



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ANIELLE TORRES DE MELO

IRINOTECANO INDUZ ESTEATO-HEPATITE EXPERIMENTAL PELA
TRANSLOCAÇÃO DE BACTÉRIAS INTESTINAIS: EFEITO PROTETOR DE
PROBIÓTICOS

FORTALEZA

2018

ANIELLE TORRES DE MELO

IRINOTECANO INDUZ ESTEATO-HEPATITE EXPERIMENTAL PELA
TRANSLOCAÇÃO DE BACTÉRIAS INTESTINAIS: EFEITO PROTETOR DE
PROBIÓTICOS

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor (a) em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior (UFC).

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M485i Melo, Anielle Torres de.
Irinotecano induz esteato-hepatite experimental pela translocação de bactérias intestinais : efeito protetor de probióticos / Anielle Torres de Melo. – 2019.
107 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior.
1. Esteato-hepatite . 2. Irinotecano. 3. Microbiota intestinal. 4. Probióticos. I. Título.

CDD 615.1

ANIELLE TORRES DE MELO

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor (a) em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior (UFC).

Aprovada em: _____ / _____ / _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha
Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

Profa. Dra. Karoline Sabóia Aragão
Centro Universitário Estácio (FIC)

Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcelo Leite Vieira Costa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ao meu bom Deus.
Aos meus pais, Marlúcia e Torres.
Ao professor Ronaldo (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por ser o pilar que me sustenta, minha força e esperança.

Aos meus pais, Marlúcia e Torres, pelo amor incondicional, por terem me ensinado os princípios e valores fundamentais formadores de um ser humano, por todos os sacrifícios pra me darem uma educação de qualidade.

Ao Professor Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (*in memoriam*), pelo seu exemplo de amor e dedicação ao ensino e à pesquisa, que inspirava à todos aqueles que o rodeavam. Ainda que médico e professor brilhante, não perdia a essência e a humildade. Meus sinceros agradecimentos por ter me aceitado de braços abertos e ter me proporcionado fazer parte da família LAFICA.

Ao Professor Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior, por ter acolhido à mim e aos demais colegas do LAFICA quando mais precisamos, por ter sido corajoso e ter nos conduzido mesmo em um momento de dor, por fazer que o legado deixado pelo Prof. Ronaldo continuasse se perpetuando. Agradeço por todos os ensinamentos, toda a paciência, motivação e pela incessante vontade de ajudar e de nos impulsionar. Meu muito obrigada!

À Profa. Karoline Sabóia, por ter estado sempre ao meu lado durante todos esses anos de pós-graduação. Obrigada pelo grande auxílio no desenvolvimento desse trabalho, sempre se mostrando disponível em ajudar no que fosse necessário. Obrigada pela acolhida durante a minha chegada a laboratório, por todos os ensinamentos e pela amizade.

Ao Prof. Paulo Roberto, por todas as conversas agradáveis e por todas as indispensáveis avaliações histopatológicas.

À Profa. Cibele Barreto por nos dar todo o suporte estrutural e científico nas avaliações microbiológicas.

À Profa. Deysi por ter conzido as análises de Biologia Molecular, pelo convívio e gentileza com que trata à mim e aos demais alunos.

Ao Professor Murilo Anderson, por acreditar neste trabalho e sempre se mostrar disposto a auxiliar em seu desenvolvimento.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite e por todas as contribuições dadas à este trabalho.

Aos meus irmãos Evelyne, Yannara, George e Rafael, pela cumplicidade, companheirismo e por tornarem a minha caminhada mais leve e feliz!

À minha amiga Lívia Nobre, com quem compartilhei as angústias e incertezas da vida acadêmica, profissional e pessoal. Obrigada pela companhia no laboratório e fora dele, por compartilhar comigo a jornada rumo à realização de um sonho. Vou sentir muito a sua falta. Que a força esteja com você!

À minha amiga Camila Meirelles, por ter se revelado alguém tão parecido à mim, com a mesma alegria de viver e visão do mundo. Obrigada por ter uma sensibilidade vista em poucas pessoas, sensibilidade no ato de cuidar, de ajudar, mesmo que não peçamos. Sinto muitas saudades!

Ao amigo Carlos Wagner por todas as contribuições científicas essenciais para a construção desse trabalho, pelas conversas filosóficas durante os diversos momentos de descontração.

À minha amiga Lívia Talita (Kirida), sempre tão forte e assertiva em suas colocações. Você foi essencial durante a minha jornada, me dando forças e me segurando pela mão pra que eu conseguisse realizar meus objetivos. Muito obrigada pela sua amizade.

À amiga Ana Paula Macêdo, por todo o convívio quando fazia parte do LAFICA, fazendo do ambiente de trabalho um lugar tão feliz e agradável e pela valiosa amizade que se estendeu afora das paredes do laboratório.

À Venúcia (Vevé), por todo o auxílio no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e por compartilhar comigo sonhos e frustrações.

Aos amigos que fizeram e fazem parte do LAFICA, Camila Fernandes, Daniel Gurgel, Renata Falcão, Lucas Nicolau, Maraíza e Diego Bernarde pelos momentos agradáveis juntos e por tornar essa caminhada mais agradável.

À minha amiga irmã Lethícia Prado. A antipatia mútua que existia no período em que foi aluna de iniciação científica deu lugar ao amor fraterno. Obrigada por estar sempre ao meu lado, por querer minha felicidade, por ser meu exemplo.

À minha grande amiga Jéssica Andrade. A ligação do Prof. Ronaldo me indicando para trabalhar com uma aluna de Minas Gerais nunca se apagará da minha memória. De uma aluna

dedicada se tornou uma grande amiga. Obrigada pelos cafés no meio da tarde e por ser minha grande incentivadora.

À minha amiga irmã Fernanda Sousa. Obrigada por me amparar todas as vezes que eu achei que não tinha mais forças, por me apontar o caminho correto e por de forma intrigante sempre me procurar quando eu mais preciso.

À Gabriela Farias (veterinária), por ser tão prestativa, nos auxiliando nos experimentos e nos demais momentos em que precisei.

Aos técnicos de laboratório Vandinha, Adenilde (mainha), Júnior (morfologia) pela competência, organização e profissionalismo.

Às secretárias Laura e Célia pela gentileza e atenção com que sempre me atenderam.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FUNCAP.

RESUMO

Introdução: A esteato-hepatite não alcoólica (NASH) é uma síndrome causada pelo acúmulo de gordura e de células inflamatórias no fígado. Uma parcela significativa dos pacientes com câncer colorretal metastático tratados com irinotecano na adjuvância desenvolvem NASH, e esse efeito colateral limita a eficácia da intervenção cirúrgica. O consenso geral é de que a microbiota intestinal desempenha um papel fundamental na patogênese de NASH em diferentes modelos experimentais. Contudo, o seu envolvimento na NASH induzida por irinotecano ainda é desconhecido. Dessa forma, no presente estudo, objetivamos investigar a participação da microbiota intestinal na patogênese da NASH induzida por irinotecano.

Métodos: Inicialmente, camundongos C57BL/6 foram tratados com uma associação de antibióticos (metronidazol, ciprofloxacina, vancomicina e imipenem) na água de beber (50mg/kg/dia para cada antibiótico). No 10º dia após início da antibioticoterapia (ANTB), os animais foram tratados com irinotecano (50 mg/kg, 3x/semana por 5 ou 7 semanas, i.p.). Em outro protocolo, os camundongos foram tratados com solução salina ou irinotecano (50 mg/kg, 3x/semana por 5 semanas, i.p.) isoladamente ou em combinação com administração diária de suspensão probiótica (Simfort®, que contém *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium lactis*, 1×10^7 UFC/mL, v.o.). Após 5 ou 7 semanas, amostras de sangue periférico foram coletadas para avaliar a bacteremia, a atividade da ALT (U/L) e realizar a contagem de leucócitos totais. No fígado realizou-se análise histopatológica pelos escores de Kleiner (inflamação lobular, esteatose e balonização), de parâmetros inflamatórios (número focos neutrofilicos, níveis de IL-1 β e TNF- α , e expressão do receptor Toll-like 4 (TLR4) e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), acúmulo de lipídios e a translocação bacteriana. Amostras intestinais foram coletadas para avaliação histopatológica. Além disso, citometria de fluxo foi realizada para caracterização fenotípica das subpopulações de linfócitos esplênicos.

Resultados: A depleção bacteriana intestinal aboliu a bacteremia e a translocação bacteriana para o fígado relacionada à NASH induzida por irinotecano. Uma redução na atividade da ALT (IRI: 25,5 \pm 3,2 U/L; IRI+ANTB: 15,8 \pm 1,5 U/L), do dano hepático [IRI: 5(3-7); IRI+PRO: 3(1-7)], do acúmulo de lipídios no fígado (IRI: 49,9 \pm 2,5 mg/g; IRI+ANTB: 37 \pm 3,7 mg/g), aumento do peso úmido do fígado (IRI: 1962 \pm 165,3 mg/30g; IRI+ANTB: 1366 \pm 74,3 mg/30g) e na alteração da arquitetura intestinal [IRI: 9 (7-12); IRI+ANTB: 3 (2-6)] também foi observada no grupo tratado com ANTB quando comparado ao grupo tratado apenas com irinotecano. Além disso, a produção local de IL-1 β (IRI: 978 \pm 55,6 pg/mL; IRI+ANTB: 748 \pm 29 pg/mL), TNF- α (IRI: 1775 \pm 77 pg/mL; IRI+ANTB: 1565 \pm 28 pg/mL), a expressão de iNOS (IRI: 2,6 \pm 0,2; IRI+ANTB: 1,6 \pm 0,2), de TLR4 (IRI: 1,11 \pm 0,1; IRI+ANTB: 0,33 \pm 0,2) e acúmulo de células inflamatórias (IRI: 11,9 \pm 2,5; IRI+ANTB: 4,6 \pm 1,6) também foram reduzidos no grupo ANTB. Foi ainda observado que o uso de probióticos pode reduzir a diarreia (IRI: 1,5 \pm 0,4; IRI+PRO: 0,2 \pm 0,1), atenuar o dano hepático [IRI: 4,5(2-6); IRI+PRO: 3(2-3)] e intestinal [IRI: 10(7-12); IRI+PRO: 5(3-8)], além de reduzir o infiltrado de células inflamatórias induzidos por irinotecano (IRI: 7,6 \pm 2; IRI+PRO: 2,7 \pm 0,6). O acúmulo de lipídeos hepáticos (IRI: 49,4 \pm 2,5 mg/g; IRI+PRO: 38 \pm 4,3 mg/g), aumento da atividade de ALT (IRI: 63,2 \pm 7,6 U/I; IRI+PRO: 39,4 \pm 5,3 U/I) e da frequência (%) de células CD45⁺CD25⁺CCR6⁺ (IRI: 39,7 \pm 2,4;

IRI+PRO:32,2±1,8) no baço de animais também foram reduzidos pelos probióticos. Probióticos aumentam a % de linfócitos TCD4 esplênicos quando comparado ao grupo irinotecano (IRI: 29±3,3; IRI+PRO: 40±1,3). **Conclusão:** A translocação bacteriana intestinal para o fígado é um fator chave para o desenvolvimento da NASH induzida por irinotecano. Além disso, a modulação da microbiota por meio do uso de probióticos pode atenuar a NASH relacionada à esse quimioterápico. **Suporte financeiro:** CAPES, CNPq e FUNCAP.

Palavras-chave: Esteato-hepatite. Irinotecano. Microbiota intestinal. Probióticos.

ABSTRACT

IRINOTECAN INDUCES EXPERIMENTAL ESTEATO-HEPATITIS BY TRANSLOCATION OF INTESTINAL BACTERIA: PROTECTIVE EFFECT OF PROBIOTICS

Introduction: Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a syndrome caused by the accumulation of fat and inflammatory cells in the liver. A significant portion of patients with metastatic colorectal cancer treated with adjuvant-irinotecan therapy develops NASH and this side effect reduces the effectiveness of surgical intervention. The general consensus is that the intestinal microbiota plays a key role in the pathogenesis of different NASH models. However, its involvement in irinotecan-induced NASH is still unknown. Thus, in the present study, we aimed to investigate the participation of the intestinal microbiota in the pathogenesis of NASH induced by irinotecan. **Methods:** Initially C57BL/6 mice were treated with an antibiotic combination (metronidazole, ciprofloxacin, vancomycin and imipenem) in drinking water (50mg/kg/day). On the 10th day after initiation of antibiotic therapy (ANTB) the animals were treated with irinotecan (50 mg/kg, 3x/week for 5 or 7 weeks, i.p.). In other protocol, the mice were treated with either saline or irinotecan (50 mg/kg, 3x/week for 5 weeks, i.p.) alone or in combination with daily administration of probiotic suspension (Simfort®, containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium lactis*, 1×10^7 CFU/mL, v.o). After 5 or 7 weeks, peripheral blood samples were collected to assess bacteremia, to measure ALT (U/L) levels and to perform total leukocyte count. In the liver were analyzed the Kleiner scores (lobular inflammation, steatosis and ballooning), inflammatory parameters (number of neutrophilic foci, IL-1 β and TNF- α cytokines, and expression of Toll-like receptor 4 - TLR4 and nitric oxide synthase inducible - iNOS), lipid accumulation and bacterial translocation. Intestinal samples were collected for histopathological evaluation. Additionally, flow cytometry was performed to characterize the phenotype of splenic lymphocytes subpopulation. **Results:** Intestinal bacterial depletion abolished bacteremia and bacterial translocation to the liver related to irinotecan-induced NASH. In addition, a reduction in ALT serum levels (IRI: 25.5 ± 3.2 U/L, IRI+ANTB: 15.8 ± 1.5 U/L), number of inflammatory foci (IRI: 11.9 ± 2.5 ; IRI+ANTB: 4.6 ± 1.6), hepatic injury [IRI: 5 (3-7); IRI+PRO: 3(1-7)] accumulation of lipids in the liver (IRI: 49.9 ± 2.5 mg/g, IRI+ANTB: 37 ± 3.7 mg/g), and the alteration in the intestinal architecture [IRI: 9 (7-12); IRI+ANTB: 3 (2-6)] were also observed in the ANTB treated group vs. irinotecan group. In addition, local production of IL-1 β (IRI: 978 ± 55.6 pg/mL; IRI+ANTB: 748 ± 29 pg/mL), and TNF- α (IRI: 1775 ± 77 pg/mL; IRI+ANTB: 1565 ± 28 pg/ml), iNOS (IRI: 2.6 ± 0.2 ; IRI+ANTB: 1.6 ± 0.2) and TLR4 expression (IRI: 1.11 ± 0.1 ; IRI+ANTB: 0.33 ± 0.2), and increased moist liver weight were also reduced in the ANTB group (IRI: 1962 ± 165.3 mg/30g; IRI+ANTB: 1366 ± 74.3 mg/30g). Furthermore, it was observed that the use of probiotics reduce diarrhea (IRI: 1.5 ± 0.4 ; IRI+PRO: 0.2 ± 0.1), hepatic [IRI: 4.5 (2-6); IRI+PRO: 3 (2-3)] and intestinal damage [IRI: 10 (7-12); IRI+PRO: 5 (3-8)] and reduce inflammatory foci number (IRI: 7.6 ± 2 ; IRI+PRO: 2.7 ± 0.6) induced by

irinotecan. The hepatic lipids accumulation (IRI: 49.4 ± 2.5 mg/g, IRI+PRO: 38 ± 4.3 mg/g), increased ALT activity (IRI: 63.2 ± 7.6 U/L; IRI+PRO: 39.4 ± 5.3 U/L) and the CD45⁺CD25⁺CCR6⁺ frequency spleens cells (%) (IRI: 39.7 ± 2.4 ; IRI+PRO: 32.2 ± 1.8) were also reduced by probiotics. Probiotics increase the % of splenic TCD4 lymphocytes when compared to the irinotecan group (IRI: 29 ± 3.3 ; IRI+PRO: 40 ± 1.3). **Conclusion:** Intestinal bacterial translocation to the liver is a key factor for the development of irinotecan-induced NASH. Additionally, the modulation of the microbiota through the use of probiotics might attenuate the NASH associated to irinotecan based chemotherapy. **Financial support:** CAPES, CNPq and FUNCAP.

Keywords: Steatohepatitis. Irinotecan. Intestinal microbiota. Probiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição da estimativa de incidência e mortalidade dos diferentes tipos de cânceres no mundo.....	22
Figura 2- Manuseio de metástases hepáticas no câncer colorretal.....	25
Figura 3- Modelo hipotético do papel de IL-1, iNOS, TLR-4 e translocação bacteriana na patogênese da NASH induzida por irinotecano.....	29
Figura 4 - Protocolo experimental I.....	39
Figura 5 - Protocolo experimental II.....	41
Figura 6 - Graus de diarreia de acordo com a intensidade após tratamento com irinotecano em camundongos.....	42
Figura 7 - Eficácia da antibioticoterapia na manutenção da depleção da microbiota intestinal, na prevenção da bacteremia e do crescimento bacteriano no fígado ao longo de sete semanas de tratamento com irinotecano.....	52
Figura 8 - Efeito da antibioticoterapia sobre a leucopenia, aumento do peso úmido do fígado, alterações bioquímicas e perda ponderal após cinco ou sete semanas de tratamento com irinotecano.....	54
Figura 9 - Efeito da antibioticoterapia sobre as alterações histopatológicas no fígado após sete semanas de tratamento com irinotecano.....	57
Figura 10 - Efeito da antibioticoterapia sobre o infiltrado inflamatório e níveis de citocinas inflamatórias no fígado de animais após cinco ou sete semanas de tratamento com irinotecano.....	59
Figura 11 - Efeito da antibioticoterapia sobre as alterações histopatológicas no intestino após sete semanas de tratamento com irinotecano.....	61
Figura 12- Efeito da antibioticoterapia sobre a imunexpressão de receptor <i>Toll-like 4</i> no fígado e intestino de animais após sete semanas de tratamento com irinotecano.....	63
Figura 13 - Efeito da antibioticoterapia sobre a imunexpressão de iNOS no fígado de animais após cinco e sete semanas de tratamento com irinotecano.....	65
Figura 14 - Efeito da administração de probióticos sobre a variação de massa corpórea, contagem de leucócitos, grau de diarreia e peso úmido do fígado em animais tratados com irinotecano.....	67

Figura 15 - Efeito da administração de probióticos sobre a dosagem da enzima <i>Alanina aminotransferase</i> (ALT) e de lipídios totais no fígado de animais tratados com irinotecano.....	68
Figura 16 - Efeito da administração de probióticos sobre as alterações histopatológicas no fígado de animais tratados com irinotecano.....	70
Figura 17 - Efeito da administração de probióticos sobre os parâmetros inflamatórios no fígado de animais tratados com irinotecano.....	73
Figura 18 - Frequência de linfócitos T e B esplênicos em animais tratados com irinotecano.....	75
Figura 19 - Frequência de células CD45+C25+CCR6+, CD45+C25+CCR6-, e CD45+C25-CCR6+ esplênicas em animais tratados com irinotecano.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escores para avaliação do grau de diarreia em camundongos.....	43
Tabela 2 - Escores histopatológicos para análise do fígado.....	45
Tabela 3 - Escores histopatológicos para análise de intestino delgado.....	46
Tabela 4 - Detalhamento dos primers usados na reação de PCR.....	48
Tabela 5 - Eficácia da antibioticoterapia na depleção da microbiota intestinal.....	51
Tabela 6 - Efeito da antibioticoterapia sobre as alterações histopatológicas induzidas após cinco semanas de tratamento com irinotecano.....	56
Tabela 7 - Efeito da administração de probióticos sobre as alterações histopatológicas no intestino de animais tratados com irinotecano.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANTB	Antibióticos
IRI	Irinotecano
SAL	Salina
PRO	Probióticos
ALT	Alanina aminotransferase
BHI	Brain heart infusion
CD3	Cluster of differentiation 3
CD4	Cluster of differentiation 4
CD8	Cluster of differentiation 8
CD19	Cluster of differentiation 19
CD45	Cluster of differentiation 45
CD25	Cluster of differentiation 25
CCR6	Chemokine receptor 6
5-FU	5-Fluorouracil
C57BL/6	Camundongos imbred da espécie C57BL/6
CCR	Câncer coloretal
cDNA	DNA complementar
CPT-11	Irinotecano
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E.P.M	Erro padrão da média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme-linked immunosorbent assay)
FOLFIRI	Protocolo quimioterápico combinado de irinotecano, fluorouracil e ácido folínico + infusão contínua de fluorouracil por 2 dias
FOLFOX	Protocolo quimioterápico combinado de oxaliplatina, ácido folínico e fluorouracil em bolus + Fluorouracil em infusão contínua de 2 dias
H&E	Hematoxilina & Eosina
HTAB	Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio

i.p.	Intraperitoneal
v.o.	Via oral
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-17	Interleucina-17
IL-18	Interleucina-18
IL-8	Interleucina-8
iNOS	Óxido Nítrico sintase induzida
LPS	Lipopolissacarídeo
LTh17	Linfócito T Helper 17
LTreg	Linfócito T regulatório
mRNA	RNA mensageiro
MyD88	Fator de diferenciação mieloide 88 (Myeloid differentiation)
NASH	Esteato-hepatite não alcoólica
NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica
NF-k β	Fator de transcrição nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
SN38	7-etil-10-hidroxicamptotecina (metabólito ativo do Irinotecano)
SN38G	SN38 glicuronídeo
TLR2	Receptor Toll like tipo 2
TLR4	Receptor Toll like tipo 4
TLR9	Receptor Toll like tipo 9
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UGT1A1	Uridina 5' difosfato-glicuronosil-transferase

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kappa
-/-	Nocaute
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
g	Gramas
kg	Quilogramas
L	Litro
M	Molar (concentração)
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar (concentração)
μm	Micrômetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Câncer colorretal metastático.....	22
1.2. Uso do irinotecano (CPT-11) no tratamento do câncer colorretal metastático.....	23
1.3. Aspectos gerais da esteato-hepatite induzida por irinotecano	26
1.4. Papel da microbiota intestinal na patogênese da esteato-hepatite induzida por irinotecano.....	30
1.5. Probióticos.....	32
2. JUSTIFICATIVA.....	35
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. Objetivo geral.....	36
3.2. Objetivos específicos.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1. Drogas.....	37
4.2. Animais	37
4.3. Protocolos experimentais.....	37
4.3.1. Modelo de esteato-hepatite não alcoólica induzida por irinotecano.....	37
4.3.2. Tratamento com antibióticos.....	38
4.3.3. Tratamento com probióticos.....	40
4.4. Avaliação da depleção da microbiota intestinal, bacteremia e translocação bacteriana para o fígado após antibioticoterapia.....	41
4.4.1. Análise da depleção da microbiota intestinal.....	41
4.4.2. Análise da bacteremia e translocação bacteriana.....	41
4.5. Avaliação dos parâmetros gerais de indução de esteato-hepatite.....	42
4.5.1. Avaliação ponderal e peso úmido do fígado.....	42
4.5.2. Contagem de leucócitos totais.....	42
4.5.3. Avaliação do grau de diarreia.....	42
4.5.4. Dosagem da concentração plasmática de alanina aminotransferase.....	44
4.5.5. Determinação de lipídeos no tecido hepático.....	44
4.5.6. Análise histopatológica do fígado.....	44
4.6. Análise histopatológica do intestino.....	45
4.7. Análise de parâmetros inflamatórios.....	47

4.7.1. Avaliação do infiltrado de células inflamatórias no fígado.....	47
4.7.2. Dosagem de citocinas IL-1 β e TNF- α	47
4.7.3. Expressão por imunohistoquímica de iNOS e TLR-4.....	47
4.7.4. Reação em cadeia polimerase em tempo real quantitativo (qRT-PCR) para TLR4, TNF- α e IL-1 β	48
4.7.5. Imunofenotipagem das subpopulações de linfócitos por citometria de fluxo.....	49
4.8. Análise Estatística.....	50
5. RESULTADOS.....	51
5.1. A terapia com antibióticos mantém a depleção de bactérias intestinais por sete semanas, abole a bacteremia e a translocação bacteriana relacionadas ao irinotecano.....	51
5.1.2. Antibioticoterapia previne alterações nos parâmetros gerais e bioquímicos relacionados à esteato-hepatite induzida por irinotecano.....	53
5.1.3. A depleção da microbiota intestinal melhora o dano hepático induzido por irinotecano.....	55
5.1.4 Tratamento com antibióticos previne o estabelecimento de parâmetros inflamatórios no fígado de animais com esteato-hepatite induzida por irinotecano.....	58
5.1.5. Antibioticoterapia previne o dano intestinal induzido por irinotecano.....	60
5.1.6. Tratamento com antibióticos reduz a expressão do receptor <i>Toll-like 4</i> no fígado e intestino de animais com esteato-hepatite.....	61
5.1.7. Antibioticoterapia previne o aumento da imunexpressão de iNOS no fígado de animais com esteato-hepatite.....	64
5.2. Avaliação do efeito do uso de probióticos sobre os parâmetros gerais da esteato-hepatite por irinotecano.....	66
5.2.1. Probióticos melhoram as alterações nos parâmetros bioquímicos relacionados à esteato-hepatite induzida por irinotecano.....	67
5.2.2 Probióticos previne contra o dano tecidual hepático e intestinal induzido por irinotecano.....	69
5.2.3. Efeito dos probióticos sobre parâmetros inflamatórios na esteato-hepatite induzida por irinotecano.....	72
5.2.4. Frequência de células linfóides no baço de animais com esteato-hepatite induzida por irinotecano.....	74
6. DISCUSSÃO.....	77
7. CONCLUSÃO.....	88

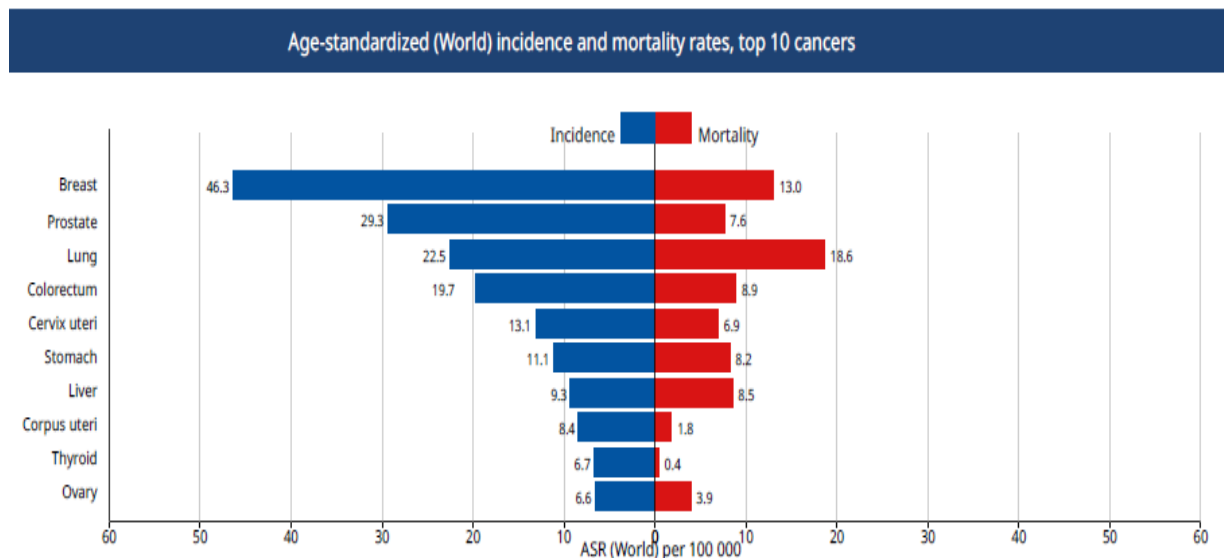
REFERÊNCIAS.....	89
------------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer colorretal metastático

Câncer é o termo utilizado para definir um conjunto de doenças complexas e potencialmente letais que compartilham uma característica fundamental: a proliferação celular anormal descontrolada e a capacidade de invadir tecidos adjacentes (MUKHERJEE, 2012; BRASIL, 2018; WHO, 2015). Dentre os diferentes tipos de câncer, o câncer colorretal (CCR) aparece como a quarta neoplasia mais incidente no mundo (Figura 1). Em nosso país é o terceiro mais incidente em homens e o segundo entre as mulheres, representando uma das principais causas de óbito por câncer (IARC/GLOBOCAN, 2018; BRASIL, 2018).

Figura 1. Distribuição da estimativa de incidência e mortalidade dos diferentes tipos de cânceres no mundo.



Fonte: The Global Cancer Observatory-World Health Organization (2018).

