

UNIVERSIDADE DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**AVALIAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS
INTESTINAIS, HEPÁTICAS E DE CONSTITUINTES
DA BARREIRA INTESTINAL EM *ZEBRAFISH*.**

TESE DE DOUTORADO

RAQUEL AYRES

PORTO ALEGRE, BRASIL.
2018

UNIVERSIDADE DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**AVALIAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS
INTESTINAIS, HEPÁTICAS E DE CONSTITUINTES
DA BARREIRA INTESTINAL EM *ZEBRAFISH*.**

RAQUEL AYRES

Orientadora: Profa. Dra. Úrsula Matte

Co-orientadora: Dra. Carolina Uribe Cruz

Colaboradora: Dra. Themis Reverbel da Silveira

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

PORTO ALEGRE, BRASIL.
2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Professora Úrsula Matte que aceitou ser minha orientadora, obrigada por me acolher. E agradecer também a co-orientação da Doutora Carolina Uribe Cruz, por me incentivar a realizar o meu doutorado e por estar sempre disponível quando necessário.

Não poderia deixar de agradecer a principal colaboradora e incentivadora deste trabalho, a Professora Doutora Themis Reverbel da Silveira, pela qual tenho grande admiração e carinho. Dra Themis me sinto honrada em ter sido sua última orientada do PPG e só tenho a agradecer o respeito, atenção, carinho e, claro também, as discussões científicas. Do fundo do coração só tenho a agradecer pela dedicação e o amor que tens pela pesquisa, nos inspirando a cada dia. Se hoje estou aqui és por sua causa. Muito obrigada.

Agradeço meu esposo, Conrado, com quem compartilho todas as etapas do meu crescimento e conhecimento nesses 12 anos em que estamos juntos. Quem sempre me apoiou e disse que eu sou capaz de atingir todos meus objetivos. Ultrapassou o TCC, a dissertação e agora a tese; e sabe-se lá o que ainda virá. Conrado não tenho como agradecer todo teu amor, dedicação e paciência. Obrigada por estar novamente compartilhando este momento especial.

Pai e Mãe agradeço por sempre acreditaram em mim, na minha capacidade e força. Não tenho como agradecer a dedicação, amor e o apoio de vocês. Obrigada por ultrapassarem todas as etapas comigo, e me incentivarem a ir em busca dos meus objetivos. Vocês são meu porto seguro, meus heróis. Amo vocês.

Agradeço a todos os colegas e colaboradores do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastrenterologia, Jessica, Amanda, Ana Carolina, Carolina, Juliana, Larisse e Gabriel. Obrigada pela colaboração e trabalho nos projetos e experimentos, pelos devidos momentos discussão de projetos, artigos e resultados, e os tão importantes momentos de lazer.

Em especial quero dizer à Jessica que foi muito importante para meu crescimento pessoal e profissional, obrigada pela ajuda, te levo no coração. Agradeço a dedicação e carinho da Amanda. E não posso deixar de te agradecer o menino do grupo, Gabriel, obrigada por ser parceiro, preocupado e ter me ajudado muito no experimento. Além de muito trabalho em equipe que foram prazerosos, quero dizer que nossos momentos de lazer foram muito especiais.

Vou fazer alguns agradecimentos para as pessoas que me apoiaram e dividiram este momento comigo. Fernanda Pereira, Silvia Bonna, nossos momentos dentro e fora do laboratório me fizeram perceber mulheres incríveis que tive ao meu lado. Agradeço ao grupo da Professora Dra. Ana Helena Paz, que me acolheram em especial a Michele e a Ana Carolina. Obrigada Prof. Ana que me aceitou como colaboradora do trabalho de cultivo celular de seu grupo de pesquisa. Obrigada pela confiança, carinho e respeito que tiveram por mim.

Não posso deixar de agradecer aos amigos que foram importantes e que participaram deste momento, mas da parte de fora do laboratório. Agradeço a Renata e a Beatriz, pelos momentos essenciais de café, risadas e conversas, foram muito importantes para mim. Luizy, minha carioca favorita, e Felipe, sempre disponível para dar uma voltinha e apoiando cada momento. E o que dizer dos primos como Vanessa e Rafael talvez somente agradecer seja pouco. A compreensão (pelas fugidas mais cedo para o laboratório nos finais de semana), a paciência, sempre dispostos a proporcionar alguns momentos de *relex*, vocês foram mais que essências para eu chegar até aqui nesta etapa final, saibam que vocês fazem parte desse momento, obrigada por tudo!

Gostaria de agradecer também aos funcionários do centro de pesquisa experimental, em especial Everaldo, Rosa e Emilly.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente por me proporcionar a oportunidade de realizar meu doutorado, pelo suporte e atenção.

Por fim gostaria de agradecer as agências de fomento CNPq, pela bolsa de doutorado e pelo financiamento do FIPE/HCPA. Sem as quais a pesquisa e o desenvolvimento intelectual obtido durante este período seria mais difícil.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A obesidade pode ser caracterizada pelo acúmulo do tecido adiposo e o aumento da massa de gordura gerando um estado pró-inflamatório. Alguns mecanismos têm sido associados às adipocinas e ao aumento da permeabilidade intestinal. A utilização do *zebrafish* como modelo de obesidade tem se apresentado promissor para compreensão das causas metabólicas da obesidade e de suas doenças associadas. **OBJETIVO:** Avaliar a expressão gênica de citocinas inflamatórias intestinais e hepáticas e de moléculas constituintes de barreira intestinal e em um modelo de obesidade induzido por dieta hipercalórica em *zebrafish*. **MATERIAIS E MÉTODOS:** O estudo foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa definiu-se a dieta para estabelecer a obesidade e avaliar presença de esteatose hepática. Avaliamos peso, índice de massa corporal (IMC) e presença de acúmulo de gordura no fígado por *Oil Red O*. O acúmulo de gordura foi quantificado por ImageJ e *Nile Red*. Na segunda etapa avaliamos níveis séricos do perfil lipídico, glicemia e expressão gênica de citocinas inflamatórias intestinal e hepática – *il-1 β* , *tnf- α* e *il-10* - e constituintes das *tight junction* (TJ) da barreira intestinal - claudina-c (*cldn-c*), claudina-15a (*cldn-15a*), claudina-15b (*cldn-15b*) e molécula de adesão juncional-A (*f11r*). **RESULTADOS:** Na primeira etapa 30 peixes foram divididos em três grupos (n=10): grupo controle (GC), grupo obesidade 20% (GO20) e grupo obesidade 30% (GO30), o volume de dieta padrão utilizada no GC foi correspondente a 10% do peso dos peixes; e os grupos GO20 e GO30 receberam o correspondente a 20% e 30% do peso, respectivamente. No final de quatro semanas de dieta hipercalórica (DHC) foram observados aumento de peso e de IMC e presença de esteatose hepática no GO30 quando comparados com os demais grupos. Na segunda etapa 60 peixes foram divididos em dois grupos (n=30): grupo controle (GC), que recebeu dieta correspondente a 10% do peso dos peixes; e o grupo obeso (GO), que recebeu dieta correspondente a 30% do peso dos peixes. Após quatro

