J, Rodés J. Failure of *Lactobacillus* spp. to prevent bacterial translocation in a rat model of experimental cirrhosis. *J. Hepatol.* [Internet]. 2002 Apr;36(4):501–6.
- [34] Soriano G, Guarner C. Probiotics in cirrhosis: do we expect too much? *Liver Int.* [Internet]. 2013 Nov [cited 2013 Oct 16];33(10):1451–3.

4. CONCLUSÃO

Nesse trabalho, avaliamos o efeito que o probiótico *Lactobacillus rhmanosus* GG exerce sobre os parâmetros inflamatórios TNF- α e IL-1 β , além de sua implicação na ativação de receptores TLR4. Verificamos que apenas a expressão gênica de TNF- α apresentou-se alterada após a inflamação desenvolvida pela colestase extra-hepática. Entretanto, o seu aumento não foi atenuado pela administração de probiótico. A inflamação provavelmente não foi dependente da ativação de receptores TLR4, visto que os níveis de expressão hepática desse receptor não se mostrou diferente entre os grupos. Contudo, não descartamos que esse receptor seja ativado e exerça influência sobre o fígado em períodos mais precoces da colestase extra-hepática. Devido à falta de trabalhos similares e resultados divergentes, mais estudos são necessários para que possamos melhor elucidar não apenas os mecanismos pelos quais os probióticos atuam no organismo, assim como também o seu papel na inflamação hepática.

Esse estudo é inédito, visto que não foram encontrados trabalhos relacionando o papel de probióticos e a expressão gênica de parâmetros inflamatórios no fígado após a indução de colestase extra-hepática em ratos. Apesar de apenas os níveis de expressão gênica de TNF- α apresentarem-se alterados, outras análises são necessárias para melhor determinar o estado da inflamação destes animais. Pode-se realizar avaliação de interleucinas séricas e do tecido hepático, bem como a determinação de endotoxinas séricas, para a confirmação de translocação bacteriana. O estudo histológico do fígado também é muito importante, pois assim pode-se avaliar a presença de necrose tecidual como também deposição de fibras de colágeno. Estamos trabalhando neste sentido, para esclarecer tais dúvidas e elucidar o papel do LGG na cirrose biliar secundária.

5. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, pretendemos realizar análises de expressão proteica das interleucinas IL-1 β e TNF- α no fígado dos animais pela técnica *Western blot*. Além disso, realizaremos análises histológicas pelas colorações de hematoxilina e eosina (H&E), bem como por picrossírius, para que possamos respectivamente avaliar alterações na estrutura hepática e mensurar a fibrose.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Wallace K, Burt AD, Wright MC. Liver fibrosis. *Biochem. J.* [Internet]. 2008 May 1 [cited 2013 Aug 31];411(1):1–18.
2. Groszmann RJ, Abraldes JG. Portal Hypertension. *J. Clin. Gastroenterol.* 2005;39(April):125–30.
3. Detlef Schuppan and Nezam H.Afdhal. Liver Cirrhosis. *Lancet.* 2008;371(9615):838–51.
4. Hardy SMD, Kleinman REMD. Liver Disease in Children [Internet]. Suchy FJ, Sokol RJ, Balistreri WF, editors. Cambridge: Cambridge University Press; 2007 [cited 2013 Nov 24]. p. 97–137.
5. Neubauer K, Saile B, Ramadori G. Liver fibrosis and altered matrix synthesis. *Can. J. Gastroenterol.* [Internet]. 2001 Mar;15(3):187–93.
6. Sohrabpour a a, Mohamadnejad M, Malekzadeh R. Review article: the reversibility of cirrhosis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* [Internet]. 2012 Dec [cited 2013 Aug 31];36(9):824–32.
7. Starr SP, Raines D. Cirrhosis: diagnosis, management, and prevention. *Am. Fam. Physician* [Internet]. 2011 Dec 15;84(12):1353–9.
8. Centers for Disease Control and Prevention [Internet].
9. Martinelli ALC, Carneiro M V, Lescano MAL, Souza FF, Teixeira AC. Complicações agudas das doenças hepáticas crônicas. 2003;(3):294–306.
10. Bari K, Garcia-Tsao G. Treatment of portal hypertension. *World J. Gastroenterol.* [Internet]. 2012 Mar 21 [cited 2013 Nov 10];18(11):1166–75.
11. Giovanni Garini; Marco Delsante; Francesco Iannuzzella. Fisiopatologia dell'ipertensione portale e della ritenzione idrosalina nella cirrosi. *Recenti Prog Med.* 2011 Mar;102(3):134-40 [Internet].
12. Lalor PF, Lai WK, Curbishley SM, Shetty S, Adams DH. Human hepatic sinusoidal endothelial cells can be distinguished by expression of phenotypic markers related to their specialised functions in vivo. *World J. Gastroenterol.* [Internet]. 2006 Sep 14;12(34):5429–39.
13. Cox TR, Erler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis. Model. Mech.* [Internet]. 2011 Mar [cited 2013 Nov 8];4(2):165–78.
14. Rebecca G. Wells M [Assistant P of M. Cellular Sources of Extracellular Matrix in Hepatic Fibrosis Rebecca. *Clin. Liver Dis.* 2008;12(4):1–10.