O fígado é reconhecidamente o sítio mais frequente de metastatase do câncer colorretal, pois a maior parte da drenagem das veias mesentéricas intestinais chega à esse local pelo sistema venoso porta hepático. Mesmo contando com abordagens eficazes para seu diagnóstico, cerca de 25% dos casos de CCR são diagnosticados em estágios avançados da doença e já apresentam metástases hepáticas (sincrônicas). Além disso, mais de 50% dos casos apresentarão metástases metacrônicas, aquelas desenvolvidas no curso da doença (CHEN et. al., 2011).

Essas evidências destacam-se também pelo fato de a expectativa de vida dos pacientes com metástases hepáticas não tratadas ser limitada, não ultrapassando 6 a 12 meses (ADAM et al., 2004). Adicionalmente, sabe-se que cerca de 30% dos óbitos por CCR apresentam metástases restritas à esse órgão, confirmando sua significativa relevância no curso da doença. Por outro lado, para doença restrita ao fígado, a ressecção cirúrgica é o procedimento que oferece o melhor benefício em termos de sobrevida (MISIAKOS et al. 2011). Essa abordagem é capaz de promover um eficaz controle da doença a longo prazo, com uma melhora adicional na sobrevida global em 5 anos, variando entre 30 e 60% dos pacientes (KUVSHINOV, FONG, 2007; WEI et al., 2006).

No entanto, apesar do nítido benefício trazido por essa abordagem cirúrgica, apenas 10% a 20% dos pacientes com metástases hepáticas são inicialmente candidatos à cirurgia. Devido à essa limitação, os tratamentos farmacológicos neoadjuvantes adquirem grande importância no manejo dessa neoplasia, uma vez que levam à redução da massa tumoral, tornando ressecáveis as lesões inicialmente consideradas irressecáveis, o que permite uma chance real de controle da doença a longo prazo (ADAM et al., 2004; BISMUTH et al., 1996; KUVSHINOV, FONG, 2007, SABANATHAN et al. 2016). Atualmente, os principais protocolos de tratamento neoadjuvante para CCR metastático baseiam-se em regimes que utilizam cloridrato de irinotecano (VAN CUSTEM et al., 2014; SABANATHAN et al. 2016).

1.2 Uso do irinotecano (CPT-11) no tratamento do câncer colorretal metastático.

Muitas abordagens farmacológicas surgiram ao longo dos anos e são atualmente empregadas no tratamento do CCR metastático (LEE, SUN, 2016). Inicialmente, utilizou-se uma combinação de 5-Fluorouracil e leucovorin, apresentando uma taxa de sobrevida de cerca de 20% (ZORZI et al., 2007). No entanto, essa taxa representou uma pequena mudança ao longo das últimas décadas, estimulando pesquisas que culminaram no surgimento de antineoplásicos mais eficazes, como o irinotecano, que ao ser associado a fluoropirimidinas como 5-FU promoveram uma melhora drástica nas taxas de sobrevida. Os protocolos à base de irinotecano representam a primeira e segunda linha de tratamento do CCR metastático, levando a taxas de resposta de aproximadamente 55% com uma sobrevida mediana de 22 meses (ZORZI et al., 2007; SABANATHAN et al. 2016). O irinotecano, também chamado de

CPT-11, é um derivado semi-sintético da camptotecina, um alcalóide extraído da *Camptotheca acuminata*, planta nativa na China e no Tibet. Esta molécula foi inicialmente isolada nos Estados Unidos na década de 60 e alterações posteriores em sua estrutura culminaram no surgimento de fármacos similares como o epotecano e o próprio irinotecano (WALL et al., em 1966). Esses fármacos são inibidores seletivos da enzima topoisomerase I, responsável pela quebra parcial do DNA, importante para sua replicação e transcrição, processos imprescindíveis para a proliferação de células tumorais (SATO et al., 2008).

Farmacologicamente, o CPT-11 é um pró-fármaco que apresenta pouco ou nenhum efeito *in vitro*. Seu efeito citotóxico é observado após sua conversão enzimática em seu metabólito ativo, SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina), que possui um efeito citotóxico 100 a 1.000 vezes maior que o fármaco original (KANEDA et al., 1990). Sua metabolização ocorre pela ação da enzima carboxilesterase (CE) principalmente no fígado, onde são encontradas as maiores concentrações da enzima, e em menor proporção no intestino (RIVORY et al., 1996; SATOH et al., 1998; CHESTER et al., 2003; TAKIMOTO, ARBUCK, apud KOIZUMI et al., 2006).

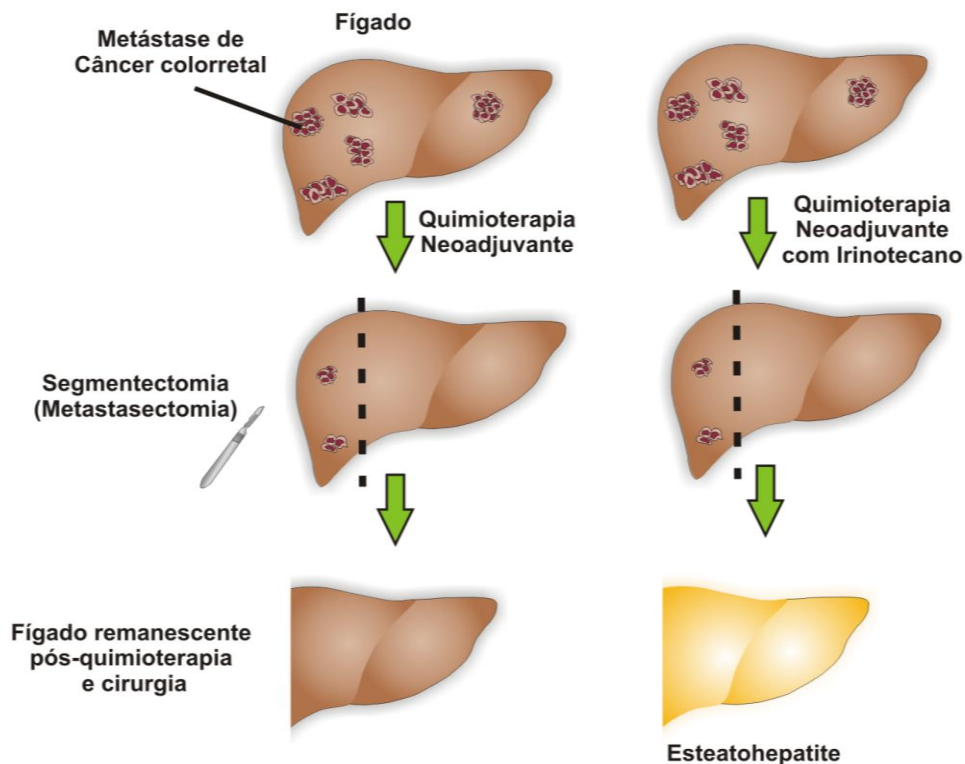
Por fim, o SN-38 é inativado via glicuronidação mediada pela enzima uridina difosfato glicuronosil-transferase (UDP-GT) UGT1A1 (CHESTER et al., 2003; MATHIJSEN et al., 2004), sendo eliminado principalmente nas fezes (60-70%) e em menores proporções, na bile (25%) e urina (10-20%) (ALIMONTI et al., 2004). Por outro lado, parte do glicuronídeo pode sofrer a ação de enzimas β -glicuronidases, presente em bactérias intestinais como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*, levando à reativação do SN-38 com aumento da sua lipossolubilidade, o que promove sua reabsorção pelo epitélio intestinal, efeito conhecido como ciclo êntero-hepático (TAKASUNA et al., 1998). Esse evento aumenta de forma significativa a meia-vida do fármaco no organismo. Assim, o SN-38 possui meia-vida de 17–25h, enquanto o irinotecano, de apenas 13h (ALIMONTI et al., 2004).

O uso do irinotecano de fato aumentou a resposta à quimioterapia neoadjuvante e a percentagem de pacientes beneficiados com a cirurgia para ressecção das metástases hepáticas. No entanto, sabe-se que esse fármaco pode induzir efeitos colaterais indesejados graves. Devido à sua inespecificidade, o CPT-11 pode atuar em qualquer tipo celular que mostre elevada taxa proliferativa (SHARMA et al., 2005), levando ao aparecimento de efeitos colaterais como leucopenia, mucosite oral e intestinal e esteato-hepatite que podem

determinar desde a redução do esquema terapêutico até sua total interrupção (BLEIBERG & CVITKOVIC, 1996; VAUTHEY et al., 2006) .

No contexto do CCR metastático é crescente o receio quanto aos efeitos desse fármaco sobre o parênquima hepático não tumoral, uma vez que as ressecções hepáticas com um remanescente parênquima hepático patológico podem limitar a capacidade de regeneração desse órgão, impactando negativamente nos resultados dessa abordagem cirúrgica. O tecido hepático possui ampla capacidade regenerativa, podendo ter até aproximadamente 80% do seu volume total ressecado com segurança. No entanto, condições patológicas reduzem essa capacidade, induzindo lesões hepáticas que podem levar ao aparecimento de insuficiência hepática pós-operatória (KUVSHINOV, FONG, 2007). Dentre aquelas lesões, a esteatohepatite tem sido frequentemente associada ao emprego de irinotecano (Figura 2) (MORRIS-STIFF et al., 2007, SCHUMACHER & GUO, 2015).

Figura 2. Manuseio de metástases hepáticas no câncer colorretal.



Fonte: Acervo Prof. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

1.3 Aspectos gerais da esteato-hepatite induzida por irinotecano

A esteato-hepatite induzida por irinotecano pode comprometer consideravelmente o tratamento do CCR metastático. Nesse sentido, estudos mostram que a presença de esteato-hepatite nos pacientes submetidos à hepatectomias aumenta de forma significativa a morbimortalidade pós-operatórias, devido à maior ocorrência de insuficiência hepática após o procedimento, indicando menor reserva funcional do fígado remanescente (VAUTHEY et al., 2006, JEAN-NICOLAS et al., 2006; KAROUI et al., 2006).

A esteato-hepatite não alcoólica (NASH, do inglês *non-alcoholic steatohepatitis*) faz parte do grupo das doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (NAFLD, do inglês *Non-alcoholic fatty liver disease*). Essas doenças podem ser induzidas por diferentes agentes e são caracterizadas pelo acúmulo de lipídeos nos hepatócitos. A NASH se mostra como um estágio intermediário da NAFLD e é caracterizada por esteatose hepática e lesão celular, inflamação hepática, fibrose e necrose (MULHALL, ONG, YOUNOSSI, 2002).

A esteato-hepatite é uma das mais graves formas de NAFLD e está intimamente associada à síndrome metabólica, obesidade, diabetes mellitus do tipo 2, dislipidemia e hipertensão, sendo essas condições fatores de risco que aumentam consideravelmente a incidência da doença (HAMAGUCHI et al., 2005). O fígado de pacientes acometidos pela doença apresenta um aspecto macroscópico característico, descrito como “fígado amarelo”, conferido pelo excesso de gordura no tecido hepático.

Clinicamente, a NASH pode variar desde uma condição assintomática até diferentes graus de disfunção hepática, o que dificulta o diagnóstico preciso somente com base em parâmetros clínicos. Por sua vez, as alterações histológicas incluem esteatose, inflamação lobular e vacuolização dos hepatócitos, sendo classificadas quanto à sua gravidade de acordo com o sistema de escores desenvolvido por Kleiner e colaboradores, que leva em consideração a presença de esteatose (graus de 0 a 3); de inflamação lobular (graus de 0 a 3) e vacuolização celular (graus de 0 a 2). O escore final gerado varia de 0 a 8 e é amplamente utilizado no diagnóstico da doença. Assim, escores < 3 indicam ausência de NASH, escores 3 e 4 indicam NASH marginal e escores > 5 confirmam o diagnóstico de NASH (KLEINER et al., 2005).

A teoria dos “múltiplos hits” é a mais aceita atualmente para explicar a progressão da NAFLD para NASH. Neste modelo considera-se que múltiplos insultos agem em conjunto em

indivíduos geneticamente predispostos (BUZZETTI et al., 2016). Tais fatores incluem resistência insulínica, secreção de hormônios a partir do tecido adiposo, fatores nutricionais, microbiota intestinal e fatores epigenéticos. A resistência à insulina é um dos fatores chave no desenvolvimento de NASH e resulta em aumento lipogênese com conseqüente aumento do fluxo de ácidos graxos para o fígado e aumento da secreção de adipocinas e citocinas inflamatórias (BUGIANESI et al., 2010). O acúmulo de gordura no fígado desencadeia disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (CUSI, 2009). Além disso, a microbiota intestinal alterada leva ao aumento de permeabilidade, da absorção de ácidos graxos e de citocinas pró-inflamatórias (KIRPICH, MARSANO, CLAIN, 2015). Em sujeitos predispostos por fatores genéticos ou epigenéticos, esses insultos causam acúmulo de gordura nos hepatócitos e predisõem a um ambiente inflamatório, levando a um estado de inflamação hepática crônica (BUZZETTI et al., 2016).

Há poucos anos não havia modelo experimental disponível para estudar os mecanismos envolvidos na esteato-hepatite induzida por irinotecano (KEIZMAN et al., 2010; MIKALOUSKAS et al., 2011). A maioria dos estudos sobre o tema envolviam pacientes, e serviam para a descrição de aspectos clínicos e para a identificação de grupos de risco, mas com deficiência no estudo dos mecanismos envolvidos e na proposição de medidas preventivas ou terapêutica eficazes (MAOR & MALNICK, 2013).

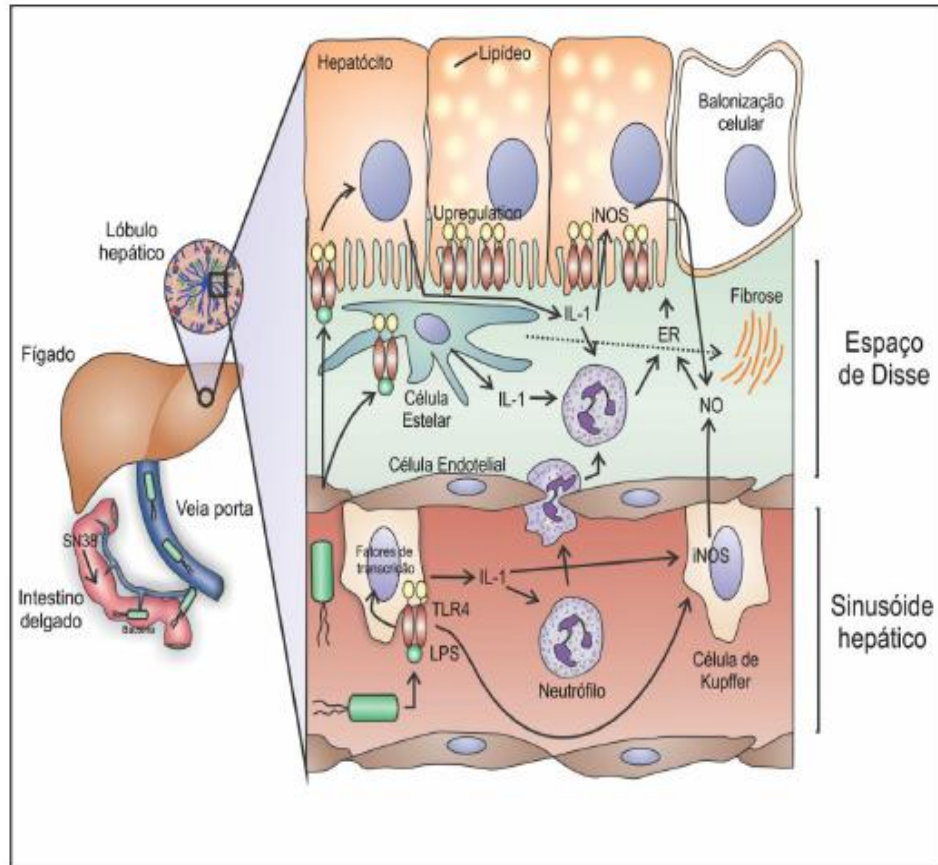
Nesse sentido, nosso laboratório padronizou um modelo experimental de esteato-hepatite induzida pelo irinotecano, a fim de compreender de forma mais clara os mecanismos e mediadores envolvidos na sua fisiopatologia e dessa forma permitir a identificação de possíveis hepatoprotetores. Nesse modelo, camundongos foram tratados com CPT-11, 50mg/kg três vezes por semana, em dias alternados, durante sete semanas, obtendo-se um modelo experimental bastante representativo dos eventos observados nos pacientes (COSTA et al., 2014).

No curso do desenvolvimento de esteato-hepatite induzida por irinotecano em camundongos, observa-se aumento dos marcadores de função hepática alanina e aspartato aminotransferases (ALT e AST, respectivamente), hepatomegalia, presença de todos os critérios histológicos indicativos de NASH (infiltrado neutrofílico portal, esteatose, infiltrado neutrofílico lobular e vacuolização dos hepatócitos), aumento de mieloperoxidase e de lipídeos totais, além de aumento da expressão de IL-1 β , óxido nítrico sintase induzível

(iNOS) e do receptor de reconhecimento padrão Toll-like 4 (TLR-4) no fígado de animais tratados com irinotecano (COSTA et al., 2014; MARCOLINO et al., 2017). A fibrose, comumente observada em pacientes com NASH, foi observada no modelo apenas na nona semana de tratamento, quando existiam poucos animais sobreviventes (COSTA et al., 2014).

Costa e colaboradores (2012) também observaram a presença significativa de bactérias gram-negativas no sangue portal e periférico, principalmente nas primeiras três semanas de tratamento, decaindo nas semanas subsequentes (dados não publicados). Em conjunto, esses eventos sugerem que o desenvolvimento de esteato-hepatite induzida por irinotecano envolve a translocação de bactérias gram-negativas intestinais para o fígado, as quais são reconhecidas pelos receptores Toll-like 4, promovendo liberação de IL-1 β e ativação de iNOS, que induzem a migração de neutrófilos, amplificando a resposta inflamatória local e afetando outros hepatócitos, que passam a acumular lipídeos e ficam entumecidos. Um esquema representativo da hipótese de desenvolvimento da esteato-hepatite induzida por irinotecano é apresentado na Figura 3.

Figura 3. Modelo hipotético do papel de IL-1, iNOS, TLR-4 e translocação bacteriana na patogênese da NASH induzida por irinotecano.



Fonte: COSTA, 2012.

Costa (2012) sugere um modelo hipotético para explicar o estabelecimento de NASH induzida por irinotecano. O SN38 (metabólito ativo do irinotecano) ao causar dano direto ao intestino promove a translocação de bactérias intestinais para o fígado através da veia porta. A endotoxina bacteriana (LPS) é então reconhecida pelos receptores TLR-4 nos macrófagos residentes, que são ativados e liberam IL-1, além de induzir a produção de óxido nítrico pela iNOS. O aumento na secreção de IL-1 provoca migração celular, levando ao acúmulo de neutrófilos no fígado. Óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio geram estresse oxidativo, causando lesão de membranas lipídicas e disfunção mitocondrial, ocasionando esteatose e tumefação de hepatócitos.

1.4 Papel da microbiota intestinal na patogênese da esteato-hepatite induzida por irinotecano

Nos últimos anos o papel da microbiota intestinal passou a ser visto como de grande importância na saúde, inclusive participando da patogênese de doenças inflamatórias e metabólicas, como diabetes tipo 2 e obesidade, e estudos recentes demonstram um possível envolvimento desta no desenvolvimento de NAFLD (CHU et al., 2018, SCHWENGER et al., 2018).

Cerca de 70% do suprimento sanguíneo do fígado é proveniente da veia porta, sendo um dos órgãos mais expostos às bactérias intestinais e antígenos derivados da microbiota do intestino (COMPARE et al., 2012). A relação entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento de NAFLD tem sido demonstrada na literatura em humanos e animais há décadas, e vários indícios apontam para o envolvimento do crescimento desordenado de bactérias do intestino delgado na transição de NAFLD para NASH (IMAJO et al., 2014; CHENG et al., 2018). Em modelo animal de doença hepática associada à nutrição parenteral total, a proliferação de bactérias gram-negativas devido à redução da motilidade intestinal ocasionou a produção de substâncias hepatotóxicas como endotoxinas e TNF- α , levando ao desenvolvimento de lesão hepática, e quando tratados com polimixina B, o fígado dos animais apresentaram considerável redução no acúmulo de lipídeos (PAPPO et al., 1992). Pacientes com NASH tratados com metronidazol apresentaram regressão da esteatose hepática (DRENICK et al., 1982), enquanto camundongos *germ-free* transplantados com microbiota normal do ceco desenvolveram acúmulo de triglicerídeos hepáticos e aumento de gordura corporal em 60% (BACKHED et al., 2004). Em outro estudo, camundongos tratados com probióticos apresentaram redução da esteatose induzida por dieta hipercalórica através da redução da atividade do fator de transcrição NF- κ B e aumento de células NK hepáticas (MA et al., 2008). Adicionalmente, a administração do prebiótico lactulose em um modelo experimental de NASH reduziu a resposta inflamatória (FAN & WANG, 2005). Esses dados sugerem que a modulação da microbiota intestinal com antibióticos e pro- ou prebióticos parece ser capaz de reduzir a endotoxemia e consequentemente a lesão hepática, inibindo ou alterando o crescimento de bactérias gram-negativas.

Um fator facilitador da translocação de bactérias intestinais para o fígado é o aumento da permeabilidade do epitélio intestinal. Esse evento pode ser ocasionado por alterações em

tight junctions entre as células do epitélio intestinal causada por toxinas bacterianas e outros mediadores inflamatórios. De fato, a literatura mostra o aumento da permeabilidade intestinal como fator associado com a patogênese e progressão de NASH em ratos (LORENZO et al., 2003; BRANDL & SCHNABL, 2017) e endotoxemia portal em camundongos obesos (DUMAS et al., 2006). Corroborando com essas evidências, estudos mostram que níveis circulantes de componentes bacterianos estão elevados tanto em pacientes quanto em animais com NAFLD (TSUKUMO et al., 2007; RIVERA et al., 2007; SPRUSS et al., 2009). A consequência disso é que os hepatócitos estão expostos a uma carga elevada de ligantes para os receptores do tipo Toll-like (TLR).

Receptores Toll-like são receptores de reconhecimento padrão que desempenham importante papel na resposta imune inata, bem desencadeando a resposta imune adaptativa. Foram identificados em células do sistema imunológico, principalmente macrófagos e células dendríticas (UEMATSU & AKIRA, 2006). O TLR4 atua como receptor de lipopolissacarídeos (LPS), um componente estrutural da membrana externa de bactérias gram-negativas (GARAY-MALPARTIDA et al., 2011). A ativação desse receptor promove estimulação da síntese de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, contribuindo para a patogênese da esteato-hepatite (MIURA & OHNISHI, 2014). A literatura mostra que a sinalização via TLR aumenta o dano hepático em NASH, esteato-hepatite alcoólica e hepatite viral crônica (MIURA et al., 2010; DHILLON et al., 2010; INOKUCHI et al., 2011), em que os receptores TLR2, TLR5, TLR4 e TLR9 mostram-se envolvidos (SZABO et al., 2005; RIVERA et al., 2010; MIURA et al., 2010; VIJAY-KUMAR, 2010; CSAK et al., 2011).

É cada vez mais evidente que a microbiota intestinal regulada influencia no sistema imune do hospedeiro, apresentando papel essencial na função e indução de perfis celulares, podendo conferir benefícios ao organismo hospedeiro, diferentemente dos microorganismos patogênicos. As respostas de células T têm se mostrado dependentes da composição da microbiota intestinal. Camundongos *germ-free* têm a frequência de células Th1 e Th17 relativamente reduzidas, enquanto apresentam aumento de células T regulatórias (Tregs) (IVANOV et al., 2008). Células T regulatórias são células capazes de suprimir a imunidade contra vários estímulos, incluindo a presença de bactérias comensais e auto antígenos (KANAMORI et al., 2016), enquanto linfócitos Th17 são células T que produzem a citocina pró-inflamatória IL-17, especialmente em resposta à presença de bactérias extracelulares (MATRICON et al., 2010). Dados da literatura mostram que bactérias filamentosas

segmentadas possuem um papel importante na indução de células Th17, com aumento da expressão de IL-17 e IL-22 (GABORIAU-ROUTHIAU et al., 2009; IVANOV et al., 2009). Além disso, a colonização de camundongos *germ-free* com espécies de *Clostridium* foi capaz de induzir a diferenciação de Tregs (células T regulatórias) (ATARASHI et al., 2013), e a utilização de probiótico contendo cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* aumentou a frequência dessas células (DI GIACINTO et al., 2005).

Na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano, nosso grupo demonstrou que animais knockout para os receptores TLR-2 e TLR-9, que reconhecem o peptidoglicano de bactérias gram positivas e DNA não metilado bacteriano (CpG), respectivamente, apresentam menor dano intestinal e bacteremia durante o tratamento com irinotecano (WONG et al., 2015). Esses dados, sugerem que o controle de patógenos por meio da utilização de antibióticos ou probióticos poderia modular a translocação bacteriana e o desenvolvimento da esteato-hepatite induzida por irinotecano.

1.5 Probióticos

De acordo com a OMS, probióticos são organismos vivos que quando administrados na quantidade adequada promovem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Cepas ideais para produção de probióticos devem ter características especiais, como serem resistentes à bile, ácido clorídrico e suco pancreático, serem toleráveis ao transporte gástrico, além de estimularem o sistema imune (FOOLADI et al., 2013). *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* e algumas cepas de fungos *Saccharomyces* tem sido utilizados como probióticos (PARVEZ et al., 2006; GUPTA & GARG, 2009, JUSTINO et al., 2015). Doses diárias de probióticos que variam entre 10^8 e 10^{11} Unidades Formadoras de Colônias (UFC) têm sido demonstradas como comprovadamente eficazes em seres humanos (KHANI et al., 2012).

Os efeitos benéficos exercidos pelos probióticos sobre o epitélio intestinal vêm sendo descritos na literatura há décadas. Como exemplos desses mecanismos temos o reparo da barreira mucosa, a prevenção de apoptose devido ao fornecimento de ácidos de cadeia curta e a melhora da viabilidade epitelial intestinal (KANAUCHI et al., 1999; MA et al., 2014). Além disso, probióticos podem induzir o crescimento de bactérias gram-positivas e anaeróbias, limitando o crescimento de gram-negativas (ZAO et al., 2004). O controle das bactérias da

microbiota promovido pelos probióticos pode levar à diminuição de endotoxinas e outros compostos tóxicos derivados desses microorganismos, como o etanol, fenol e indóis, que causam lesões hepáticas (O'SULLIVAN, 2008).

Probióticos apresentam diversos efeitos anti-inflamatórios (SOLGA & DIEHL, 2003). Esses efeitos incluem competição com bactérias patogênicas por nutrientes, alteração na sinalização de citocinas induzida pelo crescimento de bactérias intestinais, melhora da função de barreira intestinal via modulação de proteínas do citoesqueleto e *tight junctions* (junções apertadas entre as membranas laterais das células), aumento da integridade do epitélio intestinal pelo fornecimento de nutrientes essenciais, particularmente sob a forma de ácidos graxos de cadeia média e inibição direta da produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α (MADSEN et al., 2001; RESTA-LENERT & BARRETT, 2003; LI et al., 2003; IACONO et al., 2011).

Diversos estudos em modelos animais têm mostrado evidências de que probióticos podem reduzir a gravidade da NASH. Em um deles, os simbióticos *Bifidobacterium infantis* associado a oligossacarídeos foram administrados em animais com NASH, se mostrando capazes de reduzir a inflamação e o acúmulo de triglicerídeos no fígado, além de reduzir a expressão de genes de mediadores pró-inflamatórios no fígado e intestino (JENA et al., 2018). Em outro trabalho, animais submetidos a uma dieta hipercalórica foram tratados com VSL#3 (uma mistura de oito cepas - *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, e *Lactobacillus delbrueckii*), o que reduziu a expressão de marcadores de peroxidação lipídica, TNF- α , iNOS e ciclooxigenase-2 (ESPOSITO et al., 2009).

Pouco se sabe acerca do efeito de probióticos sobre a fibrose hepática. Em um modelo experimental de NASH induzido por uma dieta deficiente em metionina e colina, a utilização de VSL#3 reduziu a fibrose pela diminuição do acúmulo de colágeno e actina do músculo liso, mas sem alteração significativa na esteatose ou inflamação (VELAYUDHAM et al., 2009). Em outro estudo, a utilização de *Lactobacillus casei* em animais suprimiu consideravelmente o desenvolvimento de fibrose em modelo de NASH, além de reduzir a inflamação hepática e do cólon (OKUBO et al., 2013).