semanas de dieta os animais do GO obtiveram aumento do nível sérico de triglicerídeos e glicemia quando comparados com o GC. O nível sérico de colesterol total não apresentou diferença entre os grupos. Os constituintes das TJ da barreira intestinal *cldn-c* e *f11r* apresentaram menor expressão gênica no GO. Contudo *cldn-15a* e *cldn-15b* não apresentaram diferença entre os grupos na sua expressão. Houve aumento na expressão gênica das citocinas intestinais *il-1 β* , *tnf- α* e *il-10* nos animais GO. Em relação às citocinas inflamatórias hepáticas houve aumento na expressão gênica de *il-1 β* enquanto a expressão gênica de *il-10* apresentou diminuição no GO em comparação com o grupo GC. Não houve diferença na expressão gênica intestinal de *tnf- α* entre os grupos. **CONCLUSÃO:** Nos animais submetidos à DHC houve aumento dos níveis séricos de triglicerídeos e de glicemia, e maior acúmulo de gordura no fígado. Também houve aumento na expressão gênica de citocinas inflamatórias intestinais e houve aumento na expressão da citocina inflamatória hepáticas *il-1 β* e diminuição de *il-10*. Houve diminuição na expressão de componentes das TJ *cldn-c* e *f11r* em *zebrafish* obesos. Esta última alteração pode levar ao aumento na permeabilidade intestinal.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Obesity can be characterized by the accumulation of adipose tissue and the increase of fat mass generating a pro-inflammatory state. Some mechanisms of this state have been associated with adipokines and increased intestinal permeability. The use zebrafish as obesity model has shown promise for understanding the metabolic causes of obesity and its associated diseases. **MATERIALS AND METHODS:** The study was divided into two steps. In the first step, the volume of diet to establish obesity in the animals was defined. We evaluated weight, body mass index (BMI) and presence of fat accumulation in the liver of the animals by histological staining with Oil Red O. And its quantification by ImageJ and Nile Red. In the second step, we evaluated serum lipid levels, glycaemia and gene expression of hepatic and intestinal inflammatory cytokines – *il-1 β* , *il-10* and *tnf- α* - and molecules constituents of *tight junction* (TJ) - claudin-c (*cldn-c*), claudin-15a (*cldn-15a*), claudin-15b (*cldn-15b*) e junctional adhesion molecules-A (*f11r*). **RESULTS:** Thirty fish were divided in three groups (n = 10): control group (CG), 20% obesity group (OG20) and 30% obesity group (OG30). In CG, the standard diet volume corresponds to 10% of fish weight; and the OG20 and OG30 groups received 20% and 30% weight diet, respectively. At the end of four weeks of hypercaloric diet (HCD) we observed weight gain, BMI increase and the presence of hepatic steatosis in GO30 when compared with the other groups. The second step was performed using 60 fish, which were divided into two groups (n = 30): control group (CG) and obese group (OG). After four weeks of diet, OG animals had increased serum triglycerides and glycaemia. When compared with the CG, serum levels of total cholesterol did not show any difference. The molecules constituents of TJ, *cldn-c* and the *f11r* had lower gene expression in the OG. However, *cldn-15a* and *cldn-15b* showed no difference in expression when the OG and CG groups were compared. There was an increase in the gene expression of the intestinal cytokines *il-1 β* , *tnf- α*

and il-10 in OG animals. In relation to hepatic inflammatory cytokines in OG, an increase in the *il-1 β* gene expression was observed while the *il-10* gene expression decreased. There was no difference in *tnf- α* between the groups. **CONCLUSION:** In obese animals submitted to hypercaloric diet there was an increase in triglyceride serum levels and glycaemia; besides fat accumulation in the liver. There was also alteration in gene expression of intestinal and hepatic inflammatory cytokines and components of the TJ of the intestinal epithelial barrier in obese zebrafish. This last alteration may lead to increased intestinal permeability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desequilíbrio inflamatório na obesidade.	22
Figura 2 - Representação simplificada da permeabilidade da barreira intestinal.	24
Figura 3 - Epitélio intestinal em homeostase.....	30
Figura 4 - Esquema das estruturas de proteínas da barreira intestinal.....	32
Figura 5 - Estrutura das <i>Tight Junctions</i>	33
Figura 6 - <i>Zebrafish</i> e sua localização geográfica.	38
Figura 7 - Comparação da arquitetura intestinal de mamíferos e de teleósteos.	40
Figura 8 - Comparação da arquitetura hepática de <i>zebrafish</i> e de humanos.	42
Figura 9 - Desenho Experimental e linha do tempo da primeira etapa do estudo.	54
Figura 10 - Desenho experimental e linha do tempo da segunda etapa do estudo.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos para avaliar a permeabilidade intestinal em seres humanos e em animais de experimentação.	26
Tabela 2 - Estudos de obesidade em <i>zebrafish</i> desencadeado por dieta.....	44
Tabela 3 - Composição nutricional da artêmia congelada.	50
Tabela 4 - Composição nutricional da ração complementar.	50
Tabela 5 - Sondas Taqman utilizadas para as análises de citocinas inflamatórias hepáticas e intestinas e da barreira intestinal.	60

LISTA DE ABREVEATURAS E SÍMBOLOS

cDNA – *Complementary desoxiribonucleic acid*

cldn – Claudina

cldn-15a - Claudina-15a

cldn-15b – Claudina-15b

cldn-c – Claudina-c

CNPq – Conselho Nacional para Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DHC – Dieta hipercalórica

DHGA – Doença hepática gordurosa não alcoólica

dps - Dias pós-fertilização

ef α -1 – *Elongation factor alpha-1*

EHNA – Esteatohepatite não alcoólica

ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay*

FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos

GC – Grupo controle

GO – Grupo obesidade

HCPA- Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HE – Hematoxilina e eosina

hpf - Horas pós-fertilização

Ig – Imunoglobina

IL-10 - Interleucina-10

IL-1 β - Interleucina-1 beta

IL-6 – Interleucina-6

IMC – Índice de massa corporal

JA – Junções aderentes

JAM – *Junctional adhesion molecules*

LEHG – Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia

LPS – Lipopolissacarídeo

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos-1

ND – Não descrito

NR – *Nile Red*

OID – Obesidade induzida por dieta

OMS – Organização Mundial da Saúde

OR - *Oil Red O*

PAI-1 – Inibidor do ativador de plasminigênio-1

PBS – *Phosphate buffered saline*

PCR – *Polymerase chain reaction*

PI - Permeabilidade intestinal

qRT-PCR - *Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time*

RNA – *Ribonucleic acid*

SPSS – Statistical Package for Social Sciences

TJ – *Tight junction*

TLRs – *Toll-like receptor*

TNF- α – *Tumor necrosis factor -alpha*

UAMP - Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas

UEA – Unidade de Experimentação Animal

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

WT – *Wild type*

ZO – Zônula ocludente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 OBESIDADE.....	19
2.1.1 Aspectos gerais.....	19
2.1.2 Condições patológicas relacionadas	20
2.2 PERMEABILIDADE INTESTINAL	22
2.2.1 Barreira do epitélio intestinal.....	29
2.2.2 <i>Tight junctions</i> e suas constituintes	31
2.2.2.1 Claudinas	32
2.2.2.2 Zônulas ocludentes	34
2.2.2.3 Moléculas de adesão juncional	34
2.2.2.4 Outros componentes da barreira intestinal	35
2.2.2.5 Componentes da barreira epitélio intestinais em <i>zebrafish</i>	36
2.3 EIXO ENTERO-HEPÁTICO.....	37
2.4 <i>ZEBRAFISH</i> COMO MODELO EXPERIMENTAL	38
2.4.1 Considerações gerais	38
2.4.2 <i>Zebrafish</i> como modelo de obesidade.....	43
3 JUSTIFICATIVA	46
4 OBJETIVOS	47
4.1 OBJETIVO GERAL.....	47
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47