15. Unanue ER. Ito cells, stellate cells, and myofibroblasts: new actors in antigen presentation. *Immunity* [Internet]. 2007 Jan [cited 2013 Aug 31];26(1):9–10.
16. Wick G, Grundtman C, Mayerl C, Wimpissinger T-F, Feichtinger J, Zelger B, et al. The immunology of fibrosis. [Internet]. *Annu. Rev. Immunol.* 2013 [cited 2013 Aug 14]. p. 107–35.
17. Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig. Liver Dis.* [Internet]. 2004 May [cited 2013 Aug 31];36(4):231–42.
18. Friedman SL. Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. *J. Biol. Chem.* [Internet]. 2000 Jan 28 [cited 2013 Sep 28];275(4):2247–50.
19. Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 Aug [cited 2013 Aug 14];7(8):425–36.
20. Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008;134(6):1655–69.
21. Friedman SL. The Cellular Basis of Hepatic Fibrosis -- Mechanisms and Treatment Strategies. *N Engl J Med.* 1993;328:1828–35.
22. Li DAN, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells : *New.* 1999;(February):618–33.
23. Fallowfield J a, Mizuno M, Kendall TJ, Constandinou CM, Benyon RC, Duffield JS, et al. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J. Immunol.* [Internet]. 2007 Apr 15;178(8):5288–95.
24. Forbes SJ, Parola M. Liver fibrogenic cells. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* [Internet]. 2011 Apr [cited 2013 Sep 28];25(2):207–17.
25. Wells RG. Mechanisms of liver fibrosis: New insights into an old problem. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* [Internet]. 2006 Dec [cited 2013 Sep 28];3(4):489–95.
26. Jingjing Jiao, Scott L. Friedman and CA. Hepatic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009;25(3):223–9.
27. Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 Aug [cited 2013 Sep 28];7(8):425–36.
28. Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* [Internet]. 2006 Feb [cited 2013 Nov 8];43(2 Suppl 1):S54–62.