Em pacientes, a utilização de probióticos em situações de NAFLD também apresenta resultados promissores. Malaguarnera e colaboradores mostraram que o uso da combinação de *Bifidobacterium longum* com fruto-oligossacarídeos em pacientes com NASH melhorou os

níveis de AST, colesterol LDL, TNF- α e endotoxinas, enquanto aumentou a resistência à insulina e reduziu esteatose (MALAGUARNERA et al., 2012). O consumo de iogurte probiótico (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*) por indivíduos com NAFLD promoveu redução do nível sérico de colesterol total, LDL e enzimas hepáticas (NABAVI et al., 2014). Em ensaio clínico randomizado controlado por placebo, crianças com NAFLD receberam VSL#3 por 4 meses. A análise dos desfechos mostrou que esses pacientes tinham menos gordura hepática e menor IMC (índice de massa corporal) comparados ao grupo placebo (ALISE et al., 2014). Um estudo de metanálise mostrou que probióticos melhoram significativamente uma variedade de parâmetros em pacientes com NAFLD, dentre eles, enzimas hepáticas AST e ALT e gordura hepática. (LAVEKAR et al., 2017)

O irinotecano reconhecidamente altera a microbiota do estômago, jejuno e cólon de ratos, contribuindo para a ocorrência de diarreia, infecção sistêmica e mucosite intestinal (STRINGER et al., 2007). Sabendo-se do provável papel de bactérias intestinais na patogênese da esteato-hepatite induzida por irinotecano, uma intervenção no perfil populacional de bactérias do trato gastrointestinal com antibióticos e probióticos apresenta-se como uma alternativa viável para estudar a influência de bactérias como fator desencadeador da NASH e como estratégia para prevenção ou minimização do seu desenvolvimento.

2. JUSTIFICATIVA

O irinotecano é um dos agentes mais utilizados no tratamento de câncer colorretal metastático. Entretanto, sua utilização tem sido limitada pelo desenvolvimento de uma condição denominada esteato-hepatite não alcoólica, também conhecida como “Síndrome do fígado amarelo”. A incidência dessa condição varia na clínica entre 8 e 10% naqueles pacientes expostos ao quimioterápico (ROBINSON, et al., 2012). Atualmente, não se dispõe de hepatoprotetores eficazes em prevenir e tratar essa síndrome.

Em modelo experimental de NASH induzido por irinotecano, Costa e colaboradores encontraram uma bacteremia em nível portal e sistêmico, além da ativação de receptores de reconhecimento de patógenos no intestino (TLR4) e fígado dos animais (COSTA, 2012). Corroborando com tal achado, Assis-Júnior e colaboradores encontraram DNA bacteriano no tecido hepático de animais com esteato-hepatite (MARCOLINO ASSIS-JUNIOR et al., 2017). Além disso, a literatura vem documentando a contribuição da comunicação existente entre o eixo intestino-fígado por meio de bactérias intestinais na patogênese da NASH (BRANDL & SCHNABL, 2017).

Portanto, no presente estudo investigamos a participação da microbiota intestinal e sua translocação para o fígado como fator desencadeador de esteato-hepatite induzida por irinotecano, bem como propusemos alternativas terapêuticas para prevenir o estabelecimento dessa toxicidade baseado em probióticos de uso clínico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o papel da microbiota entérica na patogênese da esteato-hepatite experimental induzida por irinotecano.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a eficácia da associação antibiótica (Metronidazol, Ciprofloxacina, Vancomicina, Imipenem) para depleção da microbiota intestinal de camundongos;
- ✓ Avaliar se a depleção da microbiota intestinal interfere no desenvolvimento da esteato-hepatite induzida por irinotecano;
- ✓ Avaliar se a depleção da microbiota intestinal melhora o dano intestinal e a translocação bacteriana relacionados ao tratamento com irinotecano;
- ✓ Avaliar se a modulação da microbiota intestinal com probióticos pode prevenir o desenvolvimento da esteato-hepatite induzida por irinotecano;
- ✓ Avaliar se a modulação da microbiota intestinal com probióticos melhora o dano intestinal e a diarreia associada ao tratamento com irinotecano.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Drogas

Foram utilizados os seguintes fármacos: Cloridrato de Irinotecano (Evoterin®, Evolabis, São Paulo, Brazil, 100 mg por ampola); Metronidazol (solução com 500 mg, Metrobacter®, Isofarma) Ciprofloxacina (solução com 200mg, Ciprobacter®, Isofarma), Imipenem (frasco com 500 mg, genérico ABL); Vancomicina (frasco com 500 mg, Vancocina® CP, ABL); Cepas liofilizadas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium lactis* (1×10^9 UFC/g, Simfort-Vitafor) e salina 0,9% estéril.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, pesando entre 20 e 25 g. Os animais foram colocados em caixas, num ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ num ciclo de 12h claro/12h escuro, com livre acesso a água e ração padrão. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) e pelo Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX) da Universidade de Fortaleza (Unifor). Os experimentos foram realizados de acordo com preceitos do Comitê de Ética em Uso Animal da UFC, após aprovação no mesmo (protocolo 21/12).

4.3 Protocolos experimentais

4.3.1 Modelo de esteato-hepatite não alcóolica induzida por irinotecano

A esteato-hepatite não alcóolica foi induzida de acordo com o modelo proposto por Costa e colaboradores (2014), no qual camundongos receberam três injeções de irinotecano (50mg/kg) semanais durante cinco semanas (D11-D45) ou sete semanas (D11-D59), em dias alternados, por via intraperitoneal. No grupo controle foi administrado solução salina (SF 0,9%, 5mL/kg) pela mesma via. As administrações eram realizadas sempre no mesmo horário. A eutanásia dos animais foi realizada após a quinta ou sétima semana de tratamento com irinotecano (protocolos I e II).

4.3.2 Tratamento com antibióticos

O tratamento com antimicrobianos foi realizado para avaliar o potencial papel da microbiota intestinal no desenvolvimento de lesão tecidual hepática. A microbiota intestinal dos animais foi reduzida realizando a administração de uma combinação de antimicrobianos de largo espectro na água de beber (Metronidazol, Ciprofloxacina, Vancomicina e Imipenem – 50mg/kg de peso/diariamente). A administração iniciou-se dez dias antes do tratamento com irinotecano (D1-D10), baseado-se na eficácia do coquetel em depletar a microbiota já após sete dias de tratamento (SOUZA et al., 2004), e estendeu-se até o dia da eutanásia. Para assegurar que o tratamento com antimicrobianos foi adequado na redução da microbiota intestinal dos animais, após dez dias de tratamento com o antibiótico, amostras de bolo fecal foram colhidas e semeadas em ágar BHI (brain heart infusion) e avaliadas vinte e quatro e quarenta e oito horas após incubação (SOUZA et al., 2004). A água, a caixa e a maravalha dos animais foram trocadas diariamente. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos nas melhores condições assépticas para evitar reinfecção dos animais. A eutanásia dos animais foi realizada após a quinta (D45) e sétima semana (D59) de tratamento com irinotecano, na qual foram colhidas amostras de fígado e intestino para posteriores análises (protocolo I).

Protocolo I:

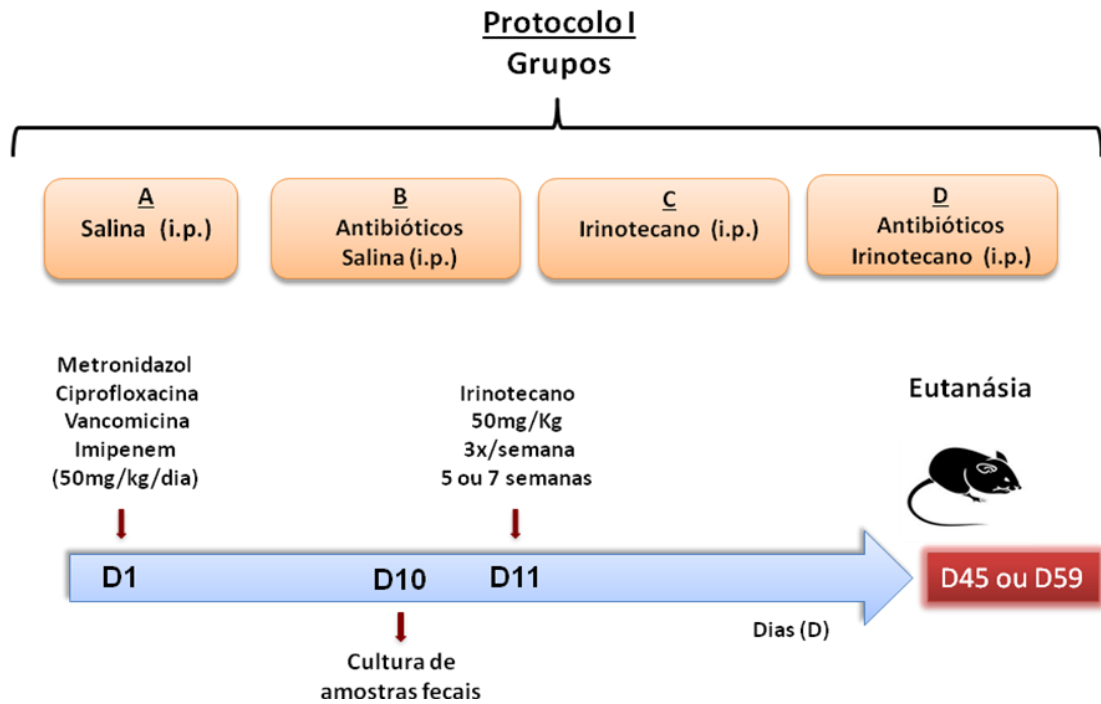
Grupo A - Camundongos C57BL/6 foram tratados com salina (SF 0,9%, 5 mL/kg, i.p.) três vezes por semana em dias alternados durante cinco ou sete semanas;

Grupo B - Camundongos C57BL/6 foram tratados com os antimicrobianos metronidazol, ciprofloxacina, vancomicina e imipenem (50mg/kg/dia, na água de beber, pré-tratamento por 10 dias + cinco ou sete semanas) e salina (SF 0,9%, 5 mL/kg, i.p.);

Grupo C - Camundongos C57BL/6 foram tratados com irinotecano (50 mg/kg, i.p.), três vezes por semana em dias alternados durante cinco ou sete semanas;

Grupo D - Camundongos C57BL/6 foram tratados com os antimicrobianos metronidazol, ciprofloxacina, vancomicina e imipenem (50mg/kg/dia, na água de beber, pré-tratamento por 10 dias + cinco ou sete semanas) e irinotecano (50 mg/kg, i.p.), três vezes por semana em dias alternados durante cinco ou sete semanas.

Figura 4. Protocolo experimental I



Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=6-10). O grupo controle negativo recebeu apenas solução salina (grupo A). O grupo controle positivo recebeu três injeções de irinotecano em dias alternados por cinco (D45) sete (D59) semanas (grupo C). Os animais receberam o coquetel de antibióticos associado às injeções de irinotecano (grupo D) ou isoladamente (grupo B). O tratamento com antibióticos iniciou-se dez dias antes do início do tratamento com irinotecano. Amostras fecais foram cultivadas em meio BHI para controle da redução da carga microbiana intestinal.

4.3.3 Tratamento com probióticos

O potencial efeito da modulação da microbiota intestinal na prevenção da lesão hepática foi avaliado administrando-se um coquetel de probióticos por via oral. Foi administrada uma suspensão contendo cinco cepas de probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium lactis*) na dose de 1×10^7 CFU por animal. A diluição de um sachê contendo 1×10^9 CFU foi realizada em solução salina e foi administrado um volume fixo para todos os animais (200 μ L) através de gavagem por cinco consecutivos a cada semana, durante cinco semanas. Ao final da quinta semana de tratamento com quimioterápico, amostras de sangue, fígado, intestino e baço foram colhidas para posteriores análises (protocolo II) (YEUNG *et al.*, 2015).

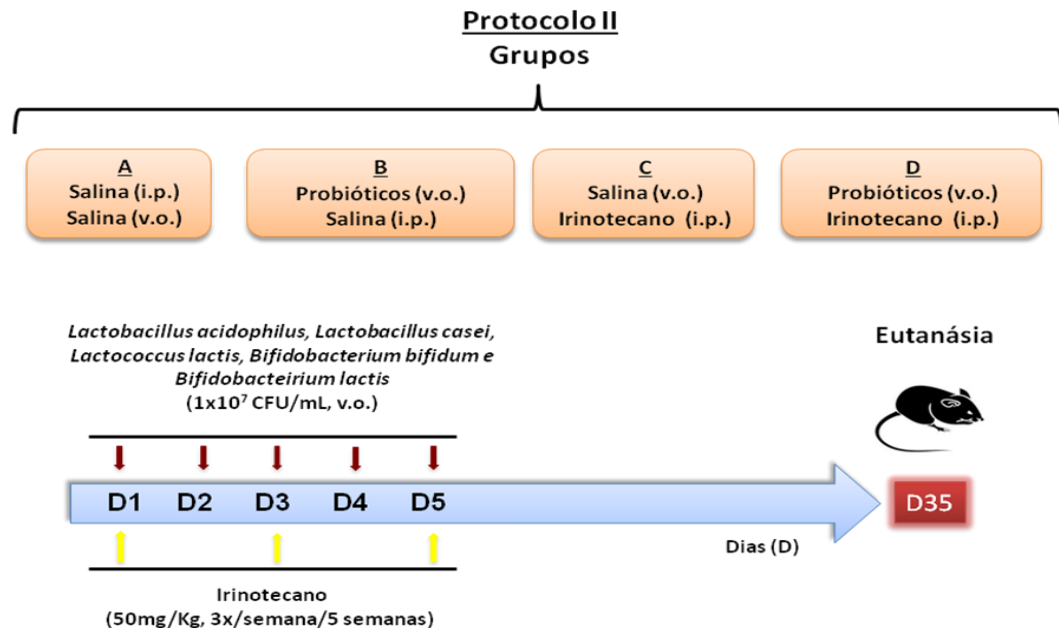
Protocolo II:

Grupo A - Camundongos C57BL/6 foram tratados com salina (SF 0,9%, 5 mL/kg, i.p.) três vezes por semana em dias alternados e salina (SF 0,9%, 5mL/kg, v.o.) cinco dias por semana durante cinco semanas;

Grupo B - Camundongos C57BL/6 foram tratados com um coquetel dos probióticos *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium lactis* (1×10^7 CFU/mL, v.o.) cinco dias por semana e salina (SF 0,9%, 5 mL/kg, i.p.) três vezes por semana em dias alternados durante cinco semanas;

Grupo C - Camundongos C57BL/6 foram tratados com irinotecano (50 mg/kg, i.p.) três vezes por semana em dias alternados e salina (SF 0,9%, 5mL/kg, v.o.) cinco dias por semana durante cinco semanas;

Grupo D - Camundongos C57BL/6 foram tratados com um coquetel dos probióticos *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium lactis* (1×10^7 CFU/mL, v.o.) cinco dias por semana e irinotecano (50 mg/kg, i.p.), três vezes por semana em dias alternados durante cinco semanas.

Figura 5. Protocolo experimental II

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=6-10). O grupo controle negativo recebeu apenas solução salina (grupo A). O grupo Irinotecano recebeu três injeções de irinotecano em dias alternados (D1, D3, D5) (grupo C). Os probióticos foram administrados cinco dias por semana com (grupo D) ou sem administração de irinotecano (grupo B) (D1-D5). A eutanásia foi feita ao final da quinta semana.

4.4 Avaliação da depleção da microbiota intestinal, bacteremia e translocação bacteriana para o fígado após antibioticoterapia.

4.4.1 Análise da depleção da microbiota intestinal

A eficácia da antibioticoterapia em depletar a microbiota intestinal dos animais foi avaliada após 10 dias de tratamento apenas com antibióticos de largo espectro e também ao final de cinco e sete semanas após o início do tratamento com irinotecano. Amostras fecais de cada animal foram coletadas em condições estéreis e homogeneizadas em solução salina, sendo posteriormente inoculadas em meio Brain Heart Infusion (BHI, meio não seletivo). As amostras foram incubadas à 37°C e avaliadas em 24 e 48h (SOUZA et al., 2004).

4.4.2 Análise da bacteremia e translocação bacteriana

Para determinar a eficácia da antibioticoterapia em prevenir a bacteremia e a translocação bacteriana para o fígado, amostras de sangue periférico e fígado foram coletadas em condições estéreis após cinco e sete semanas de tratamento com irinotecano. As amostras

de fígado foram homogeneizadas com salina estéril. O homogenato teve sua concentração padronizada e um volume fixo de 10µL do homogenato e do sangue foram cultivados em meio BHI a 37 °C por 24 a 48h. Os resultados foram expressos como UFC/mL de sangue ou UFC/g de tecido (STRINGER et. al., 2007).

4.5 Avaliação dos parâmetros gerais de indução de esteato-hepatite.

4.5.1 Avaliação ponderal e peso úmido do fígado

Os animais foram submetidos semanalmente à pesagem a partir da primeira administração de irinotecano até o dia da eutanásia. Os valores foram expressos em % de variação de peso. Ao fim do protocolo experimental com irinotecano, o fígado foi coletado em sua totalidade e pesado em balança analítica. Os resultados foram expressos como mg/30g de massa corpórea do animal.

4.5.2 Contagem de leucócitos totais

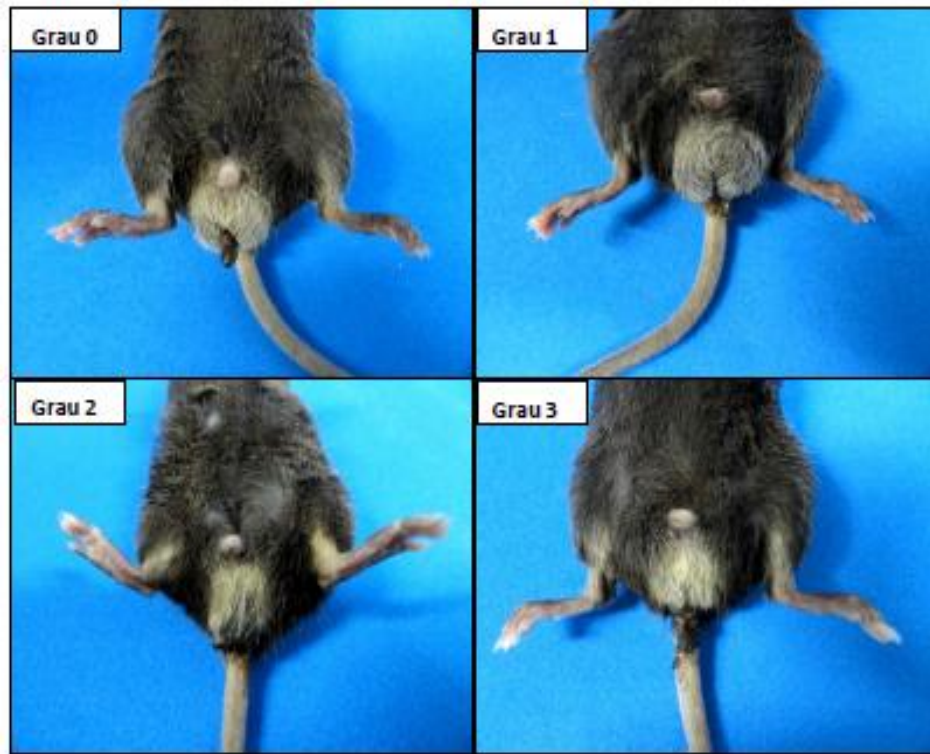
Os animais foram levemente anestesiados com tribromoetanol (25 mg/kg, i.p.) para coleta de 20 µL de sangue do plexo retroorbital que foi imediatamente diluído em 380 µL de solução de Turk (Acido acético 2%, Violeta Genciana 0,2%). Em seguida, o número total de leucócitos plasmáticos foi determinado utilizando-se câmara de Neubauer para verificar o efeito da quimioterapia à base de irinotecano na indução da leucopenia. Essa observação serviu como controle da atividade citotóxica do fármaco sobre o animal.

Os resultados da contagem das células contidas nos quatro quadrantes da câmara foram somados e o resultado multiplicado por 20, valor correspondente à diluição realizada e depois por 10, fator de correção para determinar o número de células/mm³.

4.5.3 Avaliação do grau de diarreia

Foram atribuídos escores aos eventos de diarreia apresentados na quinta semana após o início do tratamento dos animais com irinotecano (adaptado de Kurita *et al.*, 2000), como discutido na Figura 6. Esse parâmetro representa um indicativo de indução do modelo experimental de mucosite intestinal, mostrando-se relevante tendo em vista a associação do sinal de diarreia associado à mucosite observado na prática clínica e o desenvolvimento de esteato-hepatite.

Figura 6. Graus de diarreia de acordo com a intensidade após tratamento com irinotecano em camundongos.



A avaliação da diarreia foi realizada ao fim de cinco semanas de tratamento com irinotecano de acordo com os escores atribuídos relativos à sua intensidade. **Grau 0:** fezes com aspecto normal; **Grau 1:** fezes levemente amolecidas; **Grau 2:** Fezes úmidas com pouca sujidade perianal; **Grau 3:** Fezes úmidas com bastante sujidade perianal. **Grau 4:** morte decorrente da diarreia. Escores propostos por KURITA *et al.*, 2000 e adaptado por CARVALHO, 2016. Fonte: WONG, 2013.

Tabela 1. Escores para avaliação do grau de diarreia em camundongos

Escore	Avaliação da diarreia
Escore 0	Fezes com aspecto normal
Escore 1	Fezes levemente alteradas e pouco umedecidas
Escore 2	Fezes úmidas com pouca sujidade perianal
Escore 3	Fezes úmidas e com bastante sujidade perianal
Escore 4	Morte decorrente da diarreia

Fonte: adaptado de KURITA *et al.*, 2000.

4.5.4 Avaliação da atividade de alanina aminotransferase plasmática (ALT)

Sob leve anestesia com tribromoetanol (2,5%), o sangue foi coletado no dia da eutanásia através do plexo orbital dos animais para determinação da alanina aminotransferase (ALT). Para a mensuração, utilizou-se um espectrofotômetro em um nível de absorvância de 340 nm. A análise foi realizada de acordo com o recomendado pelo fabricante utilizando-se kits bioquímicos específicos (Labtest®).

4.5.5 Determinação de lipídeos no tecido hepático

As amostras de fígado foram analisadas para determinação da quantidade de lipídeos de acordo com o método proposto por Bligh e Dyer (1959). Rapidamente as amostras foram homogeneizadas em uma solução de 1:2 de clorofórmio/metanol seguindo a proporção de 100 mg de tecido/1,9 mL da solução e agitadas. Em seguida, clorofórmio foi adicionado (0,63mL) e a solução novamente agitada. Finalmente, 0,63 mL de água destilada foi adicionada atingindo a proporção final de 2:2:1 de clorofórmio/metanol/água. A mistura foi centrifugada em temperatura ambiente a 200 X g/ 2 min dando origem a um sistema com duas fases (polar em cima e apolar embaixo). A fase inferior foi recuperada e o total de lipídeos foi calculado (mg lipídeos/g de tecido) após total evaporação do solvente a 100 °C.

4.5.6 Análise histopatológica do fígado

As amostras do fígado foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10%, desidratadas e emblocadas em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos e depois corados pela técnica de hematoxilina-eosina (H&E) e em seguida examinados por microscopia óptica (100x). As lâminas foram analisadas por um patologista experiente que não possuía informações sobre o tratamento ou da divisão entre os grupos. O diagnóstico e a graduação da NASH foram avaliados conforme o escore de atividade da NASH proposto por KLEINER et. al. (2005), como representado na tabela 2.

Tabela 2. Escores histopatológicos para análise do fígado

Critérios histopatológicos do fígado	
Parâmetro	Escore
Esteatose	0: presente em menos que 5% das células
	1: presente em 5-33% das células
	2: presente entre 33-66% das células
	3: presente em >66% das células
Inflamação lobular	0: ausência de infiltrados por campo de 200x
	1: até 2 infiltrados por campo de 200x
	2: 2 a 4 infiltrados por campo de 200x
	3: > 4 infiltrados por campo de 200x
Balonização	0: ausência
	1: leve
	2: severa

Fonte: Kleiner *et al.*, 2005.

4.6 Análise histopatológica do intestino

Após a eutanásia dos animais, um segmento de 0,5 cm do íleo foi removido e em seguida lavado com solução salina e formol para posterior fixação em formol tamponado 10% e processamento para coloração pelo método HE (hematoxilina-eosina) para exame em microscopia óptica 100x e 400x (Microscópio Nikon com objetiva 10x ou 40x e lente ocular micrométrica Leitz Wetzlar 10x). A análise histopatológica consistiu na observação do aspecto das vilosidades e criptas intestinais, bem como presença e intensidade do infiltrado inflamatório. O grau e a severidade da mucosite intestinal foram determinados de acordo com uma modificação do sistema de escores Macpherson e Pfeiffer, 1978, descritos na tabela 3.

Tabela 3. Escores histopatológicos para análise de intestino delgado

Análise histopatológica do íleo	
Parâmetro	Escore
Arquitetura	0: arquitetura preservada 1: alteração discreta da polaridade 2: alteração moderada 3: alteração acentuada
Regeneração (mitose e apoptose)	0: ausência de sinais 1: discreta 2: moderada 3: acentuada
Estratificação celular	0: 1 camada de células 1: < 20% da área possui 2 camadas de células 2: > 20% da área possui 2 camadas de células e < 20% possui 3 camadas 3: > 20% da área possui 3 camadas de células e o resto da área possui ≥ 4 camadas
Células inflamatórias	0: ausência de células 1: pequena quantidade de células 2: quantidade moderada de células 3: grande quantidade de células
Proporção vilo/cripta	0: proporção 3/1 1: proporção 2/1 2: proporção 1/1 3: proporção menor que 1/1

Fonte: adaptado de Macpherson e Pfeiffer, 1978.

4.7 Análise de parâmetros inflamatórios

4.7.1 Avaliação do infiltrado de células inflamatórias no fígado

A partir das lâminas histopatológicas também foi realizada a contagem de focos de células inflamatórias no tecido hepático. A análise foi realizada em cada peça e um total de dez campos foi avaliado em objetiva de 200x. A escolha do primeiro campo foi realizada de forma aleatória e os demais campos foram contíguos ao campo anterior. A contagem foi feita de forma cega e por três pesquisadores independentes. Foi considerado como foco inflamatório o agrupamento de três ou mais células inflamatórias. Foi feita a média aritmética das três leituras e o resultado foi expresso como número de focos inflamatórios/campo.

4.7.2 Dosagem de citocinas IL-1 β e TNF- α

As amostras de fígado coletadas foram homogeneizadas e processadas como descrito por Safieh-Garabedian et al. (1995). A detecção de IL-1 β e TNF- α foi determinada por ELISA, como descrito previamente (CUNHA *et al.*, 1993). Resumidamente, placas para ELISA foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpo de captura anti-IL-1 β ou anti-TNF- α murino (2 μ g/mL). Após bloqueio das placas, as amostras e a curva padrão foram adicionadas em duplicata em várias diluições e incubadas por 2h a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com solução tampão e incubadas com anticorpo de detecção durante 2h. Após o período de incubação, lavou-se as placas e adicionou-se 50 μ L do complexo HRP-avidina diluído na proporção 1:200. O reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 50 μ L) foi adicionado 15 min depois e incubou-se as placas no escuro a 37° C por 15 a 20 min, quando a reação enzimática foi finalizada com H₂SO₄ 2N e a absorbância medida em 490 nm. As concentrações de citocinas contidas nas amostras foram calculadas a partir de uma curva padrão com 11 pontos, obtida por diluição seriada. O resultado foi expresso em pg/mg de tecido.

4.7.3 Expressão por imunohistoquímica de iNOS e TLR-4.

Foi avaliado a expressão dos receptores Toll-4 e iNOS em amostras de fígado através de técnica de imunohistoquímica. As peças histológicas foram desparafinizadas e em seguida hidratadas. Após a hidratação as peças foram imersas em tampão citrato e aquecidas a 100°C durante 15 min, seguido de resfriamento e lavagem em PBS. Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena e as lâminas foram incubadas com anticorpo primário monoclonal murinho (1:200) para Toll-4 e iNOS (overnight). Em seguida as lâminas foram

incubadas com o anticorpo secundário biotilado (Anti-mouse IgG) na proporção de 1:200. Após a remoção do anticorpo biotilado, as lâminas foram incubadas por 30 minutos com o complexo ABC (Horseradish Peroxidase Standard) e posteriormente lavadas em PBS e incubadas com DAB/peróxido (2 min) para dar a cor da reação. Por fim, foi feita a contra-coloração com hematoxilina de Harry's e posterior desidratação e montagem das lâminas.