5 HIPÓTESE	48
6 MATERIAIS E MÉTODOS	49
6.1 LOCAL.....	49
6.2 ANIMAIS E CÁLCULO AMOSTRAL.....	49
6.3 DIETA	52
6.4 ETAPA 1: ESTABELECIMENTO DO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDO POR DIETA HIPERCALÓRICA EM <i>ZEBRAFISH</i> ADULTOS.....	53
6.4.1 Avaliação do peso e IMC	54
6.4.2 Avaliação dos aspectos histológicos do fígado	55
6.4.3 Quantificação dos lipídeos hepáticos por <i>Nile Red</i>	56
6.5 ETAPA 2: AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS PATOLÓGICOS ASSOCIADOS COM A OBESIDADE.....	56
6.5.1 Avaliação do perfil bioquímico no soro	57
6.5.2 Avaliação glicemia	58
6.5.3 Quantificação de lipídeos por <i>Oil Red O</i>	59
6.5.4 Expressão gênica de citocinas inflamatórias e de constituintes das <i>tight junctions</i> . 59	
6.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	60
6.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
7 ARTIGO 1: ZEBRAFISH OBESITY MODEL INDUCED BY HYPERCALORIC DIET FOR FOUR WEEKS	69
8 ARTIGO 2: INFLAMMATORY CYTOKINES AND INTSTINAL BARRIER IN OBESE ZEBRAFISH	86
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	107

10 CONCLUSÕES.....	109
ANEXOS.....	111
ANEXO C – APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	112

1 INTRODUÇÃO

A obesidade tem se tornado um dos maiores desafios na saúde pública em todo o mundo. A prevalência de obesidade mundial mais que dobrou entre os anos de 1980 e 2014 (WHO | Obesity and overweight, 2016). O Ministério da Saúde, do Brasil, divulgou uma pesquisa que revela que mais da metade da população brasileira está acima do peso. Segundo dados da Vigitel de 2017, 53,8% da população estava acima do peso no ano de 2016 e 18,9% obesos (ABESO, 2016).

A obesidade é definida, de forma simplificada, como doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo no organismo. Como consequência do balanço energético positivo e acarreta repercussões à saúde, com perda na qualidade de vida (FONTAINE, 2001; STEWART *et al.*, 2009). Dentre as comorbidades associadas à obesidade podemos citar dislipidemia, pressão sanguínea elevada, resistência insulínica, deposição central de gordura e aumento da inflamação (AGUILAR-VALLES *et al.*, 2015; FIERABRACCI *et al.*, 2015; JEBB *et al.*, 2004).

A obesidade tem causas multifatoriais e resulta de interação de fatores genéticos, metabólicos, sociais, comportamentais e culturais (JEBB *et al.*, 2004). Na maioria dos casos, associa-se ao abuso de ingesta calórica e ao sedentarismo, em que o excesso de calorias armazena-se como tecido adiposo, gerando o balanço energético positivo (KOLOTKIN *et al.*, 2001). O excesso de massa adiposa está associado a níveis aumentados de marcadores pró-inflamatórios, caracterizando a doença como um estado inflamatório crônico de baixa intensidade propenso ao desenvolvimento de fatores debilitantes (AGUILAR-VALLES *et al.*, 2015). A obesidade parece estar relacionada com a inflamação através de alguns mecanismos como: a hipóxia, infiltração e acúmulo de macrófagos e aumento na permeabilidade intestinal (AGUILAR-VALLES *et al.*, 2015). O desequilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias,

favorece as moléculas pró-inflamatórias contribuindo eventualmente para o desenvolvimento de doenças associadas.

O modelo animal *zebrafish* se tornou uma ferramenta científica bastante importante para a comprovação e para a compreensão da causa metabólica da obesidade e de suas doenças associadas (FORN-CUNÍ *et al.*, 2015; SCHLEGEL e GUT, 2015). As larvas de *zebrafish* foram inicialmente utilizadas para o estudo genético e para o “*screening*” químico para o desenvolvimento de drogas tendo como alvo a obesidade (CHU *et al.*, 2012; JONES *et al.*, 2008). Alguns tipos de doenças relacionadas a obesidade como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) podem ser induzidos em *zebrafish* adultos saudáveis tanto quimicamente, com uso de temoxifen (ANEZAKI *et al.*, 2009), como por uma dieta hipercalórica (OKA *et al.*, 2010). Além disso, o modelo de obesidade induzido por dieta (OID) padronizado por Oka e colaboradores demonstrou que o *zebrafish* partilha com os mamíferos as vias fisiopatológicas da obesidade (OKA *et al.*, 2010). O modelo de OID em *zebrafish* tem sido utilizado para validar os efeitos de produtos naturais, como por exemplo, o extrato de chá verde, na obesidade, como nos trabalhos de Tainaka e colaboradores (2011) (TAINAKA *et al.*, 2011) e Hasumura e colaboradores (2012) (HASUMURA *et al.*, 2012).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 OBESIDADE

2.1.1 Aspectos gerais

A obesidade é um dos principais problemas de saúde pública, constituindo-se em uma epidemia mundial responsável pelo aumento da morbimortalidade, uma vez que suas consequências elevam o risco de possíveis e graves complicações (AGUILAR-VALLES *et al.*, 2015; FONTAINE, 2001; REUSER *et al.*, 2009). A obesidade é definida como uma doença crônica, complexa e multifatorial, caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo no organismo (JEBB *et al.*, 2004; KOLOTKIN *et al.*, 2001; REUSER *et al.*, 2009). Geralmente está associada ao abuso de ingestão calórica e ao sedentarismo, em que o excesso de calorias armazena-se como tecido adiposo, gerando o balanço energético positivo acarretando perda na qualidade de vida (FONTAINE, 2001; STEWART *et al.*, 2009). Na obesidade há um conjunto de distúrbios metabólicos que levam a distintas e diversificadas comorbidades (ABESO, 2016; CAMPBELL, 2014; HASLAM e JAMES, 2005). Dentre as comorbidades associadas à doença da obesidade podemos citar dislipidemia (CARDIOLOGIA, 2005; JAHANGIR *et al.*, 2014), pressão sanguínea elevada, resistência insulínica (BLÜHER, 2013; CARDIOLOGIA, 2005), deposição central de gordura (CARDIOLOGIA, 2005) e aumento dos processos inflamatórios (JAHANGIR *et al.*, 2014).

De acordo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a prevalência de obesidade mundial se expandiu entre os anos de 1980 e 2014. A OMS classifica a obesidade baseando-se no índice de massa corporal (IMC) definido pelo cálculo do peso corporal, em quilogramas, dividido pelo quadrado da altura, em metros ($IMC = kg / m^2$) (“OMS | Publicações Da OMS” 2014). A obesidade caracteriza-se quando o IMC do indivíduo se encontra acima de $30 kg / m^2$. A OMS

define a gravidade da obesidade em: grau I (moderado excesso de peso) quando o IMC se situa entre 30 e 34,9 kg / m², obesidade grau II (obesidade leve ou moderada) com IMC entre 35 e 39,9 kg / m² e, por fim, obesidade grau III (obesidade mórbida) na qual IMC ultrapassa 40 kg / m² (WHO | Obesity, 2014).

O Ministério da Saúde do Brasil divulgou uma pesquisa que revela que mais da metade da população brasileira está acima do peso. Segundo dados da Vigitel (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) em 10 anos, a prevalência da obesidade cresceu 60%, passando de 11,8% em 2006 para 18,9% em 2016, atingindo quase um em cada cinco brasileiros. Nestes mesmos 10 anos a prevalência de excesso de peso cresceu 26,3%, atingindo 53,8% da população (BRASIL, 2017). Segundo Bloch e colaboradores (2016) uma a cada três crianças brasileiras, entre 5 e 9 anos, apresentam excesso de peso, e em torno de 15% estão com obesidade. Entre adolescentes de 12 a 17 anos, 25,5% estão com excesso de peso e aproximadamente 8,4% estão obesos (BLOCH KV, 2016).