29. Knolle P a, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol. Rev.* [Internet]. 2000 Apr;174:21–34.
30. Tacke F, Luedde T, Trautwein C. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* [Internet]. 2009 Feb [cited 2013 Sep 16];36(1):4–12.
31. And CO, Doherty DG. Innate Immune Mechanisms in the Liver. *Liver Immunol.* 2007;(4):41–8.
32. Wynn TA, Ph D, Barron L. Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin Liver Dis.* 2010;30(3):245–57.
33. Gores HM and GJ. Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury. *Gastroenterology.* 2008;134(6):1641–54.
34. Tilg H. Cytokines and liver diseases. *Can. J. Gastroenterol.* 2001;15(10):661–8.
35. Szabo G, Ph D, Mandrekar P, Dolganiuc A. Innate Immune Response and Hepatic Inflammation. *Semin Liver Dis.* 2007;27(4):339–50.
36. Rehermann GA and B. Hepatic NK, NKT, and T Cells. *Liver Immunol. Princ. Pract.* 2007;71–82.
37. Gorham JD. Adaptive Immunity in the Liver. *Liver Immunol. Princ. Pract.* 2007;61–70.
38. Tanaka H, Leung PSC, Kenny TP, Gershwin ME, Bowlus CL. Immunological orchestration of liver fibrosis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* [Internet]. 2012 Dec [cited 2013 Aug 29];43(3):220–9.
39. Bradham CA, Plümpe J, Manns MP, Brenner DA, Westbrook AM, Wei B, et al. Mechanisms of Hepatic Toxicity I. TNF-induced liver injury. *Am. Physiol. Soc.* 1998;275.
40. Seo YS, Shah VH. The role of gut-liver axis in the pathogenesis of liver cirrhosis and portal hypertension. 2012;337–46.
41. Bellot P, Francés R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int.* [Internet]. 2013 Jan [cited 2013 Aug 31];33(1):31–9.
42. Abt MC, Artis D. The intestinal microbiota in health and disease: the influence of microbial products on immune cell homeostasis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* [Internet]. 2009 Nov [cited 2013 Sep 19];25(6):496–502.
43. Jover R, Rodrigo R, Felipo V, Insausti R, Sáez-Valero J, García-Ayllón MS, et al. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-

- induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* [Internet]. 2006 Jun [cited 2013 Nov 10];43(6):1257–66.
44. Lata J, Jurankova J, Kopacova M, Vitek P. Probiotics in hepatology. *World J. Gastroenterol.* [Internet]. 2011 Jun 28 [cited 2013 Sep 28];17(24):2890–6.
 45. Garcovich M, Zocco MA, Roccarina D, Ponziani FR, Gasbarrini A. Prevention and treatment of hepatic encephalopathy: Focusing on gut microbiota. 2012;18(46):6693–700.
 46. Kitazawa T, Tsujimoto T, Kawaratani H, Fujimoto M, Fukui H. Expression of Toll-like receptor 4 in various organs in rats with D-galactosamine-induced acute hepatic failure. *J. Gastroenterol. Hepatol.* [Internet]. 2008 Aug [cited 2013 Sep 28];23(8 Pt 2):e494–8.
 47. Wu J, Meng Z, Jiang M, Zhang E, Trippler M, Broering R, et al. Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific. *Immunology* [Internet]. 2009 Mar [cited 2013 Sep 28];129(3):363–74.
 48. Guo J, Friedman SL. Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2010 Jan [cited 2013 Sep 28];3(1):21.
 49. Paik Y-H, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C, Brenner D a. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* [Internet]. 2003 May [cited 2013 Sep 28];37(5):1043–55.
 50. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *Lancet* [Internet]. 2003 Feb 8;361(9356):512–9.
 51. Morrow LE, Gogineni V, Malesker M a. Probiotic, prebiotic, and synbiotic use in critically ill patients. *Curr. Opin. Crit. Care* [Internet]. 2012 Apr [cited 2013 Sep 28];18(2):186–91.
 52. Correia MITD, Liboredo JC, Consoli MLD. The role of probiotics in gastrointestinal surgery. *Nutrition* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012 Mar [cited 2013 Sep 28];28(3):230–4.
 53. Ng SC, Hart a L, Kamm M a, Stagg a J, Knight SC. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm. Bowel Dis.* [Internet]. 2009 Feb [cited 2013 Sep 20];15(2):300–10.
 54. Ulluwishewa D, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Wells JM, Roy NC. Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components 1 , 2. *J Nutr.* 2011;141(5):769–76.

55. Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Muñoz-Quezada S, Gil A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br. J. Nutr.* [Internet]. 2013 Jan [cited 2013 Sep 28];109 Suppl S35–50.
56. Silva M, Jacobus N V, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* [Internet]. 1987 Aug;31(8):1231–3.
57. Alander M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T, et al. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl. Environ. Microbiol.* [Internet]. 1999 Jan;65(1):351–4.
58. Landersjö C, Yang Z, Huttunen E, Widmalm G. Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103). *Biomacromolecules* [Internet]. 2002;3(4):880–4.
59. Leke R, Oliveira DL, Forgiarini LF, Escobar TDC, Hammes TO, Meyer FS, et al. Impairment of short term memory in rats with hepatic encephalopathy due to bile duct ligation. *Metab. Brain Dis.* [Internet]. 2013 Jun [cited 2013 Dec 1];28(2):187–92.
60. Scott-Conner CE GJ. The pathophysiology of biliary obstruction and its effect on phagocytic and immune function. *J Surg Res.* 1994;57(2):316–36.
61. Butterworth RF, Norenberg MD, Felipo V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int.* [Internet]. 2009 Jul [cited 2013 Sep 28];29(6):783–8.
62. Webster CR, Anwer MS. Cyclic adenosine monophosphate-mediated protection against bile acid-induced apoptosis in cultured rat hepatocytes. *Hepatology* [Internet]. 1998 May;27(5):1324–31.

7. ANEXOS



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

General information

ANNALS OF HEPATOLOGY publishes original research on the biology and diseases of the liver in both humans and experimental models. Contributions may be submitted as regular articles. The journal also publishes concise reviews of both basic and clinical topics. Authors interested in contributing reviews are requested to first contact the Editor or one of the Associate Editors with an outline of the proposed article.

Clinical case reports are considered if they provide significant new information on a specific disease. Letters to the Editor may be subjected to peer review and undergo editing for clarity and brevity.

The journal publishes only in English. Authors lacking facility with English syntax should seek the appropriate editorial assistance prior to submitting their manuscript. Material requiring major editorial work will be returned without review.

Authors must submit a complete electronic copy of the manuscript, including tables and figures, to the e-mail address below, prepared as specified further down. Submissions should be sent with a cover letter from the corresponding author to:

Nahum Mendez-Sánchez, M.D., PhD
Editor,
ANNALS OF HEPATOLOGY
Puente de Piedra 150, Colonia Toriello Guerra
CP 14040, Mexico, D.F., MEXICO
Telephone: (525) 606-6222 ext. 4215
Fax: (525) 666-4031
nmendez@medicasur.org.mx

The journal uses anonymous peer review in evaluating manuscripts for publication. Manuscripts the Editors think are incomplete or unlikely to be accepted will be returned to the authors as an Early Reject without a full peer review. The Editors allow a single resubmission only after the initial disposition, which should be received within 4 months from the time of receipt of the initial disposition letter. A manuscript requiring more than a single revision or returned beyond 4 months will be considered a new submission. All submitted materials remain in the Editorial Office.

Copyright of all material published in **ANNALS OF HEPATOLOGY** is vested in Fundación Clínica Médica Sur. Copyright Assignment form (which follows these guidelines) signed by all authors must accompany all manuscripts. Statements and opinions expressed in the articles and communications in **ANNALS OF HEPATOLOGY** are those of the author(s) and not necessarily those of the Editor(s) or publisher, and the Editor(s) and publisher disclaim any responsibility or liability for such material. Neither the Editor(s) nor the publisher guarantees, warrants, or endorses any product or service advertised in the journal, nor do they guarantee any claim made by the manufacturer of such product or service.

Cover letter

Any material that could constitute prior or concurrent publication of similar data by any one of the authors should be submitted with the manuscript. Such material includes symposium proceedings, book chapters, invited papers, and the like.

Authors may suggest the names of reviewers whose expertise qualifies them to review the work. Any reviewers the authors wish to exclude may be listed along with the reason for exclusion. While all suggestions will be considered, the final choice of reviewers rests with the Editor or responsible Associate Editor.

It is assumed that the corresponding author speaks for his or her coauthors and certifies that all listed authors participated meaningfully in the study and that they have seen and approved the final manuscript. The letter should describe any commercial affiliation or consultancy of an author that could be construed as a conflict of interest with respect to the submitted data. If the Editor finds that such activities raise the appearance of a conflict, he may recommend disclosure in a footnote. Otherwise, the information will remain confidential.

Organization of the manuscript

Manuscripts describing original research should contain (in this order) a title page, a footnote page, an abstract, an introductory statement (without heading), a description of experimental procedures or methods, the results, a discussion and, on separate pages, a list of references, figure legends, and tables. Authors have the option of combining the results and discussion and are encouraged to do so for short manuscripts.