4.7.4 Reação em cadeia polimerase em tempo real quantitativo (qRT-PCR) para TLR4, TNF- α e IL-1 β

Amostras de fígado foram utilizadas para determinar a expressão relativa de TLR4, TNF- α e IL-1 β mRNA. Inicialmente o RNA foi extraído conforme especificações do fabricante por meio do kit de extração *AurumTM Total RNA fatty and fibrous tissue kit* (Bio-Rad, CA, USA). O rendimento e qualidade do RNA total foram verificados por meio de quantificação espectrofotométrica nos comprimentos de onda de 260 nm e da razão 260/280 nm, respectivamente. O i RNA total no volume final de 20 μ l foram transcritos reversamente por meio do kit *iScriptTM* (Bio-Rad) em cDNA utilizando o sistema termociclador C1000 TouchTM. O PCR em tempo real foi realizado no equipamento CFX96 TouchTM da Bio-Rad utilizando o *supermix iQTM SYBR* (Bio-Rad), de acordo com as especificações do fabricante. A expressão do mRNA foi determinada após a normalização dos valores com o do gene de referência *Ppia*. Os valores do *quantification cycle* (Cq) para os genes testados foram exportados e os níveis relativos de expressão do gene foram calculados de acordo com a metodologia $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta CT = (CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene referência controle})$. Abaixo é mostrada a sequência dos *primers* utilizados.

Tabela 4. Detalhamento dos primers usados na reação de PCR

Primers	Foward	Reverse
TNF-α	5'-CCATCTTCTCAAAATTCGAGACAA-3'	5'-TGGGAGTAGACAAGGTACACCC-3'
IL-1β	5'-CAACCAACAAGTGATATTCATG-3'	5'-GATCCACACTCTCCAGCTA-3'
TLR4	5'-GAGAATCTGGTGGCTGTGG-3'	5'-TTCCCTGAAAGGCTTGGTC-3'

4.7.5 Imunofenotipagem das subpopulações de linfócitos por citometria de fluxo

O baço dos animais foi removido após a eutanásia, umedecido com meio RPMI contendo soro fetal bovino 10%, e cortado em três segmentos. Os segmentos foram colocados em peneira de células de 70 µm acoplada a tubo falcon de 50 mL e macerados mecanicamente com êmbolo de uma seringa de 3mL. O *pellet* resultante foi ressuspenso em PBS e a viabilidade checada utilizando azul de tripan. As células foram utilizadas quando a viabilidade foi maior do que 85%.

Os linfócitos isolados do baço foram submetidos à marcação com anticorpos para determinação das subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo. Para tal, o painel de anticorpos foi cuidadosamente selecionado e titulado para escolha da melhor concentração capaz de detectar elevado número de células e alta intensidade de fluorescência para o marcador em questão. Para a titulação, todos os anticorpos foram diluídos nas seguintes concentrações: 1:100; 1:200; 1:400; 1:800. Foram utilizados dois painéis de marcação, um utilizando-se anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD19 e outro utilizando-se anticorpos anti-CD25, anti-CD45 e anti-CCR6. Foram utilizadas 1×10^6 células por tubo de citometria para titulação e no ensaio propriamente dito. As células foram incubadas por 30 minutos com as variadas concentrações dos anticorpos de superfície, a 4°C no escuro. Após o período de incubação adicionou-se 2 mL de tampão de FACS contendo PBS e soro fetal bovino 1%. Centrifugou-se a 450g por 5 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante repetiu-se esta etapa de lavagem. Em seguida, adicionou-se 1mL da solução de trabalho Fix/Perm. As amostras foram incubadas *overnight* (16 horas) com este tampão de fixação. Sem lavar, adicionou-se 2 mL do tampão Perm e centrifugou-se por 5 minutos, 350g, 4°C. Após duas lavagens com 2 mL de tampão de FACS as células foram ressuspenso em 500 µl de paraformaldeído 1% e acondicionadas no escuro a 4°C. A leitura foi realizada em até 24 horas em citometro de fluxo FACSCalibur com 2 lasers (BD Biosciences, USA), sendo adquiridos até 100 mil eventos na *gate* de linfócitos. As análises foram realizadas por único avaliador utilizando o software FlowJo versão 10 (Treestar US, Ashland, OR). Os quadrantes foram definidos de acordo com os controles isotípicos.

Painéis de marcação:

- ✓ Painel 1: CD3 APC/ CD4 PerCP/ CD8 -FITC/ CD19 PE
- ✓ Painel 2: CD45 PE /CD25 FITC/ CCR6 APC Alexa 647
- ✓ Controles isotípicos: Rat IgG2b kpa FITC / Rat IgG2a PE /Alexa 647 Arm. Hamster IgG / Rat IgG2a PE

4.8 Análise Estatística

A análise estatística entre os grupos foi realizada empregando-se o teste de análise de variância (Two-way ANOVA) seguido por pós-teste de Bonferroni ou Kruskal Wallis, seguido por teste de Dunn, conforme propriedade respectivamente para dados paramétricos e não-paramétricos.

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M (erro padrão da média) para variáveis com distribuição normal, ou pela mediana (mínimo-máximo) no caso de variáveis sem distribuição normal, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

Para a realização dos testes estatísticos utilizou-se o software GraphPad Prism®, versão 6.01.

5. RESULTADOS

5.1 A terapia com antibióticos depleta a microbiota e mantém a depleção de bactérias intestinais por sete semanas, abole a bacteremia e a translocação bacteriana relacionadas ao tratamento com irinotecano.

A eficácia do tratamento com antibióticos em depletar a microbiota intestinal foi mensurada através da análise do crescimento bacteriano nas fezes. O coquetel de antibióticos foi administrado por dez dias antes do início do tratamento com irinotecano e mantido ao longo de mais sete semanas. As amostras foram coletadas antes do tratamento com o quimioterápico e na quinta e sétima semana após o início do tratamento. Os animais que receberam antibioticoterapia não apresentaram crescimento bacteriano nas fezes antes do início do protocolo de indução de esteato-hepatite [0% (0/20)], ou mesmo após cinco [0% (0/6)] e sete semanas da indução do modelo experimental [0% (0/5)]. Bactérias intestinais foram detectadas apenas nas amostras fecais do grupo controle negativo (salina) em todos os momentos, mas não no grupo tratado apenas com antibióticos (Tabela 5 e Figura 7A).

Tabela 5 – Eficácia da antibioticoterapia na depleção da microbiota intestinal.

Grupos	Contaminação fecal
-	100 % (20/20)
ANTB	0 % (0/20) *

Os animais receberam o coquetel de antibióticos (50 mg/Kg/dia) por 10 dias antes do início do tratamento com irinotecano. No décimo dia, amostras de bolo fecal foram cultivadas em meio BHI. O tratamento foi eficaz em depletar a microbiota intestinal de todos os animais avaliados. * $P < 0,05$ vs grupo não tratado. Para análise estatística utilizou-se Teste t de Student.

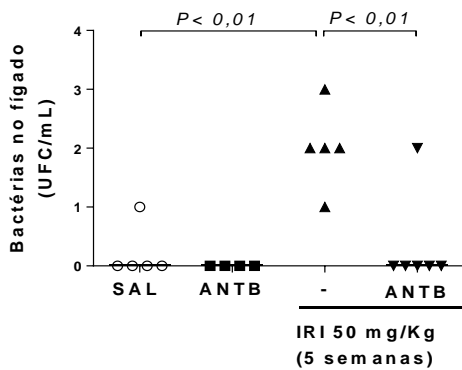
Amostras de sangue periférico também foram coletadas na quinta e sétima semana experimentais para a avaliação da bacteremia. Como mostra a Figura 7A, o crescimento bacteriano foi verificado no sangue de animais que receberam irinotecano durante cinco [66 % (4/6)] e sete semanas [60% (3/5)] e foram significativamente diferentes ($P < 0,05$) do grupo de animais tratados com antibióticos e irinotecano [0% (0/6); 0% (0/5), respectivamente]. Os grupos controle injetado com solução salina ou apenas com antibiótico não apresentaram bacteremia.

Figura 7 - Eficácia da antibioticoterapia na manutenção da depleção da microbiota intestinal, na prevenção da bacteremia e do crescimento bacteriano no fígado ao longo de sete semanas de tratamento com irinotecano.

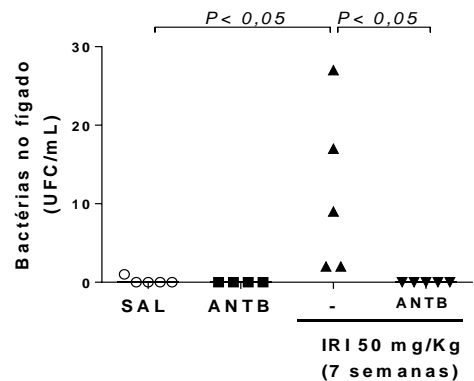
A

Grupos	Contaminação fecal		Bacteremia	
	5 semanas	7 semanas	5 semanas	7 semanas
SAL	100 % (5/5)	100 % (4/4)	0 % (0/5)	0 % (0/4)
ANTB	0 % (0/5)	0 % (0/4)	0 % (0/5)	0 % (0/4)
IRI	100 % (6/6)	100 % (5/5)	66 % (4/6)*	60 % (3/5)*
ANTB + IRI	0 % (0/6) [#]	0 % (0/5) [#]	0 % (0/6) [#]	0 % (0/5) [#]

B



C



Animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou coquetel de antibióticos (50 mg/Kg/dia, v.o.) como controle. A esteato-hepatite foi induzida com administração de irinotecano (50 mg/Kg, i.p.) durante cinco ou sete semanas associado ou não à administração de antibióticos (n=4-6). Ao final do tratamento foram colhidas amostras de bolo fecal, sangue periférico e tecido hepático para cultura bacteriana. O tratamento com antibióticos manteve a depleção da microbiota intestinal (A), preveniu a bacteremia (A) e o crescimento bacteriano no fígado induzidos por irinotecano ao longo de cinco (B) e sete semanas (C). * $P < 0,05$ vs grupo SAL; [#] $P < 0,05$ vs grupo IRI.

Para avaliar o potencial do tratamento com antibióticos em prevenir a translocação bacteriana para o fígado dos animais, amostras de fígado foram coletadas, homogêneas e cultivadas em meio não seletivo. A contagem do número de colônias bacterianas evidenciou que a antibioticoterapia impede a translocação bacteriana para o fígado em curso após a injeção de irinotecano. As amostras coletadas de camundongos tratados com IRI apresentaram um crescimento bacteriano significativo na quinta semana ($2,0 \pm 0,3$) (Figura 7B) e sétima semana ($11,4 \pm 0,8$ UFC/mL) (Figura 7C), o que foi prevenido pelo tratamento antibiótico em

ambos os momentos (5ª semana: $0,3 \pm 0,3$ UFC/mL; 7ª semana: $0,0 \pm 0,0$ UFC/mL). Não houve crescimento bacteriano significativo no fígado dos animais dos grupos controle salina e antibióticos (Figura 7 B e C) ($P < 0,05$).

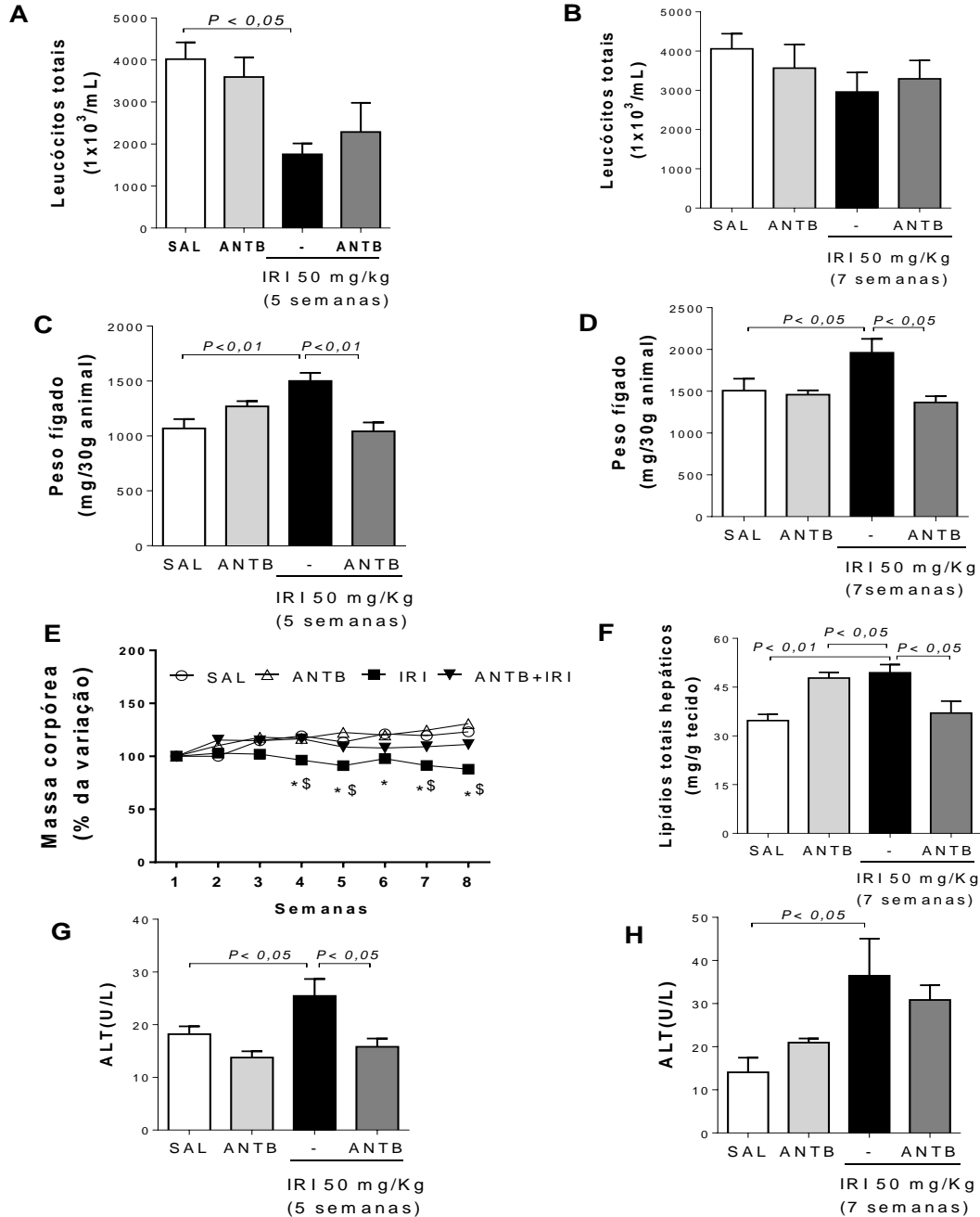
5.1.2 Antibioticoterapia previne o desenvolvimento da esteato-hepatite induzida por irinotecano.

Ao final da quinta e sétima semana de tratamento com irinotecano, amostras de sangue periférico foram coletadas para avaliação da leucopenia induzida por quimioterapia e demais análises bioquímicas. Foi observado que a administração de irinotecano foi capaz de induzir uma leucopenia significativa após cinco semanas de tratamento ($1755 \pm 261,6 \times 10^3$ /mL) (Figura 8A) quando comparado ao grupo controle salina ($4020 \pm 399,8 \times 10^3$ /mL). Não houve diferença entre os grupos que receberam irinotecano isoladamente com ($1755 \pm 261,6 \times 10^3$ /mL) ou associado aos antibióticos ($2288 \pm 694,4 \times 10^3$ /mL). Na sétima semana experimental, não foi observada diferença nesse parâmetro entre os grupos (IRI: $2957 \pm 501,0 \times 10^3$ /mL vs. SAL: $4058 \pm 386,5 \times 10^3$ /mL; $P < 0,05$) (Figura 8B).

O fígado dos animais foi removido em sua totalidade e pesado para avaliação do peso úmido. A lesão do tecido hepático também foi evidenciada pela significativa hepatomegalia na quinta ($1500 \pm 74,25$ mg/30g, Figura 8C) e sétima ($1962 \pm 165,3$ mg/30g, Figura 8D) semanas experimentais em camundongos injetados com irinotecano quando comparado aos controles. Os animais que receberam o coquetel de antibióticos associado ao quimioterápico tiveram uma redução significativa desse parâmetro nas duas avaliações (5ª semana: $1041 \pm 81,71$ mg/30g; 7ª semana: $1366 \pm 74,31$ mg/30g) em comparação ao grupo tratado apenas com irinotecano.

Semanalmente os camundongos foram pesados, desde a primeira administração do quimioterápico até o dia da eutanásia. A figura 8E mostra a perda de massa corporal induzida pela quimioterapia com irinotecano ocorrendo a partir da quarta semana experimental e atingindo um percentual de redução de 29% após sete semanas de administração de irinotecano quando comparada ao grupo salina. O tratamento com coquetel de antibióticos foi eficaz em prevenir de maneira significativa ($P < 0,05$) a perda ponderal observada nesses animais na quarta, quinta, sétima e oitava semana.

Figura 8 – Efeito da antibioticoterapia sobre a leucopenia, aumento do peso úmido do fígado, alterações bioquímicas e perda ponderal após cinco ou sete semanas de tratamento com irinotecano.



Animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou coquetel de antibióticos (50 mg/Kg/dia, v.o) como controle. A esteato-hepatite foi induzida com administração de irinotecano (50mg/Kg, i.p.) durante cinco ou sete semanas associado ou não à administração de antibióticos (n=5-10). Semanalmente os animais foram pesados. O fígado foi removido e pesado, amostras de sangue periférico foram colhidas. Irinotecano causa leucopenia na quinta semana de tratamento (A), mas não na sétima (B). O tratamento com antibióticos previne o aumento do peso úmido do fígado (C e D), previne perda ponderal (E), o acúmulo de lipídios no fígado (F), aumento da enzima ALT na quinta semana de tratamento (G), mas não na sétima (H). * $P < 0,05$ vs grupo SAL; $^{\$}P < 0,05$ vs grupo ANT+IRI. Para a análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni.

Dosagens bioquímicas foram realizadas no fígado de animais para determinação de lipídios totais e no sangue para dosagem da enzima ALT. O acúmulo de lipídios característico da esteato-hepatite foi observado após 7 semanas de tratamento com irinotecano (IRI: $49,4 \pm 2,5$ mg/g vs. SAL: $34,7 \pm 2$ mg/g), além disso, houve aumento nos níveis de ALT tanto na quinta semana (IRI: $25,5 \pm 3,2$ U/L vs. SAL: $18,1 \pm 1,5$ U/L) quanto na sétima semana de tratamento quando comparado ao controle salina (IRI: $36,5 \pm 8,6$ U/L vs. SAL: $14 \pm 3,4$ U/L). O acúmulo de lipídios na sétima semana e o aumento de ALT na quinta semana de tratamento foram prevenidos quando administrados antibióticos ($37 \pm 3,7$ mg/g, Figura 8F; $15,8 \pm 1,5$ U/L; Figura 8G vs controles respectivamente), mas antibióticos não reduziram a atividade de ALT na sétima semana comparado ao grupo irinotecano (IRI: $36,5 \pm 8,6$ U/L vs. IRI+ANTB: $30,85 \pm 3,4$ U/L; Figura 8H). O tratamento apenas com salina e antibióticos não promoveu alteração na atividade da enzima (Figura 8G-H).

5.1.3 A depleção da microbiota intestinal melhora o dano hepático induzido por irinotecano.

Após cinco semanas de tratamento com o quimioterápico irinotecano, pode-se observar por meio de exame histopatológico do fígado o estabelecimento de critérios de dano tecidual associados à esteato-hepatite, a saber: aumento da inflamação lobular [1 (1-2)] e balonização celular [1,5 (0-2)]. O somatório de todos os parâmetros avaliados também se mostrou estatisticamente significativo quando comparado ao grupo salina [IRI: 3 (2-4) vs. SAL: 1,5 (0-1)]. Todas as alterações observadas foram prevenidas pelo tratamento com antibióticos [Inflamação lobular: 1 (0-1); Balonização celular: 1 (0-2); Somatório: 2 (1-3), respectivamente] (Tabela 6).

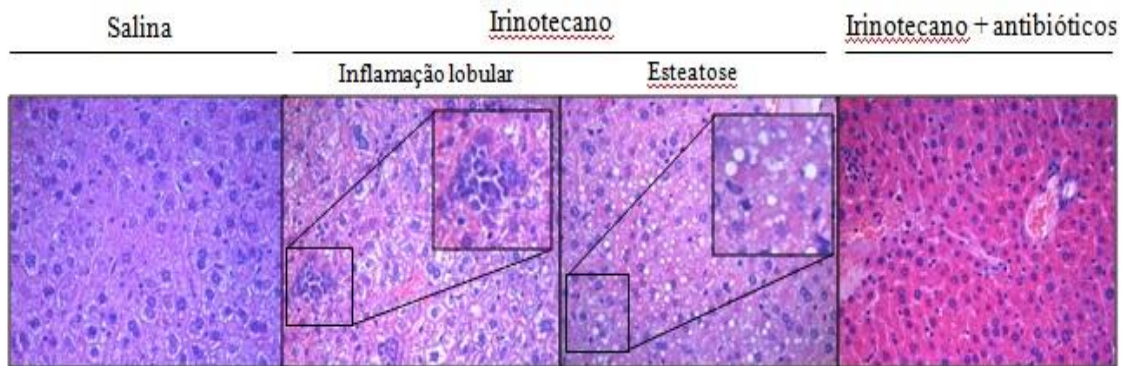
A Figura 9 mostra o resultado da avaliação histopatológica após sete semanas de tratamento. Irinotecano induz inflamação lobular [1,5 (1-3)] e esteatose hepática [1,5 (1-3)] significativa e aumenta os escore final de Kleiner [5 (3-7)] em relação ao controle. Tanto a inflamação lobular [1 (0-3)] quanto o escore final de Kleiner [3 (1-7)] foram atenuados pelo tratamento com antibióticos.

Tabela 6- Efeito da antibioticoterapia sobre as alterações histopatológicas induzidas após cinco semanas de tratamento com irinotecano.

Grupos	Alterações histológicas			Escores final Kleiner (0-8)
	Inflamação Lobular (0-3)	Esteatose (0-3)	Balonização (0-2)	
SAL	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	1 (0 - 1)	1,5 (0 - 1)
ANTB	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	2 (0 - 2)	1 (0 - 2)
IRI	1 (1 - 2)*	0 (0 - 2)	1,5 (0 - 2)*	3 (2 - 4)*
ANTB + IRI	1 (0 - 1) [#]	0 (0 - 2)	1 (0 - 2) [#]	2 (1 - 3) [#]

Animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou coquetel de antibióticos (50 mg/Kg/dia, v.o.) como controle. A esteato-hepatite foi induzida com administração de irinotecano (50mg/Kg, i.p.) durante cinco semanas associado ou não à administração de antibióticos (n=5-10). O fígado foi coletado após eutanásia e processado para análise histopatológica. O tratamento com antibióticos foi capaz de prevenir a inflamação lobular, balonização e o escore final de Kleiner. * $P < 0,05$ vs grupo SAL; [#] $P < 0,05$ vs grupo IRI. Para a análise utilizou-se o teste de Kruskal-wallis seguido por pós-teste de Dunn.

Figura 9- Efeito da antibioticoterapia sobre as alterações histopatológicas no fígado após sete semanas de tratamento com irinotecano.



Alterações histológicas				
Grupos	Inflamação Lobular (0-3)	Esteatose (0-3)	Balonização (0-2)	Escores final Kleiner (0-8)
SAL	1 (0 - 1)	0 (0 - 0)	2 (0 - 2)	2 (1 - 3)
ANTB	0 (0 - 1)	0 (0 - 0)	2 (0 - 2)	2 (1 - 3)
IRI	1,5 (1 - 3)*	1,5 (1 - 3)*	1 (0 - 1)	5 (3 - 7)*
ANTB + IRI	1 (0 - 3) [#]	1,5 (0 - 3)	1 (0 - 1)	3 (1 - 7) [#]

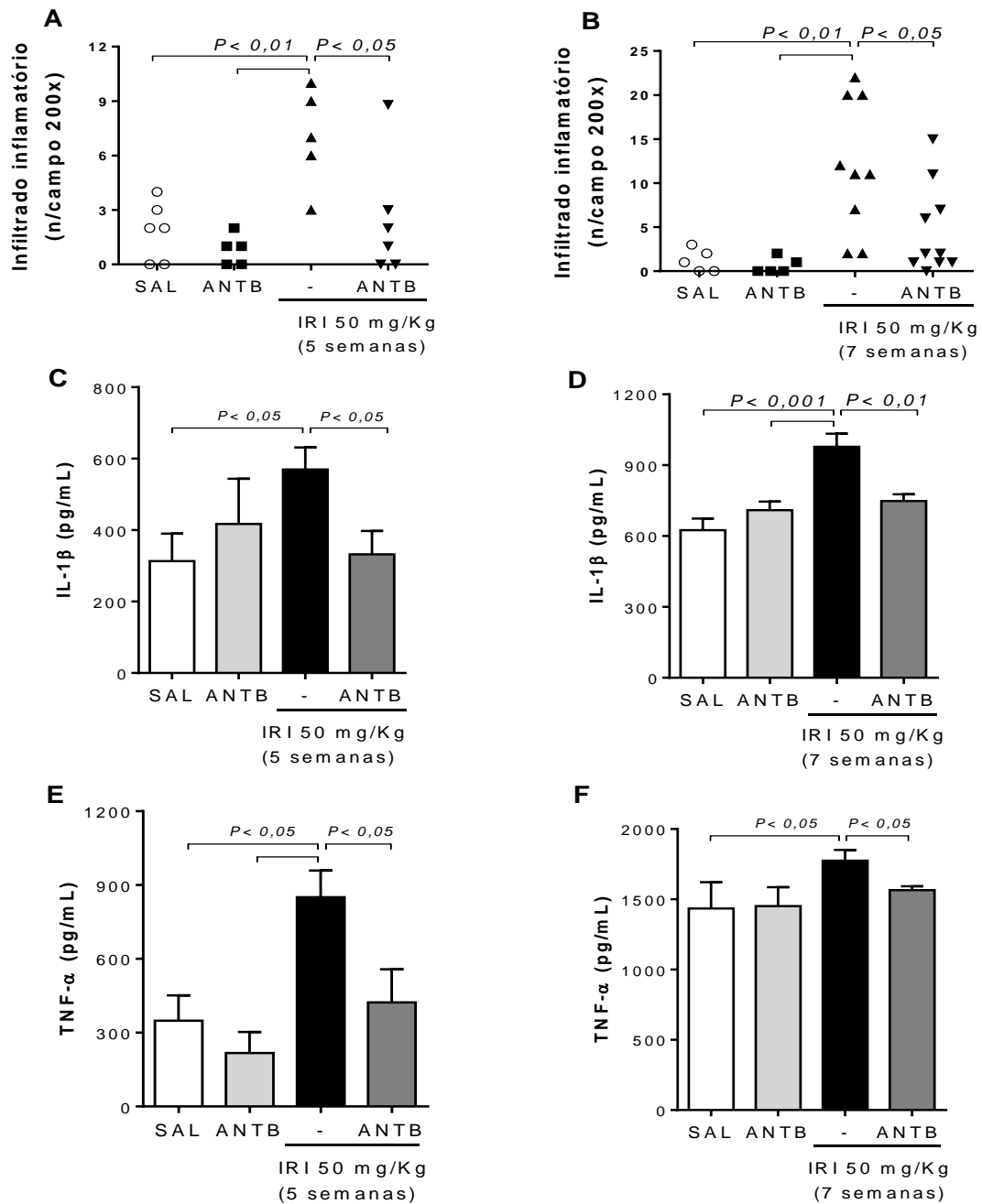
Animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou coquetel de antibióticos (50 mg/Kg/dia, v.o.) como controle. A esteato-hepatite foi induzida com administração de irinotecano (50mg/Kg, i.p.) durante sete semanas associado ou não à administração de antibióticos (n=5-10) O fígado foi coletado após eutanásia e processado para análise histopatológica. O tratamento com irinotecano causou inflamação lobular e esteatose hepática. O tratamento com antibióticos foi capaz de prevenir a inflamação lobular e o escore final de Kleiner. O grupo controle salina não mostrou alterações significativas. Aumento 400x. * $P < 0,05$ vs grupo SAL; [#] $P < 0,05$ vs grupo IRI. Para a análise utilizou-se o teste de Kruskal-wallis seguido por pós-teste de Dunn.

5.1.4 Tratamento com antibióticos previne o estabelecimento de parâmetros inflamatórios no fígado de animais com esteato-hepatite induzida por irinotecano.

Animais tratados com irinotecano tiveram seus fígados removidos após cinco ou sete semanas de tratamento para avaliação de diferentes parâmetros inflamatórios. A análise em lâmina avaliou o número de focos de células inflamatórias. O fígado de animais que receberam irinotecano mostraram um aumento no infiltrado inflamatório quando comparado ao grupo salina, tanto após cinco (SAL: $1,8 \pm 0,6$ focos/campo vs IRI: $8,2 \pm 1,5$ focos/campo; Figura 10A) quanto após sete semanas (SAL: $1,2 \pm 0,6$ vs. IRI: $11,9 \pm 2,5$; Figura 10B) de administração do quimioterápico. O tratamento com antibióticos preveniu de maneira significativa o acúmulo dessas células (5ª semana: $2,5 \pm 1,3$ focos/campo; 7ª semana: $4,6 \pm 1,6$ focos/campo; Figura 10A e B).