2.1.2 Condições patológicas relacionadas

As condições patológicas relacionadas à obesidade estão associadas com inflamação crônica, caracterizada por produção anormal de citocinas, gerando a hipótese de a obesidade ser um processo inflamatório crônico e sistêmico de baixo grau (ROCHA e FOLCO, 2011; SYMONDS *et al.*, 2009).

O entendimento de que a inflamação desempenha um papel crítico na patogênese de distúrbios derivados da obesidade levou a abordagens terapêuticas que visam diferentes pontos da rede inflamatória induzida por obesidade (ROCHA e FOLCO, 2011).

A obesidade está fortemente associada à resistência à insulina, hipertensão arterial e dislipidemia. Há evidências de que o estado de inflamação crônica têm um papel crucial na patogênese da disfunção metabólica relacionada à obesidade (MATARESE *et al.*, 2017). O

excesso de massa adiposa está associado a níveis aumentados de marcadores pró-inflamatórios, através da produção de mediadores parácrinos, as adipocinas (MATARESE *et al.*, 2017; ROCHA e FOLCO, 2011; ROCHA e LIBBY, 2009). Essas moléculas regulam o metabolismo de carboidratos e lipídios, função imune e podem servir como marcadores, no sangue, do risco cardiovascular (ROCHA e FOLCO, 2011).

O tecido adiposo de um indivíduo obeso produz quantidades aumentadas de mediadores inflamatórios e apresenta maior número de células inflamatórias com papéis potencialmente importantes na fisiopatologia de obesidade, local ou sistemicamente (MATARESE *et al.*, 2017). Algumas adipocinas apresentam-se diferentemente expressas tais como, fator de necrose tumoral (TNF- α), proteína quimiotática de monocitos-1 (MCP-1), inibidor do ativador do plasminogenio-1 (PAI-1), interleucina-6 (IL-6), leptina e adiponectina (MATARESE *et al.*, 2017; MÜLLER *et al.*, 2002; SPRANGER *et al.*, 2003).

Hotamisligil postula que a sobrecarga de nutrientes em células metabólicas, como adipócitos induz o estresse intracelular que resulta na ativação de cascatas inflamatórias (HOTAMISLIGIL, 2006). Também é possível que, em excesso, os próprios nutrientes possam ativar sensores imunológicos de patógenos na célula, como os receptores *Toll-likes* (TLRs), que respondem ao excesso de ácidos graxos e podem contribuir para a resistência à insulina (SHI *et al.*, 2006).

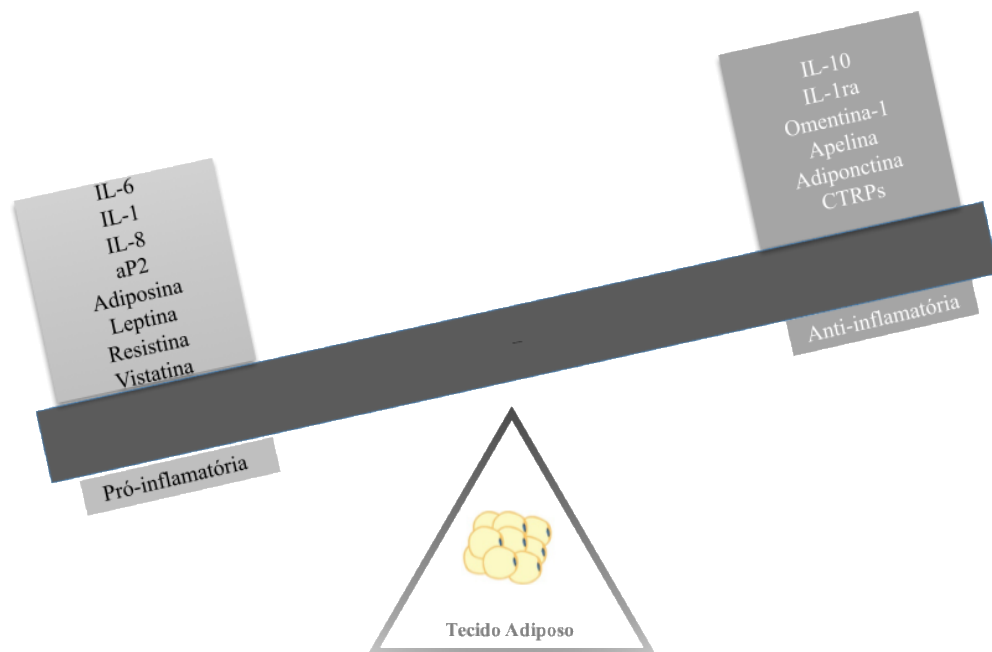
As adipocinas também são liberadas por células endoteliais e macrófago do tecido adiposo, contribuindo para a geração de um estado inflamatório de baixo grau (AGUILAR-VALLES *et al.*, 2015; SYMONDS *et al.*, 2009; TRAYHURN e WOOD, 2004; WINER *et al.*, 2016).

Diversos mecanismos têm sido sugeridos para o incremento destas adipocinas como: remodelação inflamatória adaptativa do tecido adiposo branco (recrutamento de macrófagos); hipóxia devido ao aumento do tamanho dos adipócitos (aumento do estresse oxidativo) e

aumento da permeabilidade intestinal (endotoxemia e alteração na microbiota) e associado à resposta inflamatória (AGUILAR-VALLES *et al.*, 2015; WINER *et al.*, 2016).

Durante a obesidade o equilíbrio entre a secreção de moléculas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é favorecido para a secreção das pró-inflamatórias, ocasionando um desequilíbrio entre estas moléculas (Figura 1)(AGUILAR-VALLES *et al.*, 2015).

Figura 1 - Desequilíbrio inflamatório na obesidade



O equilíbrio de adipocitocinas pró e anti-inflamatórias secretadas pelo tecido adiposo é desviado para um estado pró-inflamatório durante a obesidade. Fonte: Modificado de Agullar-Valles et al, 2015.

2.2 PERMEABILIDADE INTESTINAL

O epitélio intestinal possui funções importantes na manutenção da saúde, tanto pela sua propriedade de absorver fluidos e nutrientes, quanto a de impedir que patógenos e toxinas rompam sua barreira e entrem na circulação sistêmica e causem danos ao organismo. Trata-se de uma função regulatória, com propriedade de absorção seletiva sobre íons, moléculas e demais componentes, permitindo ou não a sua passagem, enquanto sua estrutura e função de barreira se mantêm preservadas. Dessa forma, os termos “barreira intestinal” e “permeabilidade