All manuscripts should be double-spaced throughout, including the footnote page, list of references, figure legends, and tables. All pages must be numbered in the upper right-hand corner, starting with the title page.

Original manuscripts must be no longer than 4,000 words (excluding references) and include no more than 50 references. Manuscripts that are redundant or contain extraneous material will be returned for shortening, even if otherwise acceptable. Concise Reviews should be no longer than 3,500 words and the reference list need not be exhaustive.

It is expected that submitted Case Reports will include a detailed analysis of the case and a review of the available literature. Only those case reports which are truly original and are likely to significantly influence medical practice are likely to be considered for publication.

Others may be considered for publication in an abbreviated form as a letter to the editor.

Letters to the editor which comment on articles recently published in **THE ANNALS OF HEPATOLOGY** are invited. Brief case reports or new findings may also be submitted and include a single supporting illustration. Letters should be double-spaced and less than 2 pages in length.

Title page

Provide a concise title of not more than 100 characters, not including spaces between words. In the case of work with experimental animals, indicate the species used. List the full names of the author(s). Indicate the institutional affiliation. In a multi-authored work involving more than a single institution, indicate individual affiliation by means of a superscript Arabic number. Indicate a change of address similarly. Provide a list of up to 5 key words that do not appear in the title itself.

Footnote page

List footnotes to the title page. Provide the contact information for the author to whom proofs should be sent (name, address, telephone number, fax number, and e-mail address). List abbreviations used with the expansions in the order of their mention in the paper. Finally, list grants and other financial support on this page.

Abstract

Abstracts should be continuous text organized as background and rationale for the study, main results, and conclusions. The total length should not exceed 250 words. The last section of the abstract should start with "In conclusion."

Introduction

Provide the minimum background information that will orient the general reader. Do not engage in a literature review.

Experimental Procedures

Provide a level of detail such that another investigator could repeat the work; for methods that are used without significant modification, citation of the original work will suffice.

Human subjects. For reports of research using human subjects, provide assurance that (a) informed consent in writing was obtained from each patient and (b) the study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975

Declaration of Helsinki as reflected in a priori approval by the appropriate institutional review committee. Refer to individual patients by number, not by initials.

Animal experimentation. In studies involving animal experimentation, provide assurance that all animals received humane care according to the criteria outlined in the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH publication 86-23 revised 1985).

Genetic sequence data. In papers reporting a novel DNA or amino acid sequence, verify that the data have been or will be submitted either to GenBank or EMBL, and provide the accession number. This information need not accompany the initially submitted manuscript but must be available for inclusion in the final publication. Accession numbers appear as footnotes to the text or in the relevant figure legend. It is understood that authors publishing in *ANNALS OF HEPATOLOGY* will make cloned DNA, hybridomas, mutant animals, and other resources available to qualified investigators.

Include the names and locations (city and state or country) of manufacturers when mentioning proprietary drugs, tools, instruments, software, etc.

Statistics. Identify and provide references for the statistical methods used. The legends of figures and tables should specify the number of observations and whether estimates of variance are SD or SE.

Results and Discussion

Present the major findings of the study in graphic form if practicable. Do not illustrate minor details if their message is conveyed adequately by simple descriptive text. Mention all tables and figures. In the discussion, concisely present the implications of the new findings for the field as a whole, minimizing repetition of the results, avoiding repetition of material in the introduction, and keeping a close focus on the specific topic of the paper.

Acknowledgment

Acknowledge personal assistance and providers of special reagents. Note that grant and other financial support is listed on the footnote page, not here.

References

Number references in the order cited as Arabic numerals in parentheses on the line. Only literature that is published or in press (with the name of the publication known) may be numbered and listed; abstracts and letters to the editor may be cited, but they must be less than 3 years old and identified as such. Refer to only in the text, in parentheses, other material (manuscript submitted, unpublished data, personal communication, and the like) as in the following example: (Chercheur X, unpublished data). If the owner of the unpublished data or personal communication is not an author of the manuscript under review, a signed statement is required verifying the accuracy of the attributed information and agreement to its publication. Do not use Endnote or other word processing tools that may embed references in code. Type reference numbers in parentheses within the text and type out the reference list as normal text at the end of the manuscript.