Os níveis hepáticos de citocinas pró-inflamatórias também foram mensurados, como mostra a Figura 10. Um aumento significativo nos níveis de IL-1 β foi observado em animais que receberam injeção de irinotecano nos dois protocolos de indução de esteato-hepatite (5ª semana: $569,6 \pm 61,6$ pg/mL; 7ª semana: $977,8 \pm 55,6$ pg/mL) vs. controle salina (5ª semana: $313,2 \pm 77$ pg/mL; 7ª semana: 625 ± 49 pg/mL) (Figura 10C e D). De forma semelhante, os níveis de TNF- α também se mostraram aumentados nesse grupo (5ª semana: $422,8 \pm 135,0$ pg/mL; 7ª semana: $1565 \pm 27,7$ pg/mL) vs. controle salina (5ª semana: $348,3 \pm 103,6$ pg/mL; 7ª semana: $1434 \pm 187,6$ pg/mL) (Figura 10E e F). Entretanto, ambas as citocinas estavam reduzidas naqueles animais em tratamento quimioterápico que receberam o coquetel de antibióticos (IL-1 β 5ª semana: $332,0 \pm 65,8$ pg/mL; 7ª semana: $748,2 \pm 28,9$ pg/mL vs. apenas irinotecano) (TNF- α 5ª semana: $422,8 \pm 135,0$ pg/mL; 7ª semana: $1565 \pm 27,7$ pg/mL vs. apenas irinotecano).

Figura 10 – Efeito da antibioticoterapia sobre o infiltrado inflamatório e níveis de citocinas inflamatórias no fígado de animais após cinco ou sete semanas de tratamento com irinotecano.

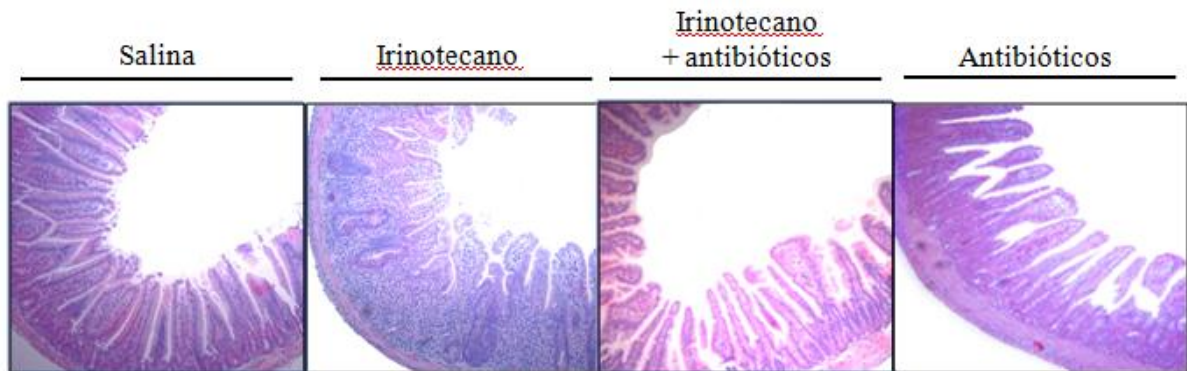


Animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou coquetel de antibióticos (50 mg/Kg/dia, v.o.) como controle. A esteato-hepatite foi induzida com administração de irinotecano (50mg/Kg, i.p.) durante cinco ou sete semanas associado ou não à administração de antibióticos (n=5-10). Ao final do tratamento, o fígado foi removido e processado para contagem dos focos de células inflamatórias em lâmina ou armazenado para posterior dosagem de citocinas. O tratamento com antibióticos previne o acúmulo de células inflamatórias (A e B) e aumento dos níveis de citocinas IL-1β (C e D) e TNF-α (E e F) induzidos por irinotecano após cinco e sete semanas de tratamento. Para a análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni.

5.1.5 Antibioticoterapia previne o dano intestinal induzido por irinotecano.

A Figura 11 mostra que o tratamento com irinotecano causou considerável dano intestinal nos animais que receberam o tratamento por sete semanas consecutivas, evidenciado através de fotomicrografias do íleo e dos escores adaptados de mucosite intestinal. O tratamento com o coquetel de antibióticos atenuou a alteração da arquitetura das criptas intestinais [IRI: 2 (1-3) vs. IRI+ANTB: 0 (0-1)], a estratificação celular [IRI: 2 (0-3) vs. IRI+ANTB: 1(0-1)], regeneração celular [IRI: 2 (2-3) vs. IRI+ANTB: 1 (0-2)], infiltração de células inflamatórias na lâmina própria [IRI: 2 (2-3) vs. IRI+ANTB: 1 (0-2)], além da redução da proporção vilos/cripta causadas pelo tratamento prolongado com o quimioterápico [IRI: 1 (1- 2) vs. IRI+ANTB: 0 (0- 2)]. Irinotecano também foi capaz de aumentar o somatório de todos esses critérios de forma significativa quando comparado ao controle salina [IRI: 9 (7-12) vs. SAL: 2 (0- 3)]. Além disso, a antibioticoterapia reduziu o critério global de dano intestinal [IRI+ANTB: 3 (2- 6)].

Figura 11 - Efeito da antibioticoterapia sobre as alterações histopatológicas no intestino após sete semanas de tratamento com irinotecano.



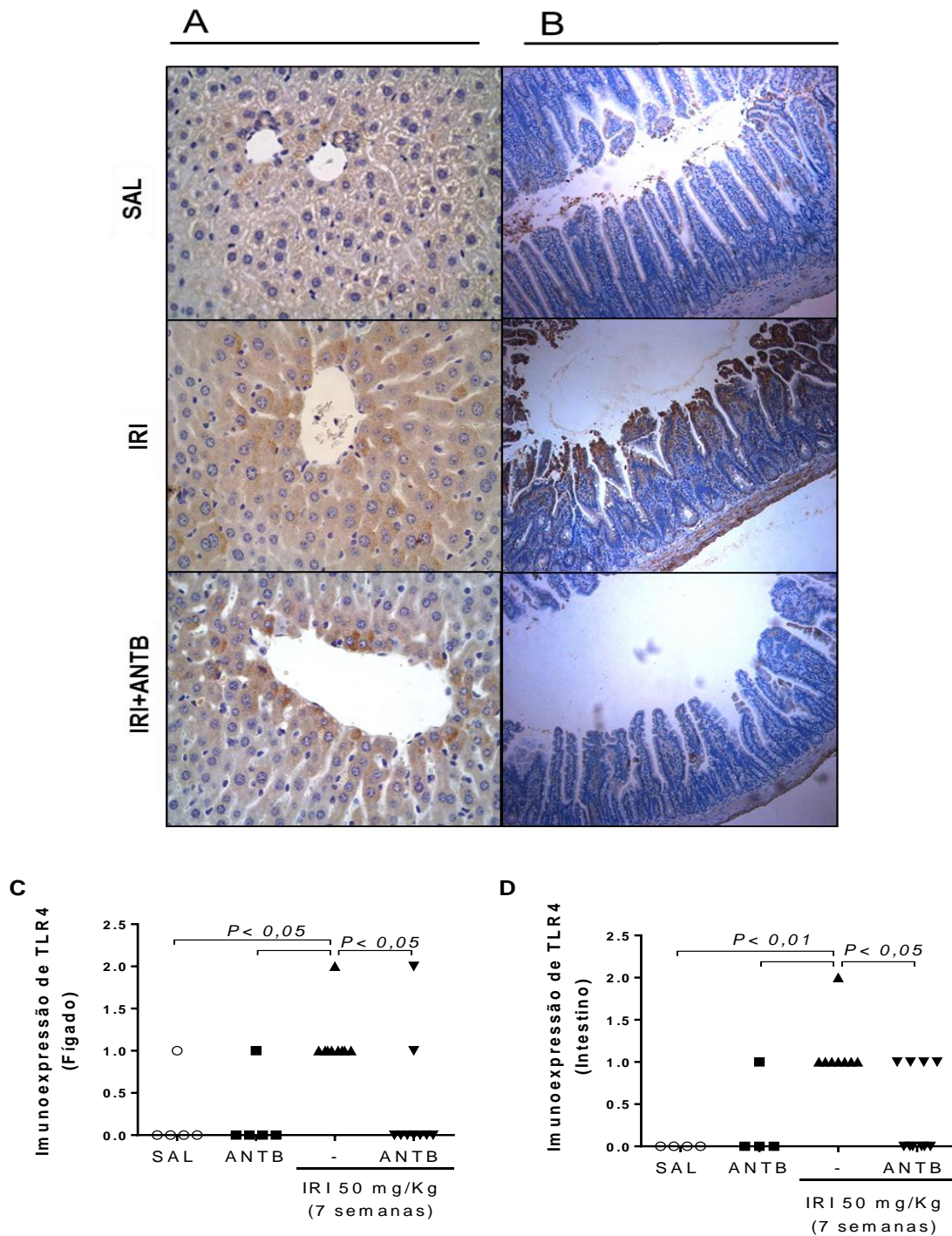
Parâmetros Histopatológicos – Íleo						
Grupos	Arquitetura (0-3)	Estratificação (0-3)	Regeneração (0-3)	Inflamação (0/3)	Vilo/cripta (0/3)	Escore final (0-15)
SALINA	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	1 (0-1)	0 (0-1)	2 (0-3)
ANTB	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	1 (0-3)
IRI	2 (1-3)*	2 (0-3)*	2 (2-3)*	2 (2-3)*	1 (1-2)*	9 (7-12)*
IRI + ANTB	0 (0-1) [#]	1 (0-1) [#]	1 (0-2) [#]	1 (0-2) [#]	0 (0-2) [#]	3 (2-6) [#]

Animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou coquetel de antibióticos (50 mg/Kg/dia, v.o.) como controle. A esteato-hepatite foi induzida com administração de irinotecano (50mg/Kg, i.p.) durante sete semanas associado ou não à administração de antibióticos (n=5-10). O íleo foi coletado após eutanásia e processado para análise histopatológica. O tratamento com irinotecano causou alterações na arquitetura intestinal, estratificação e regeneração celular, inflamação, redução na razão vilo/cripta e do escore final de dano intestinal. O tratamento com antibióticos foi capaz de prevenir todos os parâmetros avaliados. Os grupos controle salina e antibióticos não mostraram alterações significativas. Aumento 100x. * $P < 0,05$ vs grupo SAL; [#] $P < 0,05$ vs grupo IRI. Para a análise utilizou-se o teste de Kruskal-wallis seguido por pós-teste de Dunn.

5.1.6 Tratamento com antibióticos reduz a expressão do receptor *Toll-like 4* no fígado e intestino de animais com esteato-hepatite.

Após sete semanas de indução do modelo de esteato-hepatite, uma porção do fígado e do íleo de camundongos foram retirados para avaliação da expressão do receptor *Toll-like 4* por imuno-histoquímica. O resultado da avaliação mostrou que houve uma imunoexpressão aumentada de TLR4 no fígado dos animais injetados com irinotecano [1 (1-2)] quando comparado ao controle salina [0 (0-1)], enquanto o tratamento com antibióticos reduziu esse parâmetro [0 (0-2)] (Figura 12A e C). A avaliação do intestino mostrou um resultado semelhante, no qual a depleção da microbiota intestinal realizada com antibióticos resultou na redução da imunoexpressão desse receptor [0 (0-1)] quando comparado ao grupo de animais injetados apenas com irinotecano [1 (1-2)] (Figura 12B e D).

Figura 12 – Efeito da antibioticoterapia sobre a imunoposição de receptor *Toll-like 4* no fígado e intestino de animais após sete semanas de tratamento com irinotecano.

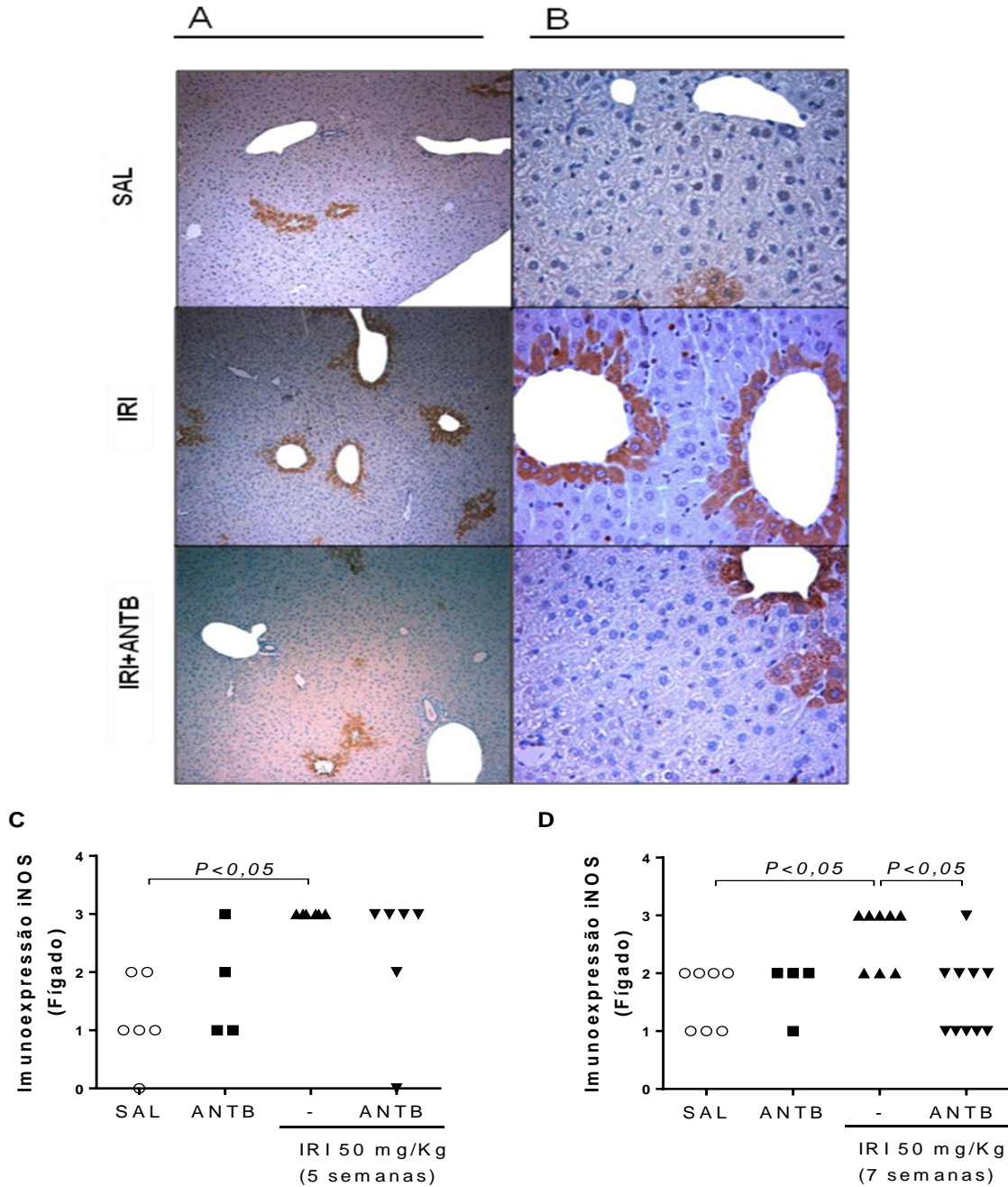


Animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou coquetel de antibióticos (50 mg/Kg/dia, v.o.) como controle. A esteato-hepatite foi induzida com administração de irinotecano (50mg/Kg, i.p.) durante sete semanas associado ou não à administração de antibióticos (n=5-10). Ao final do tratamento, o fígado e intestino foram removidos para avaliação por imunohistoquímica da expressão do receptor *Toll-like 4*. O tratamento com antibióticos preveniu o aumento da imunomarcagem de TLR4 no fígado (A e C; Aumento 400x) e intestino (B e D; Aumento 100x) de animais induzidos por irinotecano. Para a análise utilizou-se o teste de Kruskal-wallis seguido por pós-teste de Dunn.

5.1.7 Antibioticoterapia previne o aumento da imunexpressão de iNOS no fígado de animais com esteato-hepatite.

A Figura 13 mostra a avaliação por meio de escores da expressão de iNOS no fígado de animais em dois protocolos distintos de indução de esteato-hepatite. Na avaliação feita após cinco semanas de tratamento com o quimioterápico, observou-se um aumento da expressão dessa enzima em comparação com grupo controle salina [IRI: 3 (3-3) vs. SAL: 1(0-2)], sem haver redução significativa quando da associação do quimioterápico com antibióticos [IRI+ANTB: 3(0-3) vs. IRI: 3(3-3)] (Figura 13C). No entanto, na avaliação realizada após sete semanas de indução de esteato-hepatite, o aumento da imunexpressão de iNOS no fígado induzido pelo irinotecano foi prevenido quando animais receberam tratamento com antibióticos [IRI: 3 (2-3) vs. IRI+ANTB: 1,5 (1-3)] (Figura 13A, B e D) ($P < 0,05$).

Figura 13 - Efeito da antibioticoterapia sobre a imunoe expressão de iNOS no fígado de animais após cinco e sete semanas de tratamento com irinotecano.



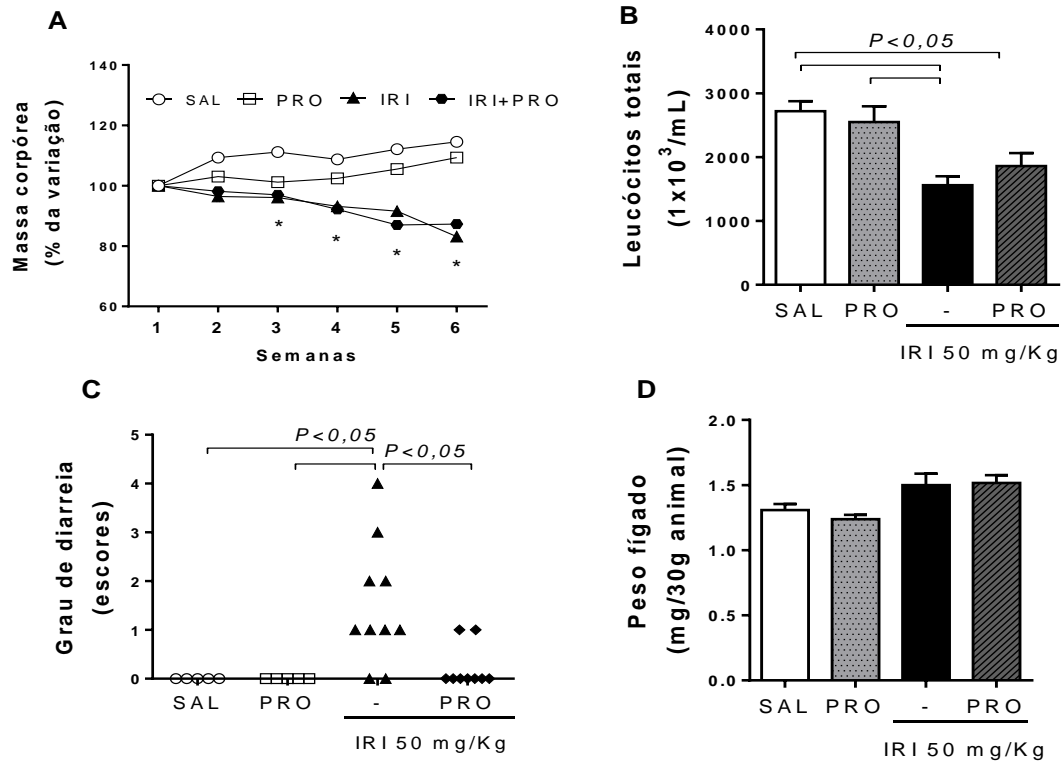
Animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou coquetel de antibióticos (50 mg/Kg/dia, v.o.) como controle. A esteato-hepatite foi induzida com administração de irinotecano (50mg/Kg, i.p.) durante cinco ou sete semanas associado ou não à administração de antibióticos (n=5-10). Ao final do tratamento, o fígado foi removido para avaliação por imunohistoquímica da expressão de iNOS. O tratamento com antibióticos preveniu o aumento da imunomarcação de iNOS no fígado de animais após sete semanas de administração de irinotecano (D), como mostram as fotomicrografias (A: aumento 100x; e B: aumento de 400x) Não houve diferença após cinco semanas de tratamento (C). Para a análise utilizou-se o teste de Kruskal-wallis seguido por pós-teste de Dunn.

5.2 Avaliação do efeito do uso de probióticos sobre os parâmetros gerais da esteato-hepatite por irinotecano.

Camundongos receberam suspensão de probióticos ao longo de cinco semanas de indução do modelo de esteato-hepatite. Para avaliação dos parâmetros gerais, os animais foram submetidos a pesagens semanais e a gravidade da diarreia foi avaliada ao final do tratamento. Amostras de sangue foram colhidas e o fígado foi removido para pesagem após eutanásia. A administração de irinotecano induziu uma acentuada perda de massa corpórea nos animais de forma tempo dependente (Figura 14A), observada a partir da segunda semana de tratamento, atingindo um percentual de 27,4% de redução na última semana quando comparado ao controle salina ($P < 0,05$), redução esta que não foi prevenida quando da administração de probióticos ($P > 0,05$, Figura 14A).

Para avaliar o efeito citotóxico do fármaco, o número de leucócitos totais em sangue periférico foi mensurado. Irinotecano causou leucopenia (SAL: $2720 \pm 157,0 \times 10^3/\text{mL}$ vs. IRI: $1561 \pm 138,9 \times 10^3/\text{mL}$) e aumentou o escore de diarreia após cinco semanas de tratamento [SAL: 0 (0-0) vs. IRI: 1 (0-4)]. A administração de probióticos foi eficaz em atenuar a diarreia causada [IRI+PRO: 0 (0-1), Figura 14C], mas não em reduzir a citotoxicidade do quimioterápico (IRI+PRO: $1859 \pm 203,7 \times 10^3/\text{mL}$; Figura 14B). Não houve diferença no peso úmido do fígado entre os grupos avaliados (Figura 14D).

Figura 14 - Efeito da administração de probióticos sobre a variação de massa corpórea, contagem de leucócitos, grau de diarreia e peso úmido do fígado em animais tratados com irinotecano.

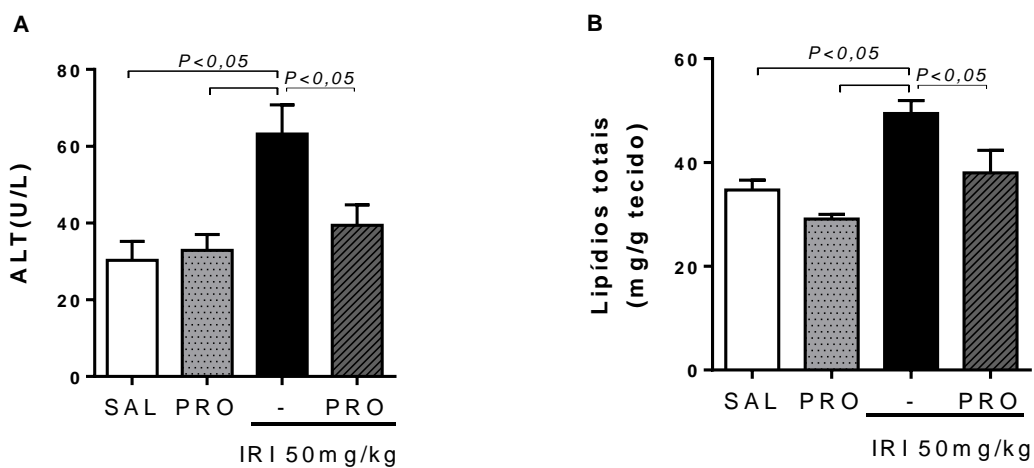


Animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou suspensão de probióticos (1×10^7 UFC/mL, v.o.) como controle. A esteato-hepatite foi induzida com administração de irinotecano (50mg/Kg, i.p.) durante cinco semanas associado ou não à administração de probióticos (n=5-10). Os animais foram pesados semanalmente e a gravidade da diarreia foi avaliada ao final do período experimental. Amostras de sangue e fígado foram coletadas. O tratamento com probióticos não preveniu a perda ponderal (A) e a leucopenia induzidas por irinotecano (B), porém, foi capaz de reverter a diarreia (C). Não houve diferença no peso úmido do fígado (D). Para a análise estatística de dados paramétricos utilizou-se o teste ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni, para não-paramétricos utilizou-se o teste de Kruskal-wallis seguido por pós-teste de Dunn.

5.2.1 Probióticos melhoram as alterações nos parâmetros bioquímicos relacionados à esteato-hepatite induzida por irinotecano.

Amostras de sangue e de fígado foram colhidas para mensurar o potencial dos probióticos em proteger contra o desenvolvimento de alterações bioquímicas, como mostra a Figura 15. Foi observado que o irinotecano induziu de maneira significativa o aumento da atividade da enzima *alanina aminotransferase* (ALT) no sangue de camundongos, em comparação com o grupo salina (SAL: $30,3 \pm 4,9$ U/L vs. IRI: $63,2 \pm 7,6$ U/L; Figura 15A). Além disso, uma outra análise bioquímica mostrou um acúmulo de lipídios no tecido hepático de animais tratados com o quimioterápico (SAL: $34,7 \pm 1,9$ mg/g vs. IRI: $49,4 \pm 2,5$ mg/g; Figura 15B). Todos esses parâmetros estavam reduzidos em animais tratados com probióticos comparativamente com animais injetados apenas com irinotecano (IRI+PRO: $39,4 \pm 5,3$ U/L e $38 \pm 4,3$ mg/g vs. IRI valores respectivos) ($P < 0,05$).

Figura 15 - Efeito da administração de probióticos sobre a dosagem da enzima *Alanina aminotransferase* (ALT) e de lipídios totais no fígado de animais tratados com irinotecano.



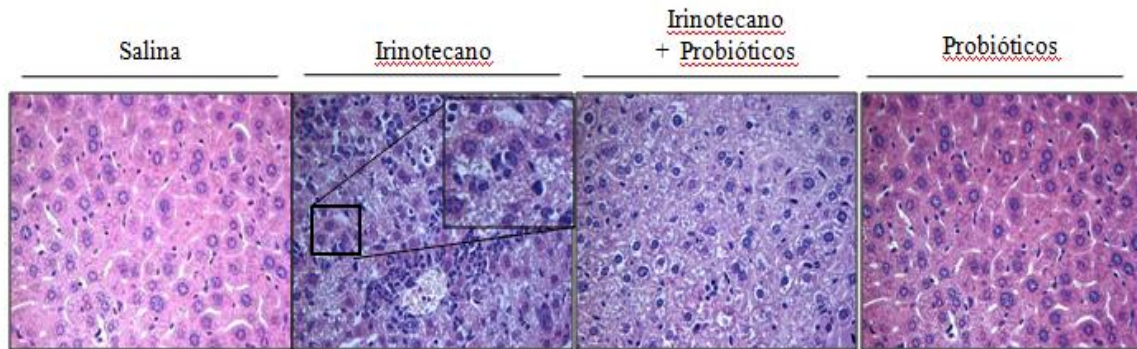
Animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou suspensão de probióticos (1×10^7 UFC/mL, v.o.) como controle. A esteato-hepatite foi induzida com administração de irinotecano (50mg/Kg, i.p.) durante cinco semanas associado ou não à administração de probióticos. Amostras de fígado foram coletadas ao final do período experimental. O tratamento com probióticos preveniu o aumento nos níveis de ALT (A) e o acúmulo de lipídios no fígado de animais induzidos por irinotecano (B). Para a análise estatística foi utilizado o teste ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni.

5.2.2 Probióticos previnem contra o dano tecidual hepático e intestinal induzido por irinotecano.

A indução do modelo de esteato-hepatite foi avaliada utilizando-se os critérios microscópicos estabelecidos por Kleiner, como mostra a Figura 16. O fígado dos animais após cinco semanas de tratamento com irinotecano mostrou um escore final significativamente maior do que dos animais que receberam salina [SAL: 2 (1-3) vs. IRI: 4,5 (2-6)]. Além disso, os parâmetros individuais de inflamação lobular [SAL: 2 (1-3) vs. IRI: 0 (0-1)] e esteatose também se mostraram diferentes do controle [SAL: 1 (0-1) vs. IRI: 2 (0-2)]. Os animais tratados com o probiótico mostraram uma redução do dano histopatológico e do escore global [IRI+PRO: 3(2-3)], além de uma menor esteatose [IRI+PRO: 0 (0-1)] quando comparado ao grupo irinotecano.