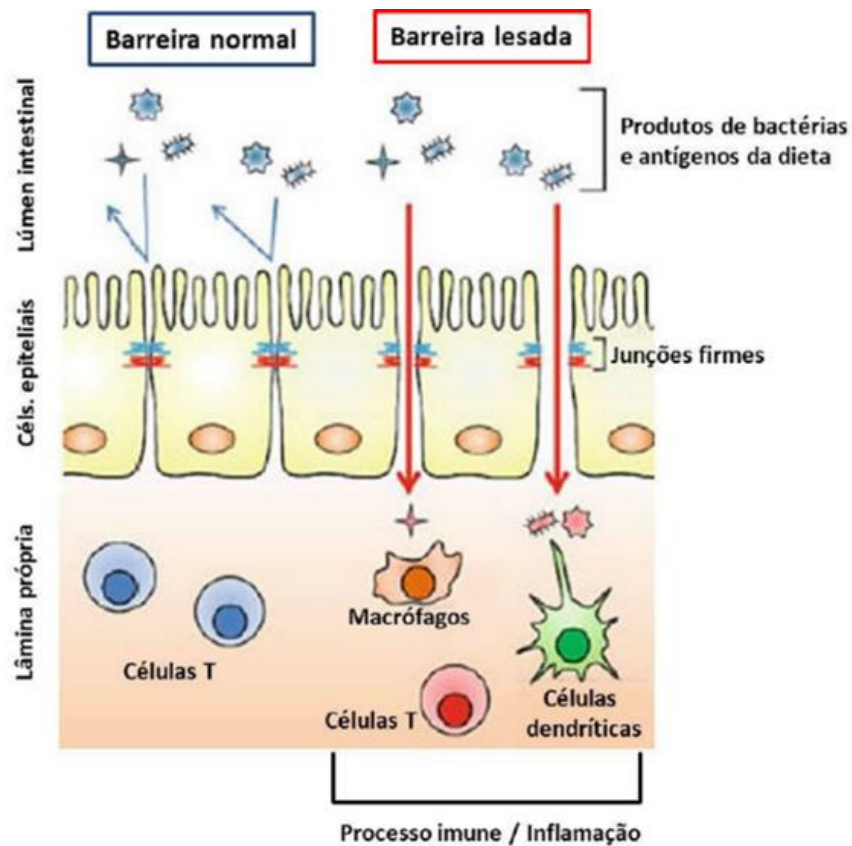
intestinal” descrevem dois aspectos diferentes da mesma estrutura anatômica, a parede do epitélio intestinal (BISCHOFF *et al.*, 2014).

A permeabilidade intestinal (PI) pode ser definida como uma característica mensurável da barreira intestinal (BISCHOFF *et al.*, 2014), e diz respeito à entrada de componentes originalmente pertencentes à luz intestinal para dentro da lamina própria do intestino. Essa entrada pode ocorrer por via paracelular, que é a preferida de íons e moléculas pequenas e hidrofílicas (< 600 kda), ou por via transcelular por endocitose, difusão passiva ou via transportadores, no caso de moléculas grandes, antigênicas e lipofílicas (TURNER, 2009).

A regulação da permeabilidade da barreira intestinal possui dois elementos centrais, que estabilizam e mantêm a sua função de barreira epitelial. Primeiro, a capacidade de renovação controlada das células, que é obtida através de um equilíbrio bem regulado entre proliferação celular e apoptose, e em segundo lugar, a presença de junções intercelulares efetivas (MANRESA e TAYLOR, 2017), que constituem uma complexa arquitetura celular, e interagem com os demais componentes do epitélio intestinal, formando uma barreira semipermeável.

A perturbação da barreira intestinal pode determinar aumento de passagem de moléculas do lúmen para a lâmina própria, induzindo uma resposta do sistema imunológico e atuando como gatilho para o desenvolvimento de doenças intestinais e sistêmicas (Figura 2) (ODENWALD e TURNER, 2013; SUZUKI, 2013).

Figura 2 - Representação simplificada da permeabilidade da barreira intestinal



O epitélio intestinal fornece uma barreira física às bactérias do lúmen, toxinas e antígenos. A barreira é organizada por diferentes componentes, incluindo as TJs. As TJs regulam a passagem de íons paracelular, solutos e água entre células adjacentes. As TJ impedem que as macromoléculas nocivas do lúmen entrem no epitélio. No entanto, o comprometimento da barreira TJ permite a passagem de moléculas nocivas, que podem induzir a ativação excessiva de células imunes e inflamação. Portanto, defeitos na barreira intestinal são associados à iniciação e ao desenvolvimento de várias doenças intestinais e sistêmicas. Fonte: Traduzido Susuki et al, 2013.

A entrada de bactérias ou de produtos bacterianos, como lipopolissacarídeos (LPS), através da barreira intestinal está associada com o desenvolvimento de inflamação crônica e da doença metabólica em obesos, tanto em humanos como em modelos animais (CANI *et al.*, 2008; TEIXEIRA, COLLADO, *et al.*, 2012; TEIXEIRA, SOUZA, *et al.*, 2012). Há evidências que a redução da expressão das proteínas *tight junction* (TJ) e da degeneração de integridade da barreira epitelial é uma característica desta permeabilidade, no entanto, os mecanismos subjacentes e associados permanecem mal definidos ou não elucidados (CANI *et al.*, 2008; TEIXEIRA, COLLADO, *et al.*, 2012).

A realização de uma avaliação *in vivo* da função de barreira intestinal e sua permeabilidade é possível. Pode-se utilizar o tecido intestinal em ensaios de permeabilidade, e através da avaliação de biomarcadores de integridade epitelial, da avaliação de biomarcadores de imunidade ou inflamação, ou ainda de marcadores bacterianos como a endotoxina circulante (Tabela 1). Além disso, abordagens histológicas e análises de microscopia eletrônica são utilizadas para visualização das configurações estruturais do citoesqueleto das células (BISCHOFF *et al.*, 2014).

As técnicas utilizadas para a avaliação da integridade da barreira e sua permeabilidade varia dependendo da configuração (*in vitro* ou *in vivo*), da espécie (humanos ou animais), dos tipos de moléculas utilizadas para avaliação (íons, carboidratos de diferentes tamanhos, macromoléculas e antígenos, produtos bacterianos e bactérias) e dos tipos de amostras biológicas usadas para a medição das moléculas marcadoras (sangue periférico, sangue da veia porta, urina). Algumas das diferentes técnicas e suas respectivas características estão descritas da Tabela 1 (BISCHOFF *et al.*, 2014).

Tabela 1 - Métodos para avaliar a permeabilidade intestinal em seres humanos e em animais de experimentação

	Hu	Na	Moléculas teste	Sítio teste	Material necessário	Desvantagem
<i>I-Testes de funcionalidade e relacionados com bactérias</i>						
<i>A.Ex vivo</i>						
Ussing chamber	X	X	H ₂ O, íons, açúcar, etc.	Sítio específico	Biopsia	Invasivo
<i>B.In vivo – ensaio de permeabilidade</i>						
Lactulose/manitol	X	X		Intestino delgado	Urina	Demorado
Sucralose	X	(x)		Colón	Urina	Demorado
Sucrose	X	(x)		Estômago	Urina	Demorado
⁵¹Cr-EDTA	X	X		Todo intestino	Urina	Radioativo
<i>C.In vivo- relacionado com bactérias</i>						
LAL ensaio	X	X	Endotoxina LPS	Todo intestino	Plasma	Limitações técnicas
EndoCAB	X	X	Anticorpo anti-LPS	Todo intestino	Soro	Somente em fase aguda
D-lactato	X	X	Lactato Bacteriano	Todo intestino	Plasma	Baixa especificidade
Teste hemolisina	X	X	Patógenos (cultura de células)	Colón	Fezes	Laboratórios específicos, limitações resultados

Esteatose hepática	X	X	Teor de gordura no fígado	Todo intestino	MRT/US	Não específico
Teste respiração	X	X	Teor de gordura no fígado	Todo intestino	GC/MS	Especificidade pouco clara
II-Utilização de Biomarcadores e Histologia						
A.In vivo – biomarcadores de dano nas células epiteliais						
Citrulina	X	X	Produto ep.endógeno	Intestino delgado	Plasma	
FABP	X	X	Marcador ep.endógeno	Sítio específico	Plasma	Somente fase aguda
αGST	X	X	Enzima ep.endógena	NA	Plasma/urina	Somente fase aguda
Claudina-3	X	X	Proteína <i>tight junction</i> epitelial	NA	Urina	Resultado limitado
Teste α1-anti-tripsina	X	(x)	Aminoácidos endógenos	Intestino delgado	Soro/Fezes	Especificidade pouco clara
sIgA	X	X	IgA (ELISA)	Todo intestino	Soro	Baixa especificidade
B.In vivo - abordagens histológicas						
Expressão de Tight junctions	X	X	RNA (qPCR), Western blot	Sítio-específico	Biopsia	Invasivo
Análise das células de Goblet	X	X	Histologia	Sítio-específico	Biopsia	Invasivo