Use Index Medicus as the style guide for references and other journal abbreviations. List all authors up to seven, using seven and "et al." when the number is greater than seven.

Articles in journals

Miquel JF, Covarrubias C, Villaroel L, Mingrone G, Greco AV, Pughelli L, Carvallo P, et al. Genetic epidemiology of cholesterol cholelithiasis among Chilean Hispanics, Amerindians, and Maoris. *Gastroenterology* 1998;115:937-46

Books

2. Watson JD. *The Double Helix*. New York: Atheneum, 1968:1-6.

Book chapters

3. Hofmann AF: The enterohepatic circulation of bile acids in health and disease. In: Sleisenger MH, Fordtran JS, eds. *Gastrointestinal Disease*. Volume 1, 5th ed. Philadelphia: Saunders, 1993:127-150.

Permissions

Direct quotations, tables, or illustrations taken from copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the publisher and the original author. A standard permission request form is included in this section. The permission is presented as a footnote or addition to the legend and must provide complete information as to source. Photographs of identifiable persons must be accompanied by a signed release that indicates informed consent.

Abbreviations

Standard abbreviations not requiring definition can be found in the American medical Association Manual of Style. Do not abbreviate otherwise unless a term is used more than five times in the manuscript. In this case, the abbreviation should be spelled out, in parentheses, in its first use in the text and also listed on the footnote page (see previous page). Abbreviations used in figures or tables should be defined in the legend. Express temperatures as degrees Celsius and other measurements in SI units.

Drug names

Use generic names. The proprietary name may be mentioned in parentheses with the name and location (city and state or country) of the manufacturer.

Tables

Prepare tables on individual pages, double spaced and numbered consecutively with Arabic numerals in the order of their appearance in the text. Do not duplicate material presented in a figure.

Figure legends

Number figures with Arabic numerals in the order mentioned in the text. Provide a title (this should not appear on the figure itself) and sufficient explanation to render the figure intelligible without reference to the text. Explain all abbreviations and symbols. For any copyrighted material, indicate that permission has been obtained (see Permissions, above).

Figures

Images, graphics, tables, etc. should be provided, ideally, as files from the program in which they were made, indicating which program it was. Otherwise send them as separate jpg or tiff files in high resolution.

Cover photograph. Authors with accepted manuscripts (or accepted pending minor revision) may submit artwork for consideration for the cover. The material may be different from the figures used in the article but should represent its content. Single slides or color photographs are preferred, and multiple examples may be submitted. Individual photographs should be accompanied by a four- to five word caption and a two-sentence legend. Authors are not charged for a cover photograph.

File Organization and Formatting:

Most word-processing formats are acceptable (Microsoft Word, WordPerfect). Microsoft Word is preferred. If the program used is non-standard, the material should be provided also in text format on a separate disk, marked as "text file". Typographical formatting (column widths, type styles, etc.) will be handled by the publisher. Do not use this type of formatting. Editorial formatting (use of italics, superscripts, Greek letters, etc.) may be included in the disk file. The coding scheme for such elements must be consistent throughout the file.

Text Style

Type text flush left (do not indent paragraphs). Use two carriage returns at the end of a paragraph to separate it from the one that follows. Enter only one space between words and after sentences. Use 1 carriage return ("hard return") only after a heading and use 2 carriage returns at the end of a paragraph. Allow line breaks within a paragraph to be determined automatically by the word-processing program. If it is necessary to force the end of a line within a paragraph, use the program's "soft return" feature. Do not use the program's indenting or margin-setting features. (These will be added during typesetting.)

Copyright permission request form

From _____ Date _____

Dear Permission Editor/Author:

I am preparing for publication an article entitled:
to be published in _____

I hereby request your permission for the nonexclusive right to re-
print the following material:

Author/Editor: _____
Title of article or book: _____
Year of Publication: _____
Journal, Volume, and Issue (if applicable): _____
Material to be reproduced: _____
Page number(s) it appeared on: _____

Permission is sought to reprint the above material in all forms and
media now and hereafter known, in all languages, throughout the world
and to license such rights to others.