No intestino, observou-se que o tratamento com o quimioterápico foi capaz de causar dano intestinal e que a administração de probióticos efetivamente reduziu a alteração da arquitetura das criptas intestinais [IRI: 2 (1-3) vs. IRI+PRO: 0,5 (0-1)], a estratificação celular [IRI: 2 (2-3) vs. IRI+PRO: 1,5(0-2)], a alteração da proporção vilo/cripta [IRI: 2 (1-3) vs. IRI+PRO: 0 (0-2)] e do somatório de todos os critérios [IRI: 10 (7-12) vs. IRI+PRO: 5 (3-8)]. O irinotecano aumentou o infiltrado inflamatório, porém, o tratamento com probióticos não foi capaz de prevenir esse aumento [IRI: 2 (1-2) vs. IRI+PRO: 1 (1-2)]. Não houve diferença entre os grupos estudados quando foi avaliada a regeneração celular [IRI: 2 (1-2) vs. IRI+PRO: 2 (1-2)] (Tabela 7).

Figura 16- Efeito da administração de probióticos sobre as alterações histopatológicas no fígado de animais tratados com irinotecano.



Alterações histológicas

Grupos	Inflamação Lobular (0-3)	Esteatose (0-3)	Balonização (0-2)	Escores final Kleiner (0-8)
SAL	0 (0 - 1)	1 (0 - 1)	1 (1 - 2)	2 (1 - 3)
PRO	0 (0 - 1)	0 (0 - 1)	1 (0 - 1)	2 (0 - 2)
IRI	2 (1 - 3)*	2(0 - 2)*	2 (1 - 2)	4,5 (2 - 6) *
IRI+PRO	1 (1 - 1)	0 (0 - 1) [#]	1,5 (1 - 2)	3 (2 - 3) [#]

Animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou suspensão de probióticos (1×10^7 UFC/mL, v.o.) como controle. A esteato-hepatite foi induzida com administração de irinotecano (50mg/Kg, i.p.) durante cinco semanas associado ou não à administração de antibióticos. O fígado foi coletado após eutanásia e processado para análise histopatológica. O tratamento com irinotecano causou inflamação lobular e esteatose hepática. O tratamento com probiótico foi capaz de prevenir a esteatose e o escore final de lesão hepática. Os grupos controle salina e probióticos não mostraram alterações significativas. Aumento 400x. * $P < 0,05$ vs grupo SAL; [#] $P < 0,05$ vs grupo IRI. Para a análise utilizou-se o teste de Kruskal-wallis seguido por pós-teste de Dunn.

Tabela 7 - Efeito da administração de probióticos sobre as alterações histopatológicas no intestino de animais tratados com irinotecano.

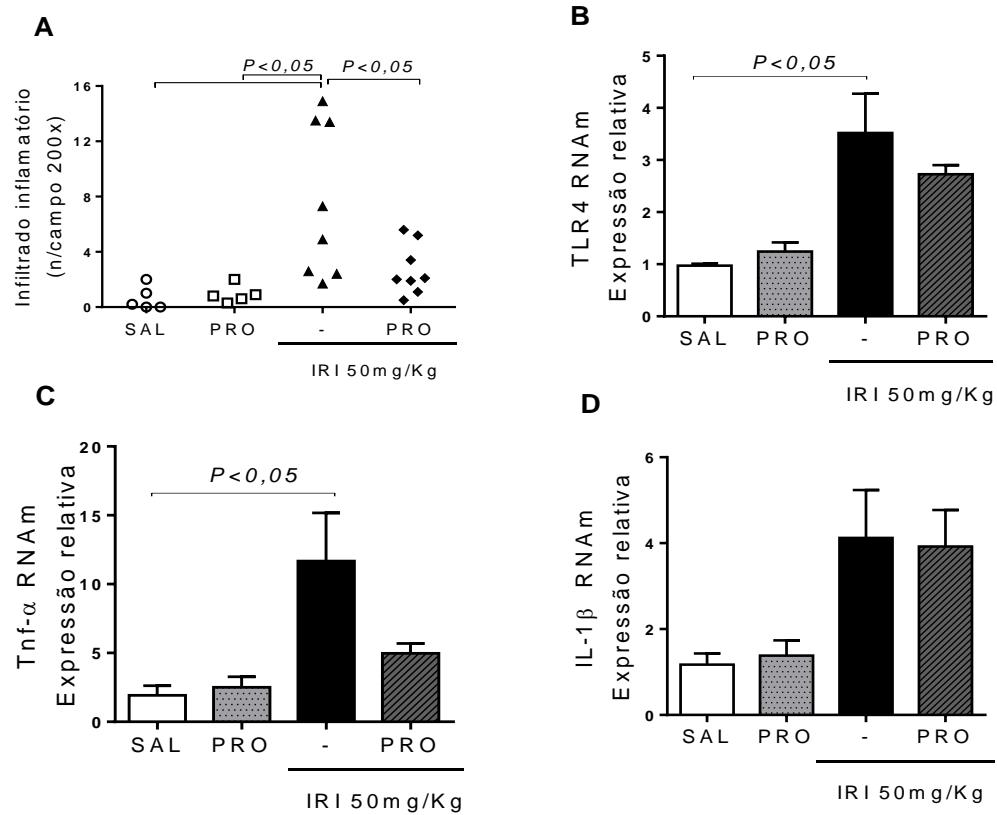
Parâmetros Histopatológicos – Íleo						
Grupos	Arquitetura (0-3)	Estratificação (0-3)	Regeneração (0-3)	Inflamação (0/3)	Vilo/ cripta (0/3)	Escore final (0-15)
SALINA	0 (0 - 0)	0,5 (0 - 1)	1 (1 - 2)	1 (1 - 1)	0 (0 - 1)	3,5 (3 - 5)
PRO	1(1 - 2)	2 (1 - 2)	2 (1 - 2)	1 (1 - 1)	0 (0 - 1)	5 (4 - 8)
IRI	2 (1 - 3)*	2 (2 - 3)*	2 (1 - 2)	2 (1 - 2)*	2(1 - 3)*	10 (7 - 12)*
IRI + PRO	0,5 (0 - 1) #	1,5 (0 - 2) #	2 (1 - 2)	1 (1 - 2)	0 (0 - 2) #	5 (3 - 8) #

Animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou suspensão de probióticos (1×10^7 UFC/mL, v.o.) como controle. A esteato-hepatite foi induzida com administração de irinotecano (50mg/Kg, i.p.) durante cinco semanas associado ou não à administração de antibióticos. O íleo foi coletado após eutanásia e processado para análise histopatológica. O tratamento com probióticos foi capaz de prevenir alterações na arquitetura intestinal, estratificação, redução na razão vilos/criptas e do escore final de dano intestinal induzido por irinotecano. Os grupos controle salina e probióticos não mostraram alterações significativas. * $P < 0,05$ vs grupo SAL; # $P < 0,05$ vs grupo IRI. Para a análise utilizou-se o teste de Kruskal-wallis seguido por pós-teste de Dunn.

5.2.3 Probióticos previnem o acúmulo de células inflamatórias na esteato-hepatite induzida por irinotecano.

O fígado dos animais foi coletado após cinco semanas do início do tratamento com irinotecano para contagem em lâmina do número de focos de células inflamatórias, avaliação da expressão gênica de receptor *Toll-like* 4 e dosagem de citocinas. O tratamento com irinotecano aumentou o infiltrado inflamatório (SAL: $0,6 \pm 0,4$ focos/campo vs. IRI: $7,6 \pm 1,9$ focos/campo; Figura 17A), a expressão de *Toll-like* 4 (SAL: $0,9 \pm 0,03$ vs. IRI: $3,5 \pm 0,7$; Figura 17B) e TNF- α (SAL: $1,9 \pm 0,7$ vs. IRI: $11,68 \pm 3,4$; Figura 17C) no fígado de animais quando comparado ao grupo salina ($P < 0,05$). Entretanto, o tratamento com probióticos reduziu o número de focos inflamatórios (IRI+PRO: $2,7 \pm 0,6$ focos/campo), sem reduzir a expressão do receptor TLR4 (IRI+PRO: $2,7 \pm 0,2$) ou a produção de TNF- α (IRI+PRO: $4,9 \pm 0,7$). A expressão de IL-1 β também foi avaliada, porém, a administração de irinotecano não alterou seu nível de expressão (SAL: $1,2 \pm 0,2$ vs. IRI: $4,1 \pm 1,1$; Figura 17D).

Figura 17 - Efeito da administração de probióticos sobre os parâmetros inflamatórios no fígado de animais tratados com irinotecano.



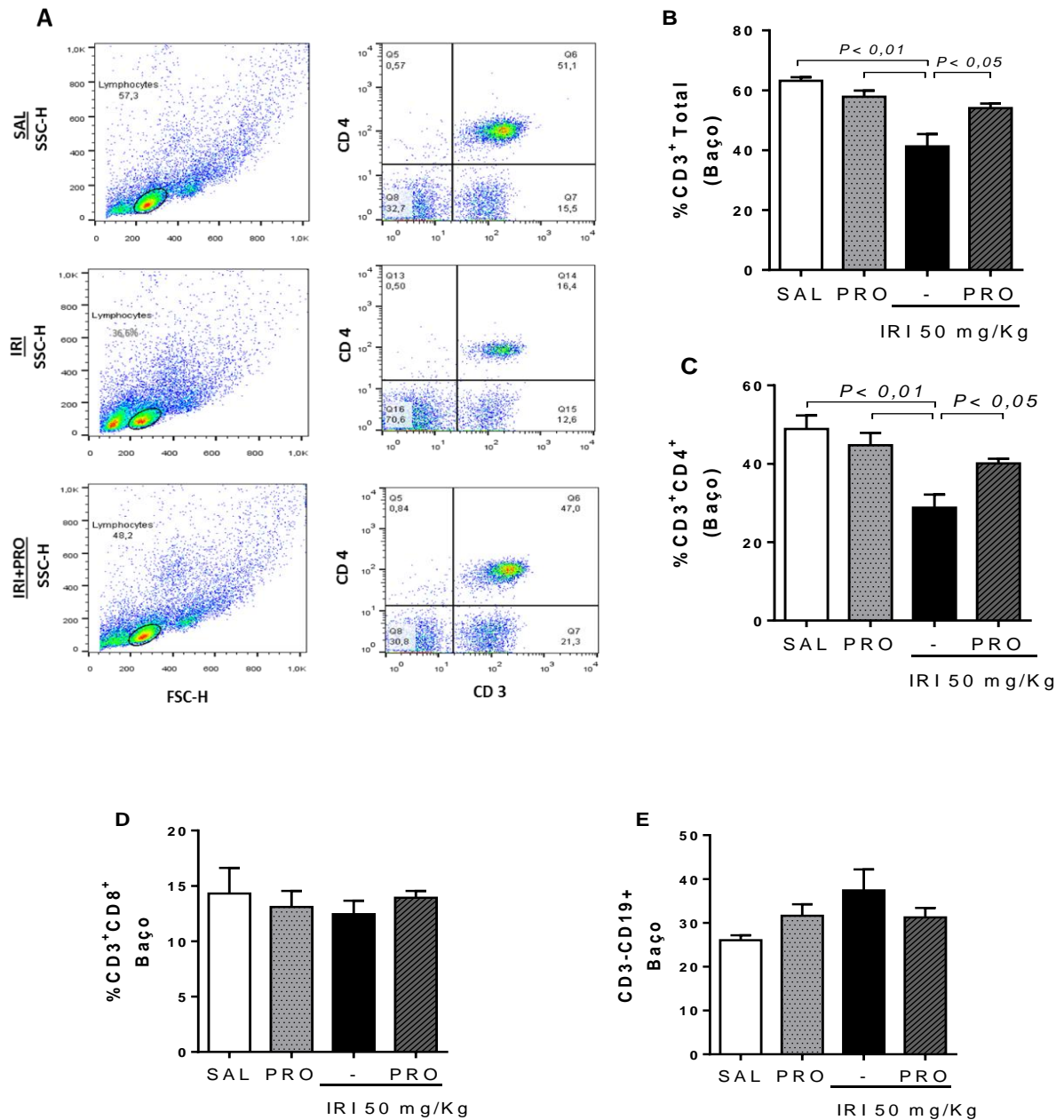
Animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou suspensão de probióticos (1×10^7 UFC/mL, v.o.) como controle. A esteato-hepatite foi induzida com administração de irinotecano (50mg/Kg, i.p.) durante cinco semanas associado ou não à administração de probióticos (n=5-8). Amostras de fígado foram coletadas ao final do período experimental. O tratamento com probióticos reduziu o acúmulo de células inflamatórias (A), mas não reduziu a expressão gênica de TLR4 (B) e TNF- α (C) induzidos por irinotecano. Irinotecano não alterou a expressão gênica de IL-1 β comparada com o controle salina. Para a análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni.

5.2.4 Frequência de células linfóides no baço de animais com esteato-hepatite induzida por irinotecano.

O baço dos animais com esteato-hepatite foi coletado para avaliação do impacto das administrações de irinotecano e de probióticos sobre a frequência de diferentes subpopulações linfocitárias. Os animais com esteato-hepatite tiveram uma redução na frequência de linfócitos T totais (% CD3⁺) (SAL: 63,2± 1,2 vs. IRI: 41,27± 4,1; Figura 18B) e de Linfócitos T CD4 (%CD3⁺CD4⁺) (SAL: 48,8± 3,5 vs. IRI: 28,8± 3,3; Figura 18A e C) em relação ao controle. O tratamento com probióticos aumentou a frequência dessas células de forma significativa (IRI+PRO: 54,0± 1,6%; IRI+PRO: 40,0± 1,2%; vs. IRI respectivamente) ($P<0,05$). Entretanto, as populações de células T CD8 (%CD3⁺CD8⁺) (Figura 18D) e linfócitos B (%CD3⁻CD19⁺) (Figura 18E) esplênicos não se mostraram alteradas nesses animais.

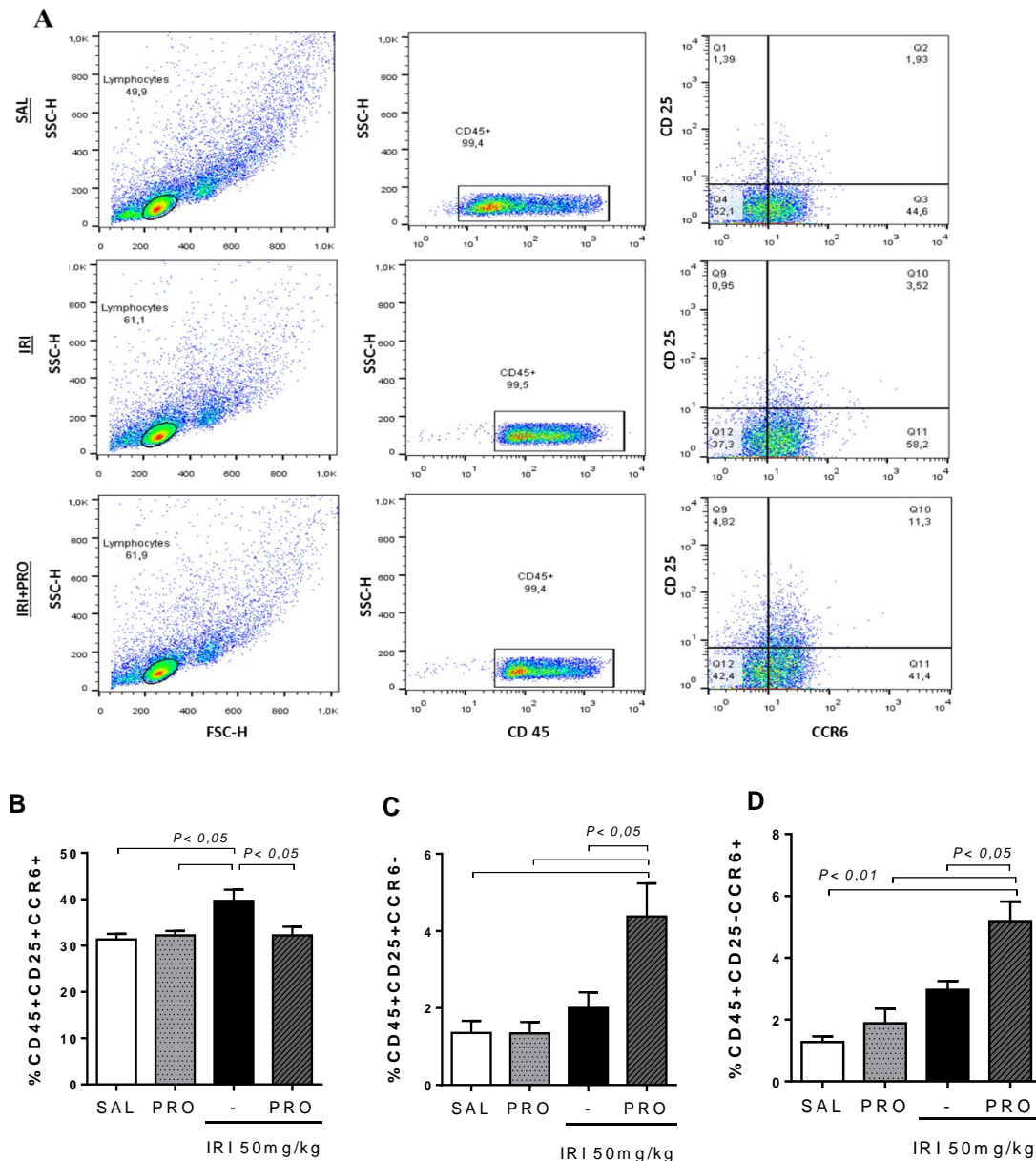
Observamos, ainda, três fenótipos distintos de células no baço dos animais C57BL/6: CD45⁺CD25⁺CCR6⁺, CD45⁺CD25⁺CCR6⁻ e CD45⁺CD25⁻CCR6⁺ (Figura 19). Animais que receberam injeções de irinotecano tiveram um aumento na frequência (%) de células CD45⁺CD25⁺CCR6⁺ (SAL: 31,3 ± 1,2 vs. IRI: 39,6 ± 2,4), sendo essa frequência reduzida de forma significativa no grupo tratado com a suspensão de probióticos (IRI+PRO: 32,2 ± 1,8 vs. IRI 39,6 ± 2,4; Figura 19A e B) ($P<0,05$). Contudo, a avaliação dos fenótipos seguintes mostraram um perfil diferente, pois apenas animais que receberam a associação do quimioterápico com os probióticos tiveram um aumento na frequência de células CD45⁺CD25⁺CCR6⁻ (IRI+PRO: 4,4± 0,8; Figura 19A e C) e CD45⁺CD25⁻CCR6⁺ (IRI+PRO: 5,2 ± 0,6; Figura 19A e D), sendo essa diferença significativa em relação a todos os demais grupos.

Figura 18- Frequência de linfócitos T e B esplênicos em animais tratados com irinotecano.



Animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou suspensão de probióticos (1×10^7 UFC/mL, v.o.) como controle. A esteato-hepatite foi induzida com administração de irinotecano (50mg/Kg, i.p.) durante cinco semanas associado ou não à administração de antibióticos (n=5-8). O baço foi coletado após eutanásia e as células isoladas foram submetidas à imunofenotipagem por citometria de fluxo. (A) Imagem representativa da frequência de células CD3⁺CD4⁺. A frequência de células T CD3⁺ (B) e CD3⁺CD4⁺ (C) aumentou nos animais que receberam irinotecano e probióticos comparado àqueles que receberam apenas irinotecano. A frequência de células CD3⁺CD8⁺ (D) e CD3⁻CD19⁺ (E) não se mostrou alterada. Para a análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni.

Figura 19 - Frequência de células CD45⁺CD25⁺CCR6⁺, CD45⁺CD25⁺CCR6⁻, e CD45⁺CD25⁻CCR6⁺ esplênicas em animais tratados com irinotecano.



Animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou suspensão de probióticos (1×10^7 UFC/mL, v.o.) como controle. A esteato-hepatite foi induzida com administração de irinotecano (50mg/Kg, i.p.) durante cinco semanas associado ou não à administração de antibióticos. O baço foi coletado após eutanásia e as células isoladas foram submetidas à imunofenotipagem por citometria de fluxo (n=5-8). (A) Imagem representativa da frequência de leucócitos excluindo-se células não B, não T no baço de animais. Irinotecano foi capaz de aumentar a frequência de células CD45⁺CD25⁺CCR6⁺, o que foi prevenido pelo tratamento com probióticos (B). A associação de irinotecano com probióticos foi capaz de aumentar a frequência de células CD45⁺CD25⁺CCR6⁻ (C) e CD45⁺CD25⁻CCR6⁺ (D), o que não foi observado em outros grupos. Para a análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que a depleção da microbiota intestinal por meio de antibioticoterapia ou da regulação das populações de bactérias intestinais através do tratamento com probióticos, pode efetivamente impedir o desenvolvimento de esteato-hepatite induzida por irinotecano. Além disso, foi demonstrado que o efeito do tratamento com antibióticos ou com probióticos estava associado à preservação da barreira intestinal e à redução da translocação das bactérias do intestino para o tecido hepático. Dessa forma, demonstramos que a translocação bacteriana, a partir da microbiota intestinal para o fígado, exerce um papel chave na patogênese da NASH induzida pelo irinotecano e que a modulação dessa microbiota possui grande potencial terapêutico para a prevenção do desenvolvimento da NASH induzida por esse quimioterápico.

Estudos anteriores do grupo LAFICA (não publicados) evidenciaram um aumento significativo na imunexpressão de TLR4 no fígado de animais que receberam irinotecano. Além disso, foram encontradas enterobactérias do tipo *Escherichia coli*, bactérias gram-negativas, durante todas as semanas experimentais de indução do modelo de esteato-hepatite, tanto em sangue da veia porta quanto em hemocultura sistêmica, somente em camundongos tratados com o quimioterápico. Esses achados sugerem que *Escherichia coli* transloca do intestino para o fígado durante a esteato-hepatite induzida por irinotecano. Marcolino Assis-Júnior e colaboradores (2017) demonstraram a presença de bactérias no fígado de camundongos com NASH induzida por irinotecano através da identificação da presença de DNA bacteriano em amostras de fígado. Assim, para investigar de que maneira as bactérias chegam ao fígado e seu real papel no desenvolvimento da inflamação e do dano hepático, propusemos avaliar o efeito da antibioticoterapia no modelo de esteato-hepatite induzida por irinotecano. Para essa finalidade, foi utilizado um coquetel antibiótico reconhecidamente eficaz na esterilização da microbiota intestinal. Como resultado, verificamos que o protocolo utilizado foi adequado para esgotar a microbiota intestinal em nossos animais. Souza (2004) já havia demonstrado a eficácia desse protocolo, no qual a administração com antibióticos de largo espectro resultou em bactérias intestinais não detectáveis após 21 dias de tratamento. Em nosso modelo, tal depleção foi efetivamente mantida por sete semanas, permitindo a adequada investigação quanto ao papel da microbiota intestinal na patogênese da esteato-hepatite.

Wong e colaboradores (2015) estudaram o papel da proteína adaptadora MyD88 e dos receptores do tipo Toll-like, TLR2 e TLR9, no modelo de mucosite intestinal induzido por irinotecano. Nesse estudo foi observada a presença sistêmica de bactérias e uma translocação bacteriana regional significativa para o fígado em camundongos do tipo selvagem injetados com irinotecano, um efeito que se correlacionou com a gravidade da mucosite. No entanto, a deleção gênica de TLR2, TLR9 ou da proteína adaptadora MyD88 resultou em redução da gravidade da mucosite intestinal, além de diminuição da bacteremia e translocação bacteriana para o fígado, eventos relacionados ao tratamento com irinotecano. Nossos resultados estão de acordo com os observados no estudo em questão, uma vez que, a depleção da microbiota intestinal preveniu o dano intestinal, a bacteremia e a presença de bactérias no fígado mesmo após sete semanas de tratamento com irinotecano, sugerindo que as bactérias que chegam à circulação sistêmica e ao fígado de animais tratados com irinotecano vêm do intestino como consequência da ruptura da barreira intestinal derivada do tratamento quimioterápico.

Neste estudo, foi demonstrado que o dano histopatológico hepático induzido pelo irinotecano estava de acordo com os escores propostos por Kleiner (2005). Costa (2014) descreveu o mesmo padrão de dano associado à injeção de irinotecano em camundongos *Swiss*, sendo esses achados reproduzidos em nosso estudo utilizando camundongos C57BL/6. O tratamento antibiótico atenuou os escores totais de Kleiner, incluindo a diminuição das células inflamatórias no tecido hepático. A literatura relata que o aumento da endotoxemia portal e do LPS sistêmico causa dano inflamatório hepático grave em modelo de obesidade (BRUN et al., 2007). A participação da microbiota intestinal e sua translocação para o fígado como componente para o desenvolvimento da NASH também foram observadas em modelo experimental murino de derivação jejuno-ileal, onde a lesão hepática e esteatose resultantes foram minimizadas com terapia antimicrobiana, o que demonstra o papel da resposta imune inata via receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) responsáveis por identificar moléculas associadas a patógenos, como o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, no desenvolvimento de doença hepática (VANDERHOOF et al., 1980). É de suma importância ressaltar que a via pela qual o LPS no fígado e gera inflamação hepática envolve sua ligação aos receptores TLR4 (RIVERA et al., 2007).

Nós relatamos que o tratamento com irinotecano aumenta a imunoexpressão do TLR4 no fígado e no intestino de animais. A literatura demonstra que uma ativação prolongada ou exagerada dos receptores do tipo Toll (TLRs) pode produzir efeitos deletérios (MENCIN et

al., 2009). Em modelo experimental de esteato-hepatite, camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram aumento na expressão de TLR4 quando comparados ao grupo controle, além de níveis elevados de LPS portal e inflamação hepática grave (GABELLE, 2011). O papel crucial da sinalização através do LPS bacteriano, ligante de TLR4, na NASH foi demonstrado pela primeira vez através do aumento da sensibilidade hepática em ratos obesos mesmo utilizando-se baixas doses de LPS (YANG, 1997). Em um estudo em camundongos que receberam dieta deficiente em metionina-colina (MCD) para indução de NASH foi observada expressão aumentada de TLR4 no fígado e que animais geneticamente modificados com expressão deficiente de TLR4, exibem diminuição da lesão e menor acúmulo de lipídios hepáticos (RIVERA, 2007). Nossos resultados mostraram que a depleção da microbiota levou à uma diminuição da expressão de TLR4 e da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β . A interação do ligante com o complexo receptor TLR4 leva ao recrutamento de múltiplas moléculas adaptadoras à membrana celular, resultando na degradação do I κ B e na translocação de NF- κ B para o núcleo, que por suas vez induz a transcrição de diversas citocinas e outros mediadores da inflamação (RIVERA et al., 2007). Assim, o TLR4 parece ser a conexão crucial no eixo microbiota intestinal/fígado relacionado à patogênese da NASH.

A literatura relata que TNF- α e IL-1 β promovem a progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) em modelos animais. Nesse contexto já foi demonstrado que o TNF- α é capaz de promover a morte de hepatócitos e o acúmulo de colesterol nessas células através do aumento da captação de colesterol através de receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e da diminuição do seu efluxo celular (MA et al., 2000). A IL-1 β também medeia as características encontradas na NAFLD, incluindo a esteatose (KAMARI et al., 2011] e morte de hepatócitos (MIURA et al., 2010). Camundongos que eram deficientes em caspase-1, enzima que converte a pró-forma de IL-1 β (pro-IL-1 β) em sua forma ativa IL-1 β , também eram resistentes à esteatose/esteato-hepatite (STIENSTRA, 2010; DIXON, 2013). Esses dados corroboram com nossos achados, uma vez que, animais tratados com irinotecano apresentaram um aumento no acúmulo hepático de lipídios observado tanto por dosagem bioquímica quanto por análise histopatológica, e que a redução desse parâmetro obtidos após o tratamento com antibióticos podem ser decorrentes da redução da produção de citocinas pró-inflamatórias.

Costa e colaboradores (2014) relataram em seu estudo a presença de inflamação lobular e inflamação portal em animais que receberam irinotecano a partir de cinco semanas de tratamento. No mesmo estudo foi avaliado os níveis locais da citocina IL-1 β , onde observou-se um aumento da sua expressão após sete semanas de tratamento quimioterápico com irinotecano em células mononucleares e em hepatócitos. No presente estudo também observamos o aumento do infiltrado inflamatório hepático e da expressão de IL-1 β , além de TNF- α após cinco e sete semanas de tratamento com o quimioterápico.