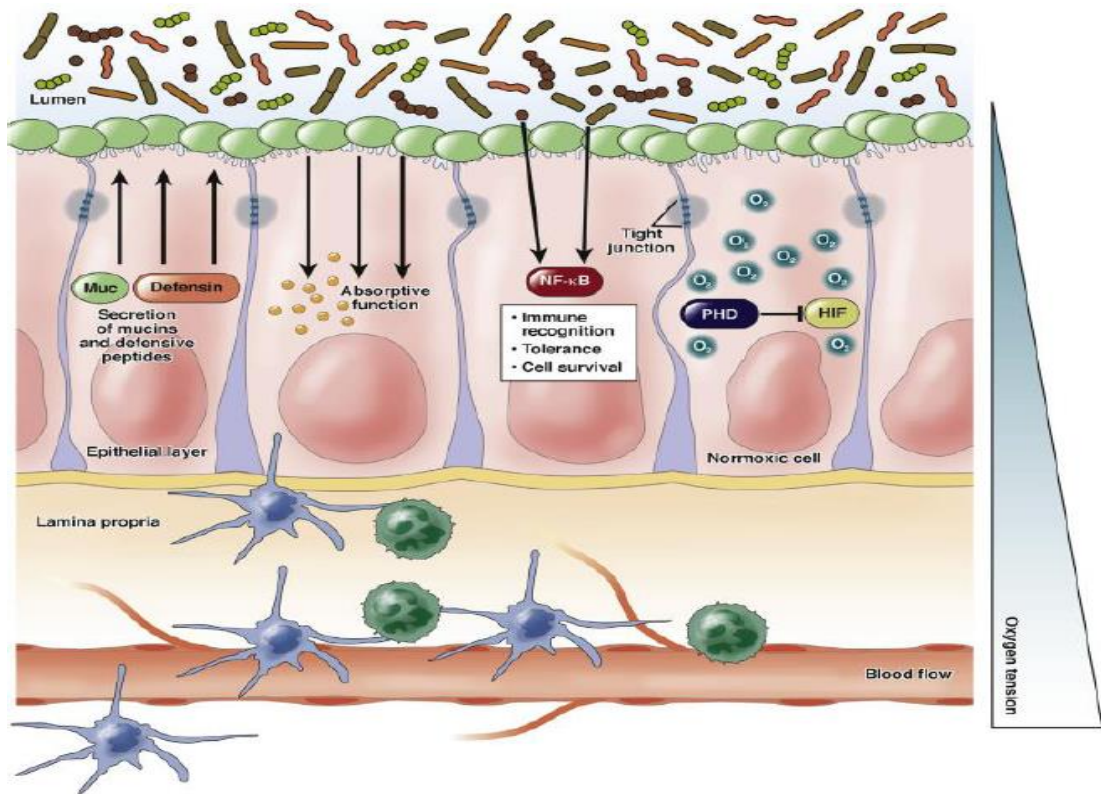
Perda do epitélio	X	X	Histologia	Sítio-específico	Biopsia	Invasivo
Defensinas			RNA (qPCR), Western blot	Sítio-específico	Biopsia	Invasivo

Hu=humanos; An=animais. Ep=epitelial. NA-não aplicavel. α GST: α -glutathiona S-transferase. FABP: proteína de ligação de ácido graxo. qPCR: PCR quantitativo (Modificado de Bischoff *et al.*, 2014)

2.2.1 Barreira do epitélio intestinal

O epitélio intestinal funciona como uma barreira física que restringe a entrada de moléculas antigênicas, ao mesmo tempo em que convive em equilíbrio com a exposição a uma quantidade enorme de componentes dietéticos e microbianos (CRESCI e BAWDEN, 2015). A parede do epitélio intestinal é composta por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa, sendo constituída por componentes celulares como o endotélio vascular, o revestimento das células epiteliais e a camada de muco (MAYNARD *et al.*, 2012). A capacidade de contenção da barreira intestinal é considerada dinâmica, pois pode ser afetada por diversos fatores como doenças, medicamentos, hormônios, citocinas e toxinas exógenas (LEE, 2015; SUZUKI, 2013), como mostra a figura 3.

Figura 3 - Epitélio intestinal em homeostase



O epitélio intestinal forma uma barreira que separa o lúmen da lâmina própria. As células epiteliais desempenham várias funções, como a produção de mucinas, defensinas e absorção de nutrientes. As *tight junctions* regulam seletivamente a passagem de componentes do lúmen para o meio interno. Fonte: Manresa e Taylor, 2017.

A função da barreira do epitélio intestinal, portanto, é de evitar o acesso de patógenos, toxinas e antígenos a partir do lúmen intestinal para a lâmina própria, atingindo os tecidos da mucosa e corrente sanguínea ativando moléculas pró-inflamatórias (BISCHOFF *et al.*, 2014).

A principal barreira física é constituída por uma única camada de células epiteliais entre o lúmen e a mucosa. O espaço paracelular é selado pelas TJ que regulam a passagem de íons aquosos e pequenas moléculas através da composição de claudinas e outras proteínas do complexo juncional (BALDA e MATTER, 2016; GROSCHWITZ e HOGAN, 2009). Abaixo das TJ estão as junções aderentes, que são importantes na sinalização celular e restauração epitelial, assim como os desmossomos que mantêm a estabilidade epitelial (BISCHOFF *et al.*, 2014). Dessa forma, junções aderentes e desmossomos são responsáveis pela manutenção da

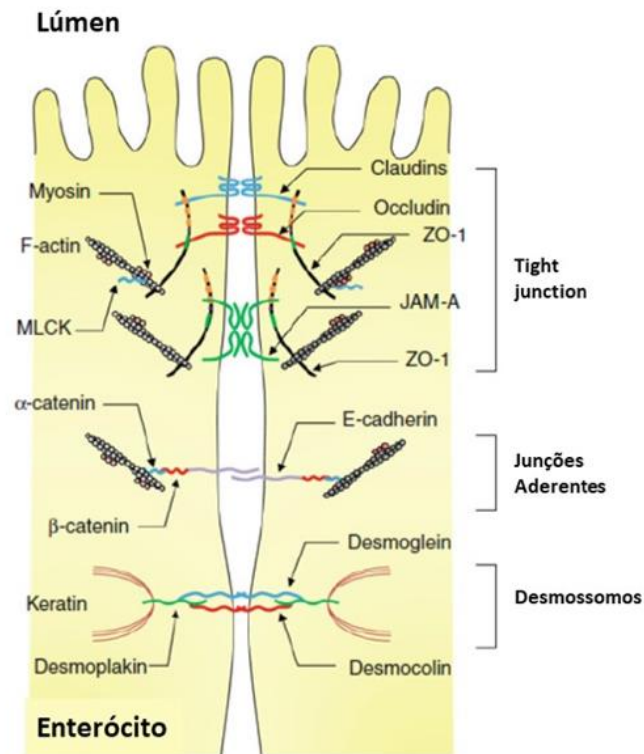
proximidade entre células através de conexões moleculares intercelulares, enquanto as TJ são responsáveis pela selagem do espaço paracelular (MANRESA e TAYLOR, 2017).