Sincerely yours,

I/We hereby grant permission to reprint the material(s) as provided
above.

Signed _____

Copyright assignment, authorship responsibility, financial disclo-
sure, and institutional review board/animal care committee approval

Article title: _____

Copyright Assignment. In consideration of the Fundación Clínica Médica Sur (FCMS) taking action to review and edit my submission, the undersigned authors, jointly and severally, hereby transfer, convey, and assign all right, title, and interest therein, including any and all copyrights in all forms and media now or hereafter known, to the FCMS. The authors retain the nonexclusive right to use all or part of the Article in future works of their own in a noncompeting way, provided proper copyright credit is given to the Foundation.

Should the FCMS not publish the aforesaid submission, the FCMS agrees to release its rights therein. (Note: material prepared by employees of the federal government in their official duties may not be copyrightable.) No guarantee is made that the Article will be published.

Authorship Responsibility. I, the undersigned author, certify that I have participated sufficiently in the intellectual content, the analysis of data, if applicable, and the writing of the Article, to take public responsibility for it. I have reviewed the final version of the Article, believe it represents valid work, and approve it for publication. As an author of this Article, I certify that none of the material in the manuscript has been published previously, is included in another manuscript, or is currently under consideration for publication elsewhere. I also certify that the Article has not been accepted for publication elsewhere, nor have I assigned any right or interest in the Article to any third party.

Financial Disclosure. I, the undersigned author, certify that I have no commercial associations (e.g., consultancies, stock ownership, equity interests, patent-licensing arrangements) that might pose a conflict of interest in connection with the submitted Article, except as disclosed on a separate attachment. All funding sources supporting the work and all institutional or corporate affiliations of mine are acknowledged in a footnote.

Institutional Review Board/Animal Care Committee Approval. I, the undersigned author, certify that my institution has approved the protocol for any investigation involving humans or animals and that all experimentation was conducted in conformity with ethical and humane principles of research.

Each author must sign and date this statement. In the case of a work made for hire, the employer must also sign.

Author Signature	Date
Author Signature	Date
Author Signature	Date
Author Signature	Date
Author Signature	Date
Author Signature	Date
Author Signature	Date
Author Signature	Date
Author Signature	Date
Employer signature (required for works made for hire):	
Signature	
Address manuscripts to: Nahum Méndez-Sánchez, M.D., PhD Editor, ANNALS OF HEPATOLOGY Puente de Piedra 150, Colonia Toriello Guerra CP 14040, Mexico, D.F., MEXICO nmendez@medicasur.org.mx	

AUTHOR'S CHECKLIST

- A completed checklist must accompany the manuscript. Failure to comply with directions may result in delay in review of your manuscript.
- Eliminate nonstandard abbreviations in titles.
- Supply full author names.
- Indicate institutional affiliations clearly.
- Identify corresponding author and supply accurate address, telephone number, fax number, and e-mail address, if available.
- Include written permission for any borrowed or modified figures or tables from the author and copyright holder.
- Make sure abstract does not exceed 250 words.
- Do not cite references, tables, or figures in the abstract.
- Supply statement in the "Materials and Methods" section regarding consent of human subjects and approval by ethics committee. If animals are used in experiments, use and indicate National Institutes of Health guidelines, U.S.A.
- Make sure text is clear, easy to follow, and legible.
- Make sure English is grammatically correct and idiomatic.
- Supply full manufacturer names and addresses (city and state or country) for all brand name products used in experiments.
- Supply references in the style of the journal authors (first seven names before the use of et al), title, journal, year, volume, and pages.
- Punctuation should follow ANNALS OF HEPATOLOGY style.
- Check that references are accurate and cited in the text in numerical order.
- Supply tables on separate pages; they should read vertically when possible and should have headings for each column.
- Cite tables in the text in numerical order. Use arabic numerals, not roman numerals.
- Do not cite materials submitted but not yet accepted for publication as references. Instead, cite in text.
- Make sure figures are of good quality.
- Cite figures in the text in numerical order.
- Include Author's Checklist and signed Copyright Assignment form with manuscript submission.