A literatura reporta que há uma alça de retroalimentação positiva envolvendo o influxo de neutrófilos e a produção das citocinas TNF- α e IL-1 β , responsáveis por deflagrar e perpetuar o processo inflamatório. Em um trabalho que utilizava modelo murino de artrite induzida por antígeno, a contribuição do TNF- α , da IL-1 β e do influxo de neutrófilos na inflamação e na nocicepção articular foi avaliada. A administração de um anticorpo monoclonal antagonista dos receptores TNF- α (infliximab) ou da IL-1 preveniu o influxo de neutrófilos e a hipernocicepção, e isto foi comparável aos efeitos da dexametasona. O tratamento com fucoidina (um inibidor de adesão de leucócitos) suprimiu consideravelmente o influxo de neutrófilos e a produção local de TNF- α e IL-1 β (SACHS et al., 2011). Em nosso estudo, a depleção da microbiota intestinal levou à uma redução dos parâmetros inflamatórios supracitados, nos levando a crer que a migração de células para o tecido hepático foi atenuada pela redução dos níveis dessas citocinas.

O modelo de esteato-hepatite induzida por irinotecano proposto por Costa et al. (2014) descreve que o tratamento com irinotecano induz eventos inflamatórios e oxidativos no fígado, que precedem o acúmulo de lipídios na NASH em camundongos *Swiss*. Sabe-se que a inflamação também pode levar à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ABBAS e LICHTMAN, 2011) com consequente dano mitocondrial. Estudos prévios demonstraram que os hepatócitos produzem óxido nítrico (NO) após exposição a citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-18, em resposta ao LPS e durante a inflamação hepática crônica (KIRKALI, 2000). Em modelos experimentais de NASH induzida por dieta, também tem sido observado aumento da expressão hepática de iNOS (HA, 2010). Além disso, o óxido nítrico parece ter um papel chave no desenvolvimento e progressão de NASH, estando envolvido nos processos de inflamação e fibrose hepáticas, que são alguns dos aspectos característicos da NASH (FUJITA, 2010). Nossos dados de redução da expressão de iNOS em animais que

tiveram a microbiota depletada estão coerentes com uma reduzida ativação de TLR4, uma vez que esse receptor se encontra *upstream* na via inflamatória de expressão da iNOS.

Em nosso modelo experimental, também verificamos uma lesão intestinal acentuada detectada por alterações na arquitetura intestinal, encurtamento de vilosidades, e infiltração de células inflamatórias. Nós demonstramos que o tratamento com antibióticos atenua o dano histopatológico intestinal induzido pelo irinotecano. A literatura relata que danos no epitélio intestinal e a alteração da microbiota intestinal correlaciona-se com a toxicidade intestinal do irinotecano (GIBSON et al, 2003; BRANDI et al., 2006). Um estudo clínico mostrou que pacientes que usaram os antibióticos orais neomicina e bacitracina tiveram um potencial efeito protetor na mucosite induzida por irinotecano e mucosite induzida pela combinação de irinotecano e fluorouracil (SCHMITTEL, 2004; ALIMONTI, 2003).

A teoria mais aceita é que após o insulto inicial aos enterócitos promovido pela quimioterapia antiproliferativa, o epitélio da mucosa torna-se mais permeável, e o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), presente no lúmen, pode penetrar mais profundamente na mucosa e ativar o receptor Toll-like 4 (TLR4) nos macrófagos residentes abundantes na lâmina própria. Isso pode levar à lesão celular mediada por TNF- α e ativação secundária do sistema imune inato e recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão (BOELSTERLI et al., 2013; WATANABE et al., 2008).

Em paralelo à investigação dos parâmetros inflamatórios, também avaliamos critérios gerais associados ao desenvolvimento de NASH. A hepatomegalia característica encontrada após protocolo com irinotecano foi abolida, corroborando com os dados de redução dos critérios gerais de lesão hepática de Kleiner, assim como a redução da atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT) (marcador de lesão hepática) após cinco e sete semanas de tratamento com antibióticos. A antibioticoterapia preveniu a perda de peso causada por irinotecano desde a quarta semana de tratamento. Foi avaliado, ainda, o efeito citotóxico do irinotecano para avaliar se a depleção da microbiota poderia prejudicar a eficácia antitumoral do fármaco. Contudo, não houve diferença entre os grupos tratados apenas com quimioterápico e com antibióticos mais quimioterápico após cinco semanas de indução do modelo, momento em que foi constatada a redução do número de leucócitos totais circulantes de maneira semelhante em ambos os grupos.

Todos os trabalhos publicados utilizando o modelo de esteato-hepatite induzido por irinotecano padronizado por Costa e colaboradores (2014) utilizaram camundongos *Swiss*. As

primeiras tentativas do grupo em padronizar a utilização de camundongos C57BL/6 mostraram que a NASH parecia se desenvolver de forma precoce nesses animais, o que motivou a avaliação dos animais em dois diferentes momentos, após cinco e sete semanas de tratamento com irinotecano. Após a avaliação do curso do desenvolvimento da doença surgiu a necessidade de optar por um dos protocolos para que se desse seguimento ao estudo. Optamos por usar a dose de 50 mg/Kg já padronizada, administrada em dias alternados durante somente cinco semanas experimentais, representando este o menor período de tratamento capaz de reproduzir as alterações histopatológicas, bioquímicas e inflamatórias encontradas na NASH induzida por irinotecano.

Até o momento as opções terapêuticas para tratar NASH possuem limitada eficácia. O tratamento com pioglitazona não estabeleceu índices de segurança e eficácia a longo prazo bem definidos. O tratamento com α -tocoferol deve ser considerado em pacientes com NASH, embora intervenções com essa substância apresentem problemas de segurança. Esse quadro, expõe a real necessidade de buscar alternativas terapêuticas mais eficazes. Sabe-se que o principal bioproduto bacteriano envolvido na patogênese da NAFLD/NASH é o LPS bacteriano e que este está relacionado ao aumento da inflamação que é comum à NASH (BRANDL & SCHNABL, 2017). Considerando que a esteatose hepática e NASH estão associadas à proliferação bacteriana e aumento da permeabilidade intestinal, pode-se esperar que intervenções que modulem a microbiota intestinal sejam benéficas. Nesse sentido, o uso de probióticos, prebióticos ou ambos (simbióticos) tem sido sugeridos para serem usados no tratamento de NASH (BUSS, 2014).

Em um estudo clínico randomizado, pacientes com NASH comprovada por análise histológica e que apresentavam aumento da atividade da alanina aminotransferase (ALT) receberam uma fórmula que continha cinco cepas probióticas, incluindo *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium bifidum*. Após seis meses de tratamento, os pacientes do grupo que receberam probióticos tiveram uma redução significativa do conteúdo intra-hepático de triglicerídios e de aspartato aminotransferase, em contraste com o grupo que teve apenas cuidados usuais, no qual não houve redução desse parâmetro. Contudo, não houve diferença no índice de massa corpórea, circunferência da cintura, níveis séricos de glicose e lipídios e rigidez do fígado (WONG, 2013).

Em revisão sistemática publicada por Buss e colaboradores (2014) foram avaliados estudos que avaliavam o efeito de probióticos e simbióticos na doença hepática gordurosa não alcoólica. Os níveis de aminotransferases e índice de massa corpórea foram aspectos comumente avaliados em todos os estudos. Pacientes que receberam *Bifidobacterium longum* e oligossacarídeos mostraram redução de AST e ALT e de massa corpórea (MALAGUARNERA, 2012). Em contraste, após três meses de tratamento com *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophiles*, as aminotransferases dos pacientes estavam significativamente diminuídas, mas não a massa corporal (ALLER, 2011). Por fim, Wong ao incluir em seu estudo pacientes com NASH que receberam uma mistura de probióticos (*Lactobacillus plantarum*, *L. deslbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*) e prebióticos (frutooligossacarídeos) não foi observada melhora significativa nas enzimas hepáticas ou massa corporal, entretanto, os pacientes tinham uma diminuição do conteúdo intra-hepático de triglicerídeos.

Em modelo murino de NASH induzido por dieta deficiente em colina-metionina avaliou-se o efeito da administração de *Lactobacillus casei*. O uso do probiótico suprimiu o desenvolvimento da doença pela atenuação do dano hepático, de parâmetros séricos (dosagem de ALT), da supressão da inflamação, fibrose no fígado e redução da inflamação do cólon (OKUBO, 2013). Esses dados estão coerentes com os obtidos por nós, uma vez que em nosso modelo, os altos níveis de ALT, o dano tecidual no fígado e o acúmulo de gordura hepática causados pelo tratamento quimioterápico foram significativamente reduzidos ao utilizarmos um coquetel de probióticos contendo cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium lactis*.

Probióticos do tipo *L. rhamnosus* e *acidophilus* foram usados como abordagem para tratamento da doença hepática alcoólica. O álcool é capaz de aumentar a expressão de TLR4 no fígado de animais, que foi reduzida significativamente pela administração de probióticos, estando a IL-10 envolvida nesse processo. Nesse mesmo estudo, relatou-se o prejuízo na estrutura das microvilosidades intestinais e de *tight junctions* após indução do modelo de doença hepática, sendo estas estruturas eficazmente preservadas quando utilizados *L. rhamnosus* e *acidophilus* (HONG, 2015). Curiosamente, em nosso modelo não observamos redução da expressão gênica do receptor TLR4 quando da utilização da suspensão de probióticos, como também, não houve diferença na expressão das citocinas pró-inflamatórias

investigadas. Deve-se considerar, entretanto, que a avaliação em nível de tradução em proteínas desses alvos não foi realizada.

A alteração da composição da microbiota intestinal em camundongos e em seres humanos promove a obesidade e o acúmulo de gordura no fígado mesmo na ausência de permeabilidade da mucosa aumentada e de ativação de TLR, e pode ocorrer através de um aumento da capacidade bacteriana de captar energia (MIELE et al., 2009; BUZZETTI et al., 2016). A microbiota intestinal impacta no balanço energético do hospedeiro aumentando a absorção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) através do epitélio intestinal (ARSLAN, 2014). Além disso, as bactérias entéricas induzem aumento da atividade da lipoproteína lipase e acúmulo de triglicérides (TILG & MOSCHEN, 2010). A microbiota intestinal também produz enzimas que catalisam a conversão de colina dietética em compostos tóxicos, particularmente metilaminas. Estas aminas podem ser captadas pelo fígado, sendo então transformadas em N-óxido de trietilamina, induzindo inflamação e lesão hepática. Como mostrado por Spencer e colaboradores (2011), a disbiose da microbiota intestinal pode promover a NASH por redução nos níveis de colina e aumento nos níveis de metilamina. Outro mecanismo pelo qual a microbiota intestinal promove NASH é através da alteração no metabolismo do ácido biliar via sinalização do receptor farnesóide X (FXR), interferindo, portanto, nos processos de lipogênese e exportação hepática de VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) (TREMAROLI & BACKHED, 2012).

É relatado na literatura que há vias de lesão celular associadas à infecção por *E. coli* que independem de receptores *Toll-like*. Proteínas do sistema de secreção tipo III da *E. coli* presentes em seu revestimento celular injetam proteínas efetoras diretamente no citoplasma de outras células, causando danos que incluem citotoxicidade mediada por disfunção mitocondrial. A função mitocondrial é de fundamental importância no metabolismo energético celular. O dano causado nessa organela pode levar ao acúmulo de lipídio celular e uma alteração na população de *E. coli* em decorrência da modulação da microbiota intestinal poderia ser responsável pela preservação mitocondrial (COBURN et al, 2007). Essas afirmações poderiam explicar nossos achados, observamos que os animais que receberam o protocolo quimioterápico acumulam gordura possivelmente através de um mecanismo adicional que envolve uma mudança no fenótipo do microbioma intestinal e lesão mitocondrial mediada por bactérias gram-negativas. Dessa forma, possivelmente o tratamento com probióticos reduziram o acúmulo intra-hepático de lipídios por uma via independente de TLR4.

Juntamente ao estudo dos critérios de esteato-hepatite, realizamos avaliações de critérios relacionados à mucosite intestinal induzida por irinotecano. A gravidade da diarreia foi avaliada ao final do período experimental. Observamos que os animais tratados apresentavam menos diarreia do que aqueles injetados apenas com irinotecano. Probióticos como *Lactobacillus* tem sido indicados como benéficos no manejo das desordens gastrintestinais, incluindo a diarreia. A diarreia é um componente multifatorial que pode ocorrer devido à secreção de fluidos e eletrólitos, diminuição da absorção ou ambos. A absorção eletrolítica no intestino de mamíferos ocorre por meio da atividade de trocadores de íons Na^+/H^+ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ presentes na superfície apical de células epiteliais intestinais. NH_2 e NH_3 são as principais isoformas de NH responsáveis pela absorção de sódio, enquanto DRA e PAT-1 são os principais trocadores de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Alterações na atividade de NH_3 e do DRA são vistas na diarreia causada por infecção por *E. coli* enteropatogênica. Levando-se em consideração que qualquer agente que estimule a absorção luminal de NaCl pode atuar como agente antidiarreico, Singh e colaboradores (2012) investigaram o potencial terapêutico de *L. acidophilus* em conferir benefícios através desse mecanismo. O tratamento com *L. acidophilus* em células Caco-2 resultou em aumento significativo da atividade de troca de Na^+/H^+ e do aumento da expressão em nível transcricional e de tradução de NH_3 . Além disso, o efeito de *L. acidophilus* já havia sido demonstrado por aumentar a expressão e função da DRA via mecanismos transcricionais a longo prazo em células Caco-2 (RAHEJA, 2010). *Lactobacillus acidophilus* também mostraram efeito positivo na mucosite intestinal induzida por quimioterapia à base de 5- Fluorouracil. O dano epitelial e a infiltração neutrofílica na mucosa intestinal foram abolidos pelo tratamento probiótico. Além disso, foi visto um aumento significativo de IL-10 localmente (JUSTINO, 2015). Em nossos animais observamos uma atenuação da gravidade da diarreia que pode estar relacionada à regulação da absorção e secreção eletrolítica subjacentes aos potenciais efeitos antidiarreicos dos probióticos.

Receptores do tipo Toll e NOD que reconhecem padrões associados à patógenos estão expressos em células do sistema imune e células epiteliais e determinam a maturação da apresentação de antígenos celulares, o que subsequentemente define o tipo de resposta imune desenvolvida, que pode ser essencialmente efetora (Th1, Th2 ou Th17) ou reguladora (Treg) (SANCHES, 2017). Em um modelo de mucosite intestinal também induzido por irinotecano, Fernandes e colaboradores (2018) avaliaram o percentual de células T tanto em nível esplênico quanto intestinal e relataram uma queda no número de linfócitos T totais e T CD4

(% CD3⁺ e % CD3⁺CD4⁺) no intestino no quinto e sétimo dias experimentais, embora um aumento tenha sido observado no baço no quinto dia experimental seguido de um retorno à níveis basais.

Em um estudo que avaliava a participação de células T CD4 na progressão de NAFLD para carcinoma hepatocelular, observou-se que o excesso nutricional leva a altos níveis de ácidos graxos livres, provocando fosforilação oxidativa e disfunção mitocondrial em linfócitos T CD4⁺, resultando em apoptose dessas células. Em condições normais, células T CD4⁺ hepáticas e macrófagos contribuem erradicando hepatócitos senescentes e o tumor de forma precoce, prevenindo a formação de carcinoma hepatocelular (WEISKIRCHEN, 2016). A comparação do fenótipo de células imunológicas em sangue periférico de pacientes com NASH mostrou haver uma menor porcentagem de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺CD45RA do que aqueles que não possuíam a doença, que está relacionado com a prevalência de um fenômeno auto-imune relatado na NAFLD (INZAUGARAT, 2011). Esse dados estão coerentes com os nossos, em que o maior aporte de ácidos graxos decorrente do desequilíbrio na homeostase lipídica em animais com esteato-hepatite poderia levar à morte de linfócitos T CD4 em nível sistêmico, sem, contudo, interferir na população de linfócitos T CD8 (CD3⁺CD8⁺) ou linfócitos B (CD3⁻CD19⁺). Esse fenômeno pôde ser prevenido provavelmente através de um benefício na homeostase dos lipídios causados pelos probióticos, nos levando a crer que esses animais possam ter reduzido níveis de triglicerídeos plasmáticos, uma vez que o conteúdo lipídico hepático mostra-se reduzido.

Dumoutier e colaboradores (2011) mostraram que uma população de células inatas do baço é responsável pela produção de IL-22 e pode ser caracterizada pela expressão de CD25 e CCR6. Essas são células não-B e não-T que atuam desencadeando uma resposta inflamatória sistêmica de fase aguda no fígado, um dos principais órgãos alvo da IL-22. A atividade dessas células resulta da ativação de receptores TLR4 (ligante de LPS) mas também de TLR5 (ligante de flagelina) e estão sob o controle de IL-23 e IL-2, desencadeadas por respostas imunes inatas ou adaptativas. Aqui nós demonstramos por citometria de fluxo uma caracterização de células semelhantes à essa, na qual animais tratados com irinotecano tiveram um aumento da população CD45⁺CD25⁺CCR6⁺ após cinco semanas de tratamento. Esse dado corrobora com aumento do dano hepático observado na NASH, o que nos leva a crer que possivelmente essas células também sejam produtoras de IL-22, promovendo dano hepático. Isso poderia explicar, pelo menos em parte, a atenuação do dano observado nos

animais que receberam probióticos, uma vez que nesses animais houve redução significativa de células $CD45^+CD25^+CCR6^+$. Embora não tenhamos encontrado diferença significativa na ativação de receptores TLR4, o que poderia explicar a eficácia dos probióticos em reduzir essas células, essa evidência abre novas perspectivas quanto à investigação da participação de receptores TLR5 no processo. Além disso, uma resposta mediada por receptores de reconhecimento padrão do tipo NOD também são passíveis de investigação.

Nossos resultados nos levam a crer que o dano inicial causado pela administração do quimioterápico levaria a um dano epitelial intestinal mediado pela ativação de receptores TLR4. Secundariamente à ativação de TLR4 no fígado, a citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β são produzidas. Supomos que estas podem ser as responsáveis por orquestrar os mecanismos responsáveis pelo acúmulo de gordura tecidual. Até o presente momento, sabemos que os eventos inflamatórios antecedem o acúmulo de lipídios em modelo de esteato-hepatite induzido por irinotecano que utilizava camundongos *Swiss* padronizado por Costa e colaboradores (2014). Em nosso estudo, encontramos alterações inflamatórias antes da sétima semana de tratamento, entretanto, não investigamos o acúmulo de gordura hepática através de dosagens bioquímicas em camundongos C57BL/6. Uma investigação mais minuciosa a respeito de como esses eventos orquestram o desenvolvimento da NASH induzida por irinotecano merece atenção.

A depleção da microbiota intestinal com utilização da terapia com antibióticos de largo espectro mostrou que a ativação de TLR4 e a chegada de bactérias ao fígado são pontos chaves cruciais para que ocorra o início da cascata de eventos que culminam com o desenvolvimento de esteato-hepatite. O uso de probióticos como tentativa de modular a microbiota intestinal mostrou resultado positivo, uma vez que observamos uma redução da inflamação e do dano hepático. Entretanto, observamos que a modulação proposta não foi capaz de reduzir a expressão gênica hepática de TLR4, tampouco o aumento de TNF- α . A ação protetora dos probióticos parece ser diferente daquela que envolve os TLR4. Aqui, observamos uma mudança em nível sistêmico da resposta imune que envolve diferentes fenótipos celulares. Entretanto, uma caracterização mais específica das células envolvidas no processo ainda se torna necessária.

7. CONCLUSÃO

A microbiota entérica por meio da sua translocação do intestino para o fígado é um fator chave que leva à progressão da esteato-hepatite induzida por irinotecano, sendo a administração de probióticos capaz de prevenir essa condição. Seu efeito benéfico se deve, pelo menos em parte, à modulação de células do sistema imune e manutenção da integridade da barreira intestinal, impedindo, assim, a translocação bacteriana para o tecido hepático.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A K.; LICHTMAN, A H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

ADAM, R.; CASTAING, D. et. al. Tumor progression while on chemotherapy: A contraindication to liver resection for multiple colorectal metastasis? **Ann Surg**, v. 240, p. 1052-1061, 2004.

ADAM, R.,; DE GRAMONT A.; FIGUERAS, J.; GUTHRIE, A.; KOKUDO, N.; KUNSTLINGER, F.; LOYER, E.; POSTON, G.; ROUGIER, P.; RUBBIA-BRANDT, L.; SOBRERO, A.; TABERNERO, J.; TEH, C.; VAN CUTSEM, E.; JEAN-NICOLAS VAUTHEY OF THE EGOSLIM (EXPERT GROUP ON ONCOSURGERY MANAGEMENT OF LIVER METASTASES) GROUP. The oncosurgery approach to managing liver metastases from colorectal cancer: a multidisciplinary international consensus. **Oncologist**. v. 17(10), p. 1225-39, 2012.

ADAM, R.; DELVART, V.; PASCAL, G.; VALEANU, A.; CASTAING, D.; AZOULAY, D.; GIACCHETTI, S.; PAULE, B.; KUNSTLINGER, F.; GHÉMARD, O.; LEVI, F.; BISMUTH, H. Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastasis downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. **Ann Surg**, v. 240, p. 644-657, 2004.

ALIMONTI, A.; GELIBTER, A.; PAVESE, I.; SATTA, F.; COGNETTI, F.; FERRETTI, G.; RASIO, D.; VECCHIONE, A.; DI PALMA, M. New approaches to prevent intestinal toxicity of irinotecan-based regimens. **Cancer Treat Ver**, v. 30(6), p. 555-62, 2004.

ALIMONTI, A.; SATTA, F.; PAVESE, I. et al. Prevention of irinotecan plus 5-fluorouracil/leucovorin-induced diarrhoea by oral administration of neomycin plus bacitracin in first-line treatment of advanced colorectal cancer. **Ann Oncol**. V. 14, p. 805–806, 2003.

ALISI, A., BEDOGNI, G., BAVIERA, G., GIORGIO, V., PORRO, E., PARIS, C., GIAMMARIA, P., REALI, L., ANANIA, F., NOBILI, V. Randomised clinical trial: The

beneficial effects of VSL#3 in obese children with non-alcoholic steatohepatitis. **Aliment Pharmacol Ther.** V. 39(11), p. 1276-85, 2014.

ALLER, R.; DE LUIS, D.A.; IZAOLA, O.; CONDE, R.; GONZALEZ SAGRADO, M.; PRIMO, D.; DE LA FUENTE, B et al. Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. **Eur RevMed Pharmacol Sci**, v. 15, p. 1090-5, 2011.

ARSLAN, N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. **World J Gastroenterol**, v. 20(44), p. 16452–16463, 2014.

ATARASHI, K.; TANOUE, T.; OSHIMA, K.; SUDA, W.; NAGANO, Y.; NISHIKAWA, H.; FUKUDA, S.; SAITO, T.; NARUSHIMA, S.; HASE, K.; KIM, S.; FRITZ, J.V.; WILMES, P.; UEHA, S.; MATSUSHIMA, K.; OHNO, H.; OLLE, B.; SAKAGUCHI, S.; TANIGUCHI T.; MORITA, H.; HATTORI, M.; HONDA, K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. **Nature**. v. 500, p. 232-6, 2013.

BUZZETTI, E., PINZANI, M., TSOCHATZIS, E.A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism**, v. 65(8), p.1038-48, 2016.

BUGIANESI, E., MOSCATIELLO, S., CIARAVELLA, M.F. et al. Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. **Curr Pharm Des**, v. 16, p. 1941–51, 2010.

BÄCKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L.V.; KOH, G.Y.; NAGY, A.; SEMENKOVICH, C.F.; GORDON, J.I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proc Natl Acad Sci**. v.101(44), p.15718-23, 2004.

BISMUTH, H.; ADAM, R.; LEVI, F. et. al. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after neoadjuvant chemotherapy. **Ann Surg**. v. 224, p. 509–22, 1996. KUVSHINOV, B.; FONG, Y. Surgical Therapy of Liver Metastasis. **Semin Oncol**, v. 34, p. 177-185, 2007.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** V. 37, p. 911–917, 1959.

BOELSTERLI, U.A.; REDINBO, M.R.; SAITTA, K.S. Multiple NSAID-Induced Hits Injure the Small Intestine: Underlying Mechanisms and Novel Strategies. **Toxicol Sci**, v. 131, p.654–667, 2013.

BRANDL, K.; SCHNABL, B. Intestinal microbiota and nonalcoholic steatohepatitis. **Curr Opin Gastroenterol.** v. 33, p.128-133, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **ABC do Câncer**: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2018.

BRUN, P.; CASTAGLIUOLO, I.; DI LEO, V, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** V. 292, p. G518–25, 2007.

BUSS, C.; VALLE-TOVO, C.; MIOZZO, S.; MATTOS, A.A. Probiotics and synbiotics may improve liver aminotransferases levels in non-alcoholic fatty liver disease patients. **Annals of hepatology.** v. 13, p. 482-488, 2014.

CARVALHO, L.L. **Inibição do mTOR agrava a mucosite intestinal induzida por irinotecano**. Fortaleza; 2016. [Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Ceará].

CHEN, J.; LI, Q.; WANG, C.; ZHU, H.; SHI, Y.; ZHAO, G. Simultaneous vs staged resection for synchronous colorectal liver metastasis: a metaanalysis. **Int J Colorectal Dis**, v. 26, p. 191-199, 2011.

CHENG, C., TAN, J., QIAN, W., ZHANG, L., HOU, X. Gut inflammation exacerbates hepatic injury in the high-fat diet induced NAFLD mouse: Attention to the gut-vascular barrier dysfunction. **Life Sci.** V. 209, p.157-166, 2018.

CHESTER, J.D.; JOEL, S.P.; CHEESEMAN, S.L.; HALL, G.D.; BRAUN, M.S.; PERRY, J.; DAVIS, T.; BUTTON, C.J.; SEYMOUR, M.T. Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus oral ciclosporin in patients with fluorouracil-refractory metastatic colon cancer. **J ClinOncol**, v. 15, p. 1125-32, 2003.

CHU, H., WILLIAMS, B., SCHNABL, B. Gut microbiota, fatty liver disease, and hepatocellular carcinoma. **Liver Res.** v. 2(1), p. 43-51, 2018.

COBURN, B.; SEKIROV, I.; FINLAY, B.B. Type III secretion systems and disease. **Clin Microbiol Rev.** v. 20, p. 535-49, 2007.

COMPARE, D.; COCCOLI, P.; ROCCO, A.; NARDONE, O.M.; DE MARIA, S.; CARTENI, M.; NARDONE, G. Gut-liver axis: The impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 22, p. 471-476, 2012.

CORTEZ-PINTO, H.; MOURA, M.C.; DAY, C.P. Nonalcoholic steatohepatitis: From cell biology to clinical practice. **J Hepatol**, v. 44, p. 197-208, 2006.

COSTA, M.L.V. **Desenvolvimento de um modelo experimental de esteato-hepatite induzida pelo antineoplásico irinotecano.** Fortaleza; 2014. [Tese de Doutorado-Universidade Federal do Ceará].

COSTA, M.L.V.; LIMA-JÚNIOR, R.C.; ARAGÃO, K.S.; MEDEIROS, R.P.; MARQUES-NETO, R.D.; DE SÁ GRASSI, L.; LEITE, L.L.; NUNES, L.G.; DE MESQUITA NETO, J.W.; DE CASTRO BRITO, G.A.; DE SOUZA, M.H.; DE ALMEIDA, P.R.; RIBEIRO, R.A. Chemotherapy-associated steatohepatitis induced by irinotecan: a novel animal model. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 74(4), p.711-20, 2014.

CUNHA, F.Q.; BOUKILI, M.A.; MOTTA, J.I.B.; VARGAFTIG, B.B.; FERREIRA, S.H. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **Eur. J. Pharmacol.** v. 238, p. 47–52, 1993.

CUSI, K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in nonalcoholic steatohepatitis. **Clin Liver Dis**, v. 13, p. 545–63, 2009.

CSAK, T.; VELAYUDHAM, A.; HRITZ, I.; PETRASEK, J.; LEVIN, I.; LIPPAI, D.; CATALANO, D.; MANDREKAR, P.; DOLGANIUC, A.; KURT-JONES, E.; SZABO, G. Deficiency in myeloid differentiation factor-2 and toll-like receptor 4 expression attenuates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 300(3), p. G433-41, 2011.

DAY, C.P.; JAMES, O.F.W. Hepatic steatosis: Innocent bystander or guilty party? **Hepatol**, v. 27, n. 6, p. 1463-1466, 1998.

DHILLON, N.; WALSH, L.; KRÜGER, B.; WARD, S.C.; GODBOLD, J.H.; RADWAN, M.; SCHIANO, T.; MURPHY, B.T.; SCHRÖPPEL, B. A single nucleotide polymorphism of Toll-like receptor 4 identifies the risk of developing graft failure after liver transplantation. **J Hepatol.** v. 53(1), p. 67-72, 2010.

DI GIACINTO, C.; MARINARO, M.; SANCHEZ, M.; STROBER, W.; BOIRIVANT, M. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. **J Immunol.** v. 174, p. 3237-46, 2005.