2.2.2 *Tight Junctions* e suas constituintes

As principais estruturas que regulam a passagem paracelular de macromoléculas são as junções firmes (do inglês *Tight Junctions*, TJ, figura 4), que são complexos multiprotéicos, localizados na extremidade apical da membrana das células intestinais. São responsáveis pela regulação da passagem paracelular de íons, solutos e água, e também pelo bloqueio da difusão de proteínas e lipídios, mantendo a polaridade celular (ODENWALD e TURNER, 2013; SUZUKI, 2013).

Em nível molecular, as TJ são constituídas por grupos de proteínas transmembranas cujos domínios extracelulares formam uma barreira seletiva por interações com as células adjacentes: claudinas (cldn), ocludinas, moléculas de adesão juncional (JAM) e a zônula ocludente (ZO) (Figura 4) (SUZUKI, 2013).

Figura 4 - Esquema das estruturas de proteínas da barreira intestinal

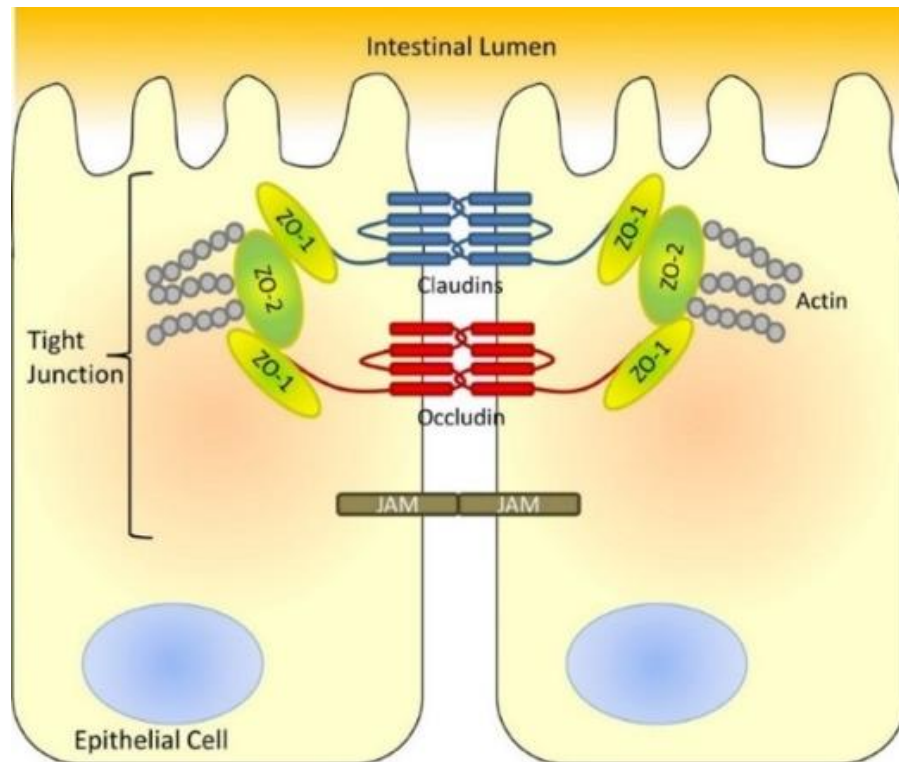


Logo abaixo da base da microvilosidades, as membranas plasmáticas das células adjacentes são fundidas por meio das junções firmes (TJ). As proteínas formadoras dessas junções são as claudinas, ocludina e ZO-1, que interagem com os filamentos do citoesqueleto (F-actina e Miosina). Mais abaixo se encontram as proteínas das Junções aderentes e os Desmossomos, que estão localizados abaixo do complexo juncional apical. Fonte: Traduzido de Suzuki, et al, 2013.

2.2.2.1 Claudinas

As proteínas transmembranas medeiam as adesões e vedam os espaços paracelulares, podendo ser divididas conforme a quantidade de alças proteicas que cruzam a membrana plasmática. As famílias das ocludinas, claudinas e a tricellulina são proteínas que contêm quatro alças transmembranas e duas extracelulares (Figura 5) (BISCHOFF *et al.*, 2014).

Figura 5 - Estrutura das *Tight Junctions*



Representação esquemática de proteínas das *tight junctions* de células epiteliais intestinais e sua localização. Fonte: Traduzido de Collins et al., 2017.

As claudinas (CLDNS) são uma família de proteínas multigênicas que contêm pelo menos 24 tipos em humanos e camundongos e cada isoforma mostra um padrão único de expressão em determinado tecido ou linhagem celular (BISCHOFF *et al.*, 2014; LEE, 2015; SUZUKI, 2013). As CLDNS compõem a maior parte da arquitetura complexa das TJ e são geralmente consideradas como as principais proteínas responsáveis pela regulação da permeabilidade paracelular do epitélio (BISCHOFF *et al.*, 2014; LEE, 2015). Essencialmente, isso ocorre porque as CLDNS podem: 1) evitar a passagem de água e solutos através da “fenda” paracelular (função de vedação); 2) restringir e/ou facilitar a passagem de solutos selecionados (função seletiva) (KOLOSOV *et al.*, 2013; TAMURA e TSUKITA, 2014).

Estudos recentes utilizando camundongos *knockout* de *Cldns* mostraram que as claudinas desempenham um papel crítico na formação de barreiras e seletividade paracelular de vários tecidos. Os camundongos *knockout* para *Cldn-1* morrem dentro de 24 horas após

nascem devido a uma perda drástica de líquidos e eletrólitos através da barreira epidérmica comprometida (LEE, 2015; TAMURA *et al.*, 2011).

2.2.2.2 Zônulas ocludentes

As proteínas citoplasmáticas acessórias Zônulas Ocludentes (ZO), subdividem-se em ZO-1, ZO-2 e ZO-3, e conectam as proteínas transmembranas ao citoesqueleto de actina (BISCHOFF *et al.*, 2014; SUZUKI, 2013) (Figura 4). Esta interação das proteínas TJ com o citoesqueleto é necessária para a manutenção da integridade estrutural da função de barreira do epitélio intestinal (BISCHOFF *et al.*, 2014; SUZUKI, 2013; TURNER, 2009).

As proteínas ZO poderiam mediar a construção precoce das proteínas TJ em contato célula-célula (LEE, 2015). Estudos recentes têm demonstrado que as células deficientes em ZO-1 ainda são capazes de formar as estruturas das TJ e mostram permeabilidade intestinal normal; no entanto, há atraso na estruturação de outras proteínas das TJ, incluindo as ocludinas e claudinas, sugerindo que as proteínas ZO têm um papel importante na regulação da estruturação das demais proteínas das TJ (LEE, 2015; UMEDA *et al.*, 2004).

2.2.2.3 Moléculas de adesão juncional

As Moléculas de Adesão Juncional (do inglês *Junctional adhesion molecules*; JAMs) são moléculas proteicas que estão envolvidas na formação das TJ junto com as ocludinas e as claudinas. A família JAM pertence à superfamília das imunoglobulinas (Ig), caracterizada por dois domínios Ig extracelulares (GROSCWITZ e HOGAN, 2009). Os membros da JAM são expressos em vários tipos de células epiteliais, incluindo as células endoteliais e células do sistema imunológico, e exibem distintos padrões de expressão (GROSCWITZ e HOGAN, 2009; SUZUKI, 2013).