DIXON, L.J.; FLASK, C.A.; PAPOUCHADO, B.G.; FELDSTEIN, A.E.; NAGY, L.E. Caspase-1 as a central regulator of high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. **PLoS One.** 8(2):e56100. doi: 10.1371/journal.pone.0056100, 2013.

DRENICK, E. J.; FISLER, J.; JOHNSON, D. Hepatic Steatosis After Intestinal Bypass—Prevention and Reversal by Metronidazole, Irrespective of Protein-Calorie Malnutrition. **Gastroenterology.** v. 82, p. 535–548, 1982.

DUMAS, M.E.; BARTON, R.H.; TOYE, A.; CLOAREC, O.; BLANCHER, C.; ROTHWELL, A.; FEARNside, J.; TATOUD, R.; BLANC, V.; LINDON, J.C.; MITCHELL, S.C.; HOLMES, E.; MCCARTHY, M.I.; SCOTT, J.; GAUGUIER, D.; NICHOLSON, J.K.

Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 103(33), p. 12511-6. 2006.

DUMOUTIER, L.; DE HEUSCH, M.; ORABONA, C.; SATOH-TAKAYAMA, N.; EBERL, G.; SIRARD, J.C.; DI SANTO, J.P.; RENAULD, J.C. IL-22 is produced by γ C-independent CD25⁺ CCR6⁺ innate murine spleen cells upon inflammatory stimuli and contributes to LPS-induced lethality. **Eur J Immunol**. v.41, p. 1075-85, 2011.

ESPOSITO, E.; IACONO, A.; BIANCO, G.; AUTORE, G.; CUZZOCREA, S.; VAJRO, P.; CANANI, R.B.; CALIGNANO, A.; RASO, G.M.; MELI, R. Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats. **J Nutr**. v. 139, p. 905-11, 2009.

FAN, J.G.; XU, Z.J.; WANG, G.L. Effect of lactulose on establishment of a rat non-alcoholic steatohepatitis model. **World J Gastroenterol**, v. 11(32), p. 5053-5056, 2005.

FARRELL, G.C.; LARTER, C. Z. Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. **Hepatology**, v.41, p. S99-S112, 2006.

FERNANDES, C., WANDERLEY, C.W.S., SILVA, C.M.S., MUNIZ, H.A., TEIXEIRA, M.A., SOUZA, N.R.P., CÂNDIDO, A.G.F., FALCÃO, R.B., SOUZA, M.H.L.P., ALMEIDA, P.R.C., CÂMARA, L.M.C., LIMA-JÚNIOR, R.C.P. Role of regulatory T cells in irinotecan-induced intestinal mucositis. **Eur J Pharm Sci**. V. 115, p. 158-166, 2018.

FOOLAD, N.; BREZINSKI, E.A.; CHASE, E.P.; ARMSTRONG, A.W. Effect of Nutrient Supplementation on Atopic Dermatitis in Children. A Systematic Review of Probiotics, Prebiotics, Formula, and Fatty Acids **JAMA Dermatol**. v. 149, p. 350-355, 2013.

FUJITA, K.; NOZAKI, Y.; YONEDA, M et. al. Nitric oxide plays a crucial role in the development of nonalcoholic steatohepatitis in the choline deficient I-amino acid define diet fed ratmodel. **Alcohol Clin Exp Res. Suppl 1**, p. S18-24, 2010.

GABELLE, A.; ROCHE, S.; GÉNY, C.; BENNYNS, K.; LABAUGE, P.; THOLANCE, Y.; QUADRIO, I.; TIERS, L.; GOR, B.; BOULANGHIEN, J.; CHAULET, C.; VIGHETTO, A.; CROISILE, B.; KROLAK-SALMON, P.; PERRET-LIAUDET, A.; TOUCHON, J.; LEHMANN, S. Decreased sA β PP β , A β 38, and A β 40 cerebrospinal fluid levels in frontotemporal dementia. *J Alzheimers Dis.* 2011;26(3):553-63. doi: 10.3233/JAD-2011-110515.

GABORIAU-ROUTHIAU, V.; RAKOTOBÉ, S.; LÉCUYER, E.; MULDER, I.; LAN, A.; BRIDONNEAU, C.; ROCHET, V.; PISI, A.; DE PAEPE, M.; BRANDI, G.; EBERL, G.; SNEL, J.; KELLY, D.; CERF-BENSUSSAN, N. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. **Immunity.** v. 31, p. 677-89, 2009.

GUPTA, V.; GARG, R . Probiotics. **Indian J Med Microbiol.** v. 27, p. 202-9, 2009.

HA, S.K.; CHAE, C. Inducible nitric oxide distribution int he fatty liver of a mouse with high fat diet-induced obesity. **Exp Anim.** v. 59, p. 595-604, 2010.

HAMAGUSHI, M.; KOJIMA, T.; TAKEDA, N. et. al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. **Ann Int Med,** v. 143, p. 722-728, 2005.

HONG, M.; KIM, S.W.; HAN, S.H.; KIM, D.J.; SUK, K.T.; KIM, Y.S.; KIM, M.J.; KIM, M.Y.; BAIK, S.K.; HAM, Y.L. Probiotics (Lactobacillus rhamnosus R0011 and acidophilus R0052) Reduce the Expression of Toll-Like Receptor 4 in Mice with Alcoholic Liver Disease. **PLoS One** DOI:10.1371/journal.pone.0117451. 2015.

IACONO, A.; RASO, G.M.; CANANI, R.B.; CALIGNANO, A.; MELI, R. Probiotics as an emerging therapeutic strategy to treat NAFLD: focus on molecular and biochemical mechanisms. **J Nutr Biochem.** v. 22, p. 699-711, 2011.

IARC. International Agency for Research on Cancer. **Global Cancer Observatory.** World Health Organization. 2018.

IMAJO, K., YONEDA, M., OGAWA, Y., WADA, K., NAKAJIMA, A. Microbiota and nonalcoholic steatohepatitis. **Semin Immunopathol,** v. 36(1), p.115-32, 2014.

IMAOKA, A.; ITOH, K.; TAKEDA, K.; UMESAKI, Y.; HONDA, K.; LITTMAN, D.R. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Cell.** v. 30, p.485-98, 2009.

INOKUCHI, S.; TSUKAMOTO, H.; PARK, E.; LIU, Z.X.; BRENNER, D.A.; SEKI, E. Toll-like receptor 4 mediates alcohol induced steatohepatitis through bone marrow-derived and endogenous liver cells in mice. **Alcohol Clin Exp Res.** v. 35(8), p.1509-18, 2011.

INZAUGARAT, M.E.; FERREYRA SOLARI, N.E.; BILLORDO, L.A.; ABECASIS, R.; GADANO, A.C.; CHERŃAVSKY, A.C. Altered phenotype and functionality of circulating immune cells characterize adult patients with nonalcoholic steatohepatitis. **J Clin Immunol.**v. 31, p.1120-30, 2011.

IVANOV, I.I.; ATARASHI, K.; MANEL, N.; BRODIE, E.L.; SHIMA, T.; KARAOZ, U.; WEI, D.; GOLDFARB, K.C.; SANTEE, C.A.; LYNCH, S.V.; TANOUE, T.;

IVANOV, I.I.; FRUTOS, RDE L.; MANEL, N.; YOSHINAGA, K.; RIFKIN, D.B.; SARTOR, R.B.; FINLAY, B.B.; LITTMAN, D.R. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. **Cell Host Microbe,** v. 4, p. 337-349, 2008.

JENA, P.K., SHENG, L., NAGAR, N., WU, C., BARILE, D., MILLS, D.A., WAN, Y.Y. Synbiotics Bifidobacterium(infantis) and milk oligosaccharides are effective in reversing cancer-prone nonalcoholic steatohepatitis using western diet-fed FXR knockout mouse models. **J Nutr Biochem.** v. 57, p. 246-254, 2018.

JUSTINO, P.F.; MELO, L.F.; NOGUEIRA, A.F.; MORAIS, C.M.; MENDES, W.O.; FRANCO, A.X.; SOUZA, E.P.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H.; SOARES, P.M. Regulatory role of Lactobacillus acidophilus on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemother Pharmacol.** V. 75, p.559-67, 2015.

KAMARI, Y.; SHAISH, A.; VAX, E.; SHEMESH, S.; KANDEL-KFIR, M.; ARBEL, Y.; OLTEANU, S.; BARSHACK, I.; DOTAN, S.; VORONOV, E.; DINARELLO, C.A.; APTE, R.N.; HARATS, D. Lack of interleukin-1 α or interleukin1 β inhibits transformation of steatosis to steatohepatitis and liver fibrosis in hypercholesterolemic mice. **J Hepatol.** v. 55, p. 1086-1094, 2011.

KANAMORI, M., NAKATSUKASA, H., OKADA, M., LU, Q., YOSHIMURA, A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. **Trends Immunol,** v. 37, p. 803-811, 2016.

KANAUCHI, O.;FUJIYAMA, Y.; MITSUYAMA, K.; ARAKI, Y.; ISHII, T.; NAKAMURA, T.; HITOMI, Y.; AGATA, K.; SAIKI, T.; ANDOH, A, TOYONAGA, A.; BAMBIA, T. Increased growth of Bifidobacterium and Eubacterium by germinated barley foodstuff, accompanied by enhanced butyrate production in healthy volunteers.**Int J Mol Med.** v. 3, p. 175-9. 1999.

KANEDA, N.; NAGATA, H; FURUTA, T; YOKOKURA, T. Metabolism and pharmacokinetics of the camptothecin analogue CPT-11 in the mouse. **Cancer Res.** v. 50, p. 1715-1720, 1990.

KAROUI, M.; PENNA, C; AMIN-HASHEM, M; MITRY, E; BENOIST, S; FRANC, B. Influence of preoperative chemotherapy on the risk of major hepatectomy for colorectal liver metastases. **Ann Surg.** v. 243 , p. 1–7, 2006.

KEIZMAN, D.; MAIMON, N.; ISH-SHALOM, M et. al. An animal model for chemotherapy-associated steatohepatitis and its prevention by the oral administration of fatty acid bile acid conjugate. **Cancer.** v. 116, n. 1, p. 251-5, 2010.

KIRPICH IA, MARSANO LS, MCCLAIN CJ. Gut-liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Biochem* 2015; 48(13-14):923–30.

KHANI, S.; HOSSEINI, H.M.; TAHERI, M.; NOURANI, M.R.; IMANI FOOLADI, A.A. Probiotics as an alternative strategy for prevention and treatment of human diseases: a review. **Inflamm Allergy Drug Targets.** v. 11, p.79-89, 2012.

KIRKALI, G.; GEZER, S.; UMUR, N et. al. Nitric oxide in chronic liver disease. **Turk J Med Sci.** v. 20, p. 511-515, 2000.

KLEINER, D.E.; BRUNT, E.M.; NATTA, M.V. et. al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology.** v. 41, p. 1313-1321, 2005.

KOIZUMI, W.; KURIHARA, M.; SATOH, A.; TAKIUCHI, H.; TANABE, S.; SHIMADA, K.; IWASAKI, R.; SAIGENJI, K. Phase I/II Study of Bi-weekly Irinotecan plus Cisplatin in the Treatment of Advanced Gastric Cancer **Anticancer Res,** v. 25, p. 1257-1262, 2006.

KURITA, A.; KADO, S.; KANEDA, N.; *et al.* Modified irinotecan hydrochloride (CPT–11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. **Cancer Chemotherapy Pharmacology,** v.46, p.211-220, 2000.

LEE, J.J., SUN, W. Options for Second-Line Treatment in Metastatic Colorectal Cancer. **Clin Adv Hematol Oncol.** v. 14(1), p. 46-54. 2016.

LOGUERCIO, C.; FEDERICO, A.; TUCCILLO, C.; TERRACCIANO, F.; D'AURIA, M.V.; DE SIMONE, C.; DEL VECCHIO BLANCO C. Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. **J Clin Gastroenterol.** v. 39, p.540-3, 2005.

LORENZO-ZÚÑIGA, V.; BARTOLÍ, R.; PLANAS, R.; HOFMANN, A.F.; VIÑADO, B.; HAGEY, L.R.; HERNÁNDEZ, J.M.; MAÑÉ, J.; ALVAREZ, M.A.; AUSINA, V.; GASSULL, M.A. Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats. **Hepatology.** v. 37(3), p.551-7, 2003.

MA, K.L.; RUAN, X.Z.; POWIS, S.H.; CHEN, Y.; MOORHEAD, J.F.; VARGHESE, Z. Inflammatory stress exacerbates lipid accumulation in hepatic cells and fatty livers of apolipoprotein E knockout mice. **Hepatology.** v. 48, p. 770-81, 2008.

MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion,** v. 17, p.135-150, 1978.

MADSEN, K.; CORNISH, A.; SOPER, P.; MCKAIGNEY, C.; JIJON, H.; YACHIMEC, C.; DOYLE, J.; JEWELL, L.; DE SIMONE C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. **Gastroenterology.** v. 121, p.580-91, 2001.

MALAGUARNERA, M.; VACANTE, M.; ANTIC, T.; GIORDANO, M.; CHISARI, G.; ACQUAVIVA, R.; MASTROJENI, S.; MALAGUARNERA, G.; MISTRETTA, A.; LI VOLTI, G.; GALVANO, F. Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharides in patients with non alcoholic steatohepatitis. **Dig Dis Sci.**v. 57, p. 545-53, 2012.

MAOR, Y., AND MALNICK, S. Liver Injury Induced by Anticancer Chemotherapy and Radiation Therapy. **Int J Hepatol.** 2013:815105, 2013.

MARCOLINO ASSIS-JÚNIOR, E.; MELO, A.T.; PEREIRA, V.B.M.; WONG, D.V.T.; SOUSA, N.R.P.; OLIVEIRA, C.M.G.; MALVEIRA, L.R.C.; MOREIRA, L.S.; SOUZA, M.H.L.P.; ALMEIDA, P.R.C.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P. Dual effect of silymarin on experimental non-alcoholic steatohepatitis induced by irinotecan. **Toxicol Appl Pharmacol.** V. 327, p. 71-79, 2017.

MATHIJSSEN, R.H.J.; JONG, F.A.; VAN SCHAİK, R.H.N.; LEPPER, E.R.; FRIBERG, L.E.; RIETVELD, T.; BRUIJN, P.; GRAVELAND, W.J., FIGG, W.D.; VERWEIJ, J.; SPARREBOOM, A. Prediction of irinotecan pharmacokinetics by use of cytochrome P450 3A4 phenotyping probes. **J. Natl. Cancer Inst**, v. 96, n. 21, p. 1585-9,. 2004.

MATRICON, J., BARNICH, N., ARDID, D. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Self Nonsell.** v. 1(4), p. 299–309, 2010.

MENCIN, A.; KLUWE, J.; SCHWABE, R. F. Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. **Gut.** v. 58, p. 704–720, 2009.

MIELE, L., VALENZA, V., LA TORRE, G. et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 49, p. 1877–87, 2009.

MIKALOUSKAS, S.; MIKALOUSKIENE, L.; BRUNS, H et. al. Dietary glycine protects from chemotherapy-induced hepatotoxicity. **Amino acids.** v. 40, n. 4, p. 1139-1150, 2011.

MISIAKOS, E.P.; KARIDIS N.P.; KOURAKLIS G. “Current Treatment for Colorectal Liver Metastases.” **World J Gastroenterol.**v. 17(36), p. 4067–75, 2011.

MIURA, K.; KODAMA, Y.; INOKUCHI, S.; SCHNABL, B.; AOYAMA, T.; OHNISHI, H.; OLEFSKY, J.M.; BRENNER, D.A.; SEKI, E. Toll-like receptor promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. **Gastroenterology.** v. 139(1), p. 323-34, 2010.

MIURA, K.; OHNISHI, H. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol.** v. 20(23), p. 7381-7391, 2014.

MORRIS-STIFF, G.; TAN, Y-M.; VAUTHEY, J.N. Hepatic complications following preoperative chemotherapy with oxaliplatin or irinotecan for hepatic colorectal metastases. **Eur J Surg Oncol**, v. 34, n. 6, p. 609-14, 2007.

MUKHERJEE, S. O imperador de todos os males: uma biografia do câncer. 1º ed, São Paulo, Companhia das Letras, 2012.

MULHALL, B.P.; ONG, J.P.; YOUNOSSI, Z.M. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 17, p. 1136–43, 2002.

NABAVI, S.; RAFRAF, M.; SOMI, M.H.; HOMAYOUNI-RAD, A.; ASGHARI-JAFARABADI, M. Effects of probiotic yogurt consumption on metabolic factors in individuals with nonalcoholic fatty liver disease. **J Dairy Sci.** V. 97, p.7386-93, 2014.

OKUBO, H.; SAKODA, H.; KUSHIYAMA, A.; FUJISHIRO, M.; NAKATSU, Y.; FUKUSHIMA, T.; MATSUNAGA, Y.; KAMATA, H.; ASAHARA, T.; YOSHIDA, Y.; CHONAN, O.; IWASHITA, M.; NISHIMURA, F.; ASANO, T. *Lactobacillus casei* strain Shirota protects against nonalcoholic steatohepatitis development in a rodent. **Am J Physiol.** V. 305, p.G911-8, 2013.

O'SULLIVAN, D.J. Genomics can advance the potential for probiotic cultures to improve liver and overall health. **Curr Pharm Des.** v. 14, p.1376-81, 2008.

PAPPO, I.; BERCOVIER, H.; BERRY, E.M.; HAVIV, Y.; GALLILY, R.; FREUND, H.R. Polymyxin B reduces total parenteral nutrition-associated hepatic steatosis by its antibacterial activity and by blocking deleterious effects of lipopolysaccharide. **J Parenter Enteral Nutr.** v. 16(6), p. 529-32, 1992.

PARVEZ, S.; MALIK, K.A.; AH KANG, S.; KIM, H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **J Appl Microbiol.** v. 100, p. 1171-85, 2006.

RAHEJA, G.; SINGH, V.; MA, K.; BOUMENDJEL, R.; BORTHAKUR, A.; GILL, R.K.; SAKSENA, S.; ALREFAI, W.A.; RAMASWAMY, K.; DUDEJA, P.K. *Lactobacillus acidophilus* stimulates the expression of SLC26A3 via a transcriptional mechanism. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 298, p.G395–G401, 2010.

RESTA-LENERT, S.; BARRETT, K.E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). **Gut.** v. 52, p.988-97, 2003.

RIVERA, C.A.; ADEGBOYEGA, P.; VAN ROOIJEN, N.; TAGALICUD, A.; ALLMAN, M.; WALLACE, M. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. **J Hepatol.** v. 47(4), p.571-9, 2007.

RIVERA, C.A., GASKIN, L.; ALLMAN, M.; PANG, J.; BRADY, K.; ADEGBOYEGA, P.; PRUITT, K. Toll-like receptor-2 deficiency enhances non-alcoholic steatohepatitis. **BMC Gastroenterol.** v. 28, p. 10:52, 2010.

RIVORY, L.P.; BOWLES, M.R.; ROBERT, J.; POND, S.M. Conversion of irinotecan (IRINOTECAN) to its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), by human liver carboxylesterase. **Biochem.Pharmacol.** v. 52, n. 7, p. 1103-11. 1996.

ROBINSON, S.M.; WILSON, C.H.; BURT, A.D.; MANAS, D.M.; WHITE, S.A. Chemotherapy-associated liver injury in patients with colorectal liver metastases: a systematic review and meta-analysis. **Ann Surg Oncol.** V. 19(13), p. 4287-99, 2012.

SABANATHAN, D., ESLICK, G.D., SHANNON, J. “The Use of Neoadjuvant Chemotherapy Plus Molecular Targeted Therapy in Colorectal Liver Metastases (CLM): A Systematic Review and Meta–Analysis.” **Clin Colorectal Cancer.** V. 15(4), p. e141-e147, 2016.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.; WOOLF, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.** v. 115, p. 1265–1275, 1995.

SACHS, D.; COELHO, F.M.; COSTA, V.V.; LOPES, F.; PINHO, V.; AMARAL, F.A.; et al. Cooperative role of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. . **Br J Pharmacol.** v. 162, p.72–83, 2011.

SATO, T.; HATATE, K.; IKEDA, A. *et al.* Treatment of advanced or recurrent colorectal cancer with irinotecan in Japan and elsewhere. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, v. 9, p. 1223-1228, 2008.

SATOH, T.; HOSOKAWA, M. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 38, p. 257-88, 1998.

SCHMITTEL, A.; JAHNKE, K.; THIEL E. & KEILHOLZ U. Neomycin as secondary prophylaxis for irinotecan-induced diarrhea. **Ann Oncol.** v. 5, p. 1296, 2004.

SCHWENGER, K.J.P., BOLZON, C.M., LI, C., ALLARD, J.P. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: the role of the gut bacteria. **Eur J Nutr.** doi: 10.1007/s00394-018-1844-5, 2018.

SINGH, V.; RAHEJA, G.; BORTHAKUR, A.; KUMAR, A.; GILL, R.K.; ALAKKAM, A.; MALAKOOTI, J.; DUDEJA, P.K. Lactobacillus acidophilus upregulates intestinal NHE3 expression and function. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** V. 303, p. G1393-401, 2012.

SOLGA, S.F.; DIEHL, A.M. Non-alcoholic fatty liver disease: lumen-liver interactions and possible role for probiotics. **J Hepatol.** v. 38, p. 681-7, 2003.

SOUZA, D.G.; VIEIRA, A.T.; SOARES, A.C.; PINHO, V.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q.; TEIXEIRA, M.M. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. **J Immunol.** V. 173, p. 4137-46, 2004.

SPENCER, M.D., HAMP, T.J., REID, R.W. et al. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency. **Gastroenterology**, v. 140, p. 976–86, 2011.

SPRUSS, A.; KANURI, G.; WAGNERBERGER, S.; HAUB, S.; BISCHOFF, S.C.; BERGHEIM I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. **Hepatology.** v. 50(4), p. 1094-104, 2009.

SZABO, G, VELAYUDHAM, A.; ROMICS JR, L.;; MANDREKAR, P. Modulation of Non-Alcoholic Steatohepatitis by Pattern Recognition Receptors in Mice: The Role of Toll-Like Receptors 2 and 4. **Alcohol Clin Exp Res.** v. 29, p. 140S-145S, 2005.

STIENSTRA, R.; VAN DIEPEN, J.A.; TACK, C.J.; ZAKI, M.H.; VAN DE VEERDONK, F.L.; PERERA, D.; NEALE, G.A.; HOOIVELD, G.J.; HIJMANS, A.; VROEGRIJK, I.; VAN DEN BERG, S.; ROMIJN, J.; RENSEN, P.C.. JOOSTEN, L.A.; NETEA, M.G.; KANNEGANTI, T.D. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 108, p. 15324-15329, 2011.

STRINGER, A.M.; GIBSON, R.J.; LOGAN, R.M.; BOWEN, J.M.; YEOH, A.S.; BURNS, J.; KEEFE, D.M. Chemotherapy-induced diarrhea is associated with changes in the luminal environment in the DA rat. **Exp Biol Med (Maywood)**,v. 232, p. 96-106, 2007.

TILG, H., MOSCHEN, A.R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology**, v.52, p.1836–46, 2010.

TAKAHASHI, Y.; FUKUSATO, T. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: overview with emphasis on histology. **World J Gastroenterol**, v. 16, p. 5280–5285, 2010.

TAKASUNA, K.; HAGIWARA, T.; HIROHASHI, M.; KATO, M.; NOMURA, M.; NAGAI, E.; YOKOI, T.; KAMATAKI, T. Involvement of β -glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative Irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. **Cancer Res.** v. 56, p. 3752-3757, 1996.

TREMAROLI, V., BACKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v. 489, p. 242–9, 2012.

TSUKUMO, D.M.; CARVALHO-FILHO, M.A.; CARVALHEIRA, J.B.; PRADA, P.O.; HIRABARA, S.M.; SCHENKA, A.A.; ARAÚJO, E.P.; VASSALLO, J.; CURI, R.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56(8), p. 1986-98, 2007.

TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; MAHOWALD, M.A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E.R.; GORDON, J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**.V. 444, p.1027-31, 2006.

UNDERWOOD, M.A., ARRIOLA, J., GERBER, C.W., KAVETI, A., KALANETRA, K.M., KANANURAK, A., et al. Bifidobacterium longum subsp. infantis in experimental necrotizing enterocolitis: alterations in inflammation, innate immune response, and the microbiota. **Pediatr Res.** v. 76, p. 326- 33, 2014.

VAN CUTSEM E, CERVANTES A, NORDLINGER B, ARNOLD D, ESMO Guidelines Working Group. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol.** 3:iii1-9. 2014.

VANDERHOOF, J.A.; METZ, M.J.; TUMA, D.J.; ANTONSON, D.L.; SORREL, M.F. Effect of improved absorption on development of jejunoileal bypass-induced liver dysfunction in rats. **Dig Dis Sci.** v. 25, p. 581-586, 1980.

VAUTHEY, J-N.; PAWLIK, TM.; RIBERO, D *et. al.*, Chemotherapy Regimen Predicts Steatohepatitis and an Increase in 90-Day Mortality After Surgery for Hepatic Colorectal Metastases. **J Clin Oncol**, v. 24, p. 2065-2072, 2006.

VELAYUDHAM, A.; DOLGANIUC, A.; ELLIS, M.; PETRASEK, J.; KODYS, K.; MANDREKAR, P.; SZABO, G. VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice. **Hepatology**. v. 49, p. 989-97, 2009.

VIJAY-KUMAR, M.; AITKEN, J.D.; CARVALHO, F.A.; CULLENDER, T.C.; MWANGI, S.; SRINIVASAN, S.; SITARAMAN, S.V.; KNIGHT, R.; LEY, R.; GEWIRTZ, A.T. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. **Science**. V. 328(5975), p. 228-31, 2010.

WALL, M.E.; WANI, M.C.; COOK, C.E. et al. Plant antitumor agents. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from camptotheca acuminata. **J Am Chem Soc**, v. 88, n. 16, p. 3888-3890, 1966.

WATANABE, T.; HIGUCHI, K.; KOBATA, A.; NISHIO, H.; TANIGAWA, T.; SHIBA, M.; TOMINAGA, K.; FUJIWARA, Y.; OSHITANI, N.; ASAHARA, T. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent. **Gut**. V. 57, p.181–187, 2008.

WEI, A.C.; GREIG, P.D.; GRANT, D. et al: Survival after hepatic resection for colorectal metastasis: a 10-year experience. **Ann Surg Oncol**, v. 13, p. 668-676, 2006.

WHO. World Health Organization. American Cancer Society. **Global Cancer Facts & Figures**. 3° Ed. Atlanta, 2015.

WEISKIRCHEN, R., AND TACKE, F. Immune surveillance of liver cancer in non-alcoholic fatty liver disease: excess lipids cause CD4 T-cells loss and promote hepatocellular carcinoma development. **Hepatobiliary Surg Nutr**. v. 5, p. 433–437, 2016.

WONG, D.V.T. **Mediação dos receptores TLR2, NOD1, e da proteína MYD88 na modulação da mucosite intestinal induzida pelo irinotecano**. Fortaleza; 2013. [Tese de Doutorado – Universidade Federal do Ceará].

WONG, D.V.; LIMA-JÚNIOR, R.C.; CARVALHO, C.B.; BORGES, V.F.; WANDERLEY, C.W.; BEM, A.X.; LEITE, C.A.; TEIXEIRA, M.A.; BATISTA, G.L.; SILVA, R.L.; CUNHA, T.M.; BRITO, G.A.; ALMEIDA, P.R.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. The Adaptor Protein Myd88 Is a Key Signaling Molecule in the Pathogenesis of Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis. **PLoS One**. DOI:10.1371/journal.pone.0139985, 2015.

WONG, V.W.; WON, G.L.; CHIM, A.M.; CHU, W.C.; YEUNG, D.K.; LI, K.C.; CHAN, H.L. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with probiotics. A proof-of-concept study. **Ann Hepatol**. v. 12, p.256-62, 2013.

YANG, S.Q.; LIN, H.Z.; LANE, M.D. et al. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 94, p. 2557–62, 1997.

YEUNG, C.Y.; CHAN, W.T.; JIANG, C.B.; CHENG, M.L.; LIU, C.Y.; CHANG, S.W.; CHIANG CHIAU, J.S.; LEE, H.C. Amelioration of Chemotherapy-induced Intestinal Mucositis by Orally Administered Probiotics in a Mouse Model. **PLoS One**, v. 10, 2015.

ZHAO, H.Y.; WANG, H.J.; LU, Z.; XU, S.Z. Intestinal microflora in patients with liver cirrhosis. **Chin J Dig Dis**. v. 5 p. 64-7, 2004.

ZORZI; D., LAURENT, A.; PAWLIK, T.M.; LAUWERS, G.Y.; VAUTHEY, J.N.; ABDALA, E.K. Chemotherapy-associated hepatotoxicity and surgery for colorectal liver metastasis. **British J Surg**, v. 94, p. 274–286, 2007.