Nas células epiteliais intestinais, o JAM-A e o JAM-4 são expressas e estão envolvidas na regulação do TJ. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que a JAM-A participa da regulação e manutenção da barreira do TJ (LEE, 2015; LIU *et al.*, 2000). Estudos recentes mostraram que camundongos *knockout Jam-A* exibem maior permeabilidade ao dextrano e atividade de mieloperoxidase no cólon em comparação a camundongos selvagens. Além disso, a lesão crônica e inflamação induzidas pelo dextran são mais graves nos camundongos knockout para *Jam-A* do que para camundongos selvagens (LAUKOETTER *et al.*, 2007; LEE, 2015).

2.2.2.4 Outros componentes da barreira intestinal

Além das TJ há na barreira intestinal outros complexos proteicos como: as junções aderentes (JA) e os desmossomos, ambos compõem o restante dos componentes do complexo paracelular (Figura 4) (TURNER, 2009; ULLUWISHEWA *et al.*, 2011). As JA são compostas pelas caderinas (*E-caderinas*) que estão localizadas imediatamente abaixo das TJ (TURNER, 2009). A perda de junções aderentes resulta na ruptura da polarização epitelial, diferenciação e apoptose precoce das células epiteliais intestinais (SUMIGRAY e LECHLER, 2015; TURNER, 2009).

Os desmossomos formam estruturas que se conectam aos filamentos intermediários do citoesqueleto, proporcionando fortes ligações adesivas que mantêm a proximidade celular e são também locais de comunicações intercelulares (SUMIGRAY e LECHLER, 2015; ULLUWISHEWA *et al.*, 2011).

Conforme observa-se na tabela 1 as diferentes técnicas e seus respectivos materiais biológicos para avaliar a integridade da barreira epitélio intestinal são de difícil acesso, invasivos, e quando não são invasivos sua especificidade é baixa e suas limitações diversas. A escolha da técnica a ser utilizada para avaliação depende tanto do modelo experimental quanto da clareza e especificidade da técnica escolhida.

2.2.2.5 Componentes da barreira epitélio intestinais em *zebrafish*

Os tecidos epiteliais de uma maneira geral são variados e exibem aspectos fisiológicos complexos. Pode-se descrever um epitélio como sendo uma camada de células com função primariamente de transporte que são interconectadas e especializadas. Nos vertebrados, as conexões célula-célula ou complexo juncional de um epitélio é um arranjo tripartido de elementos que residem em uma posição justaluminal (KOLOSOV *et al.*, 2013; KWONG *et al.*, 2013). O componente apical do complexo juncional é a TJ cujas principais funções são (1) prevenir a passagem descontrolada de solutos e água através da fenda paracelular e (2) confinar as proteínas da membrana das células epiteliais (GÜNZEL e FROMM, 2012; KOLOSOV *et al.*, 2013; KWONG e PERRY, 2013).

Nos teleósteos, a TJ além de atuar como barreira seletivamente permeável também atua com o potencial de prevenir a passagem de solutos e água. O complexo TJ foi relatado pela primeira vez em um peixe teleósteo por Öberg (1967) e Farquhar e Palade (1963), esse último descreveu detalhes por imagens no epitélio branquial de peixes *Fundulus similis* (FARQUHAR e PALADE, 1963; KWONG e PERRY, 2013; OBERG, 1967).

Um grande avanço no entendimento da função da TJ foi a descoberta das proteínas CLDN (FURUSE *et al.*, 1998). Hoje, sabe-se que as CLDNs constituem a maior parte da arquitetura do complexo TJ, e são consideradas as principais proteínas responsáveis pela regulação das propriedades de permeabilidade paracelular de epitélios de vertebrados (GÜNZEL e FROMM, 2012). Essencialmente, isso ocorre porque as CLDNs podem ser funcionalmente divididas nas que: (a) melhoram as propriedades de barreira de TJ e (b) reforçam as propriedades de formação de poros da TJ (GÜNZEL e FROMM, 2012; KOLOSOV *et al.*, 2013).

Chin e colaboradores foram os primeiros autores a demonstrar *cldn* em peixes teleosteos. Eles utilizaram a *cldn-7* para marcar o intestino distal em embriões de *zebrafish*.

(CHIN *et al.*, 2000). Pouco depois, Kollmar e colaboradores relataram outras 14 cldns em *zebrafish* e discutiram sua importância na morfogênese dos vertebrados. Desde esses primeiros estudos aproximadamente 63 cldns foram descritas em 16 espécies diferentes de peixes teleósteos (KOLLMAR *et al.*, 2001).

2.3 EIXO ENTERO-HEPÁTICO

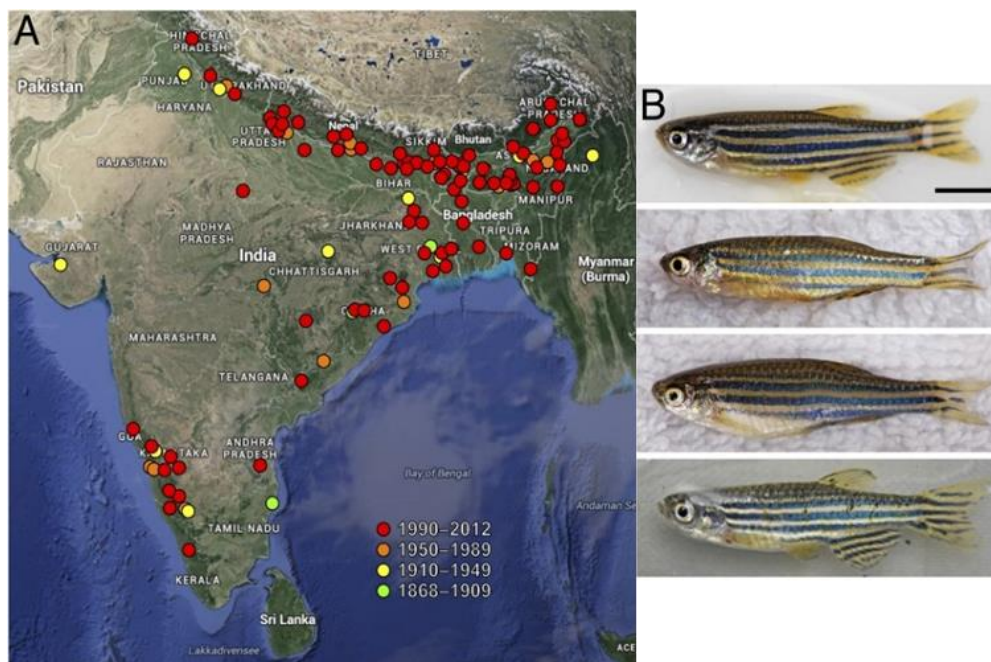
O fígado é o primeiro órgão exposto à exotoxinas derivadas do intestino, recebendo 70% do suprimento de sangue deste órgão através da circulação entero-hepática da comunicação via sistema porta (LAMBERTZ *et al.*, 2017). Por este motivo, o fígado é o órgão fundamental na defesa contra bactérias patogênicas oriundas do intestino, o que pode explicar estreita a relação entre influxo de endotoxinas e progressão de doenças hepáticas (MOUZAKI e ALLARD, 2012). Os ácidos biliares, produzidos no fígado, têm entre as suas funções a de inibir a proliferação bacteriana, modulando a expressão da célula hospedeira aos genes antimicrobianos. (SCHNABL e BRENNER, 2014). Segundo Mouzaki e Allard (2012), a microbiota patogênica é capaz de estimular a deposição lipídica no fígado, contribuindo para as doenças hepáticas como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e a esteatohepatite não alcoólica (EHNA) (MOUZAKI e ALLARD, 2012). Não está claro até que ponto as alterações no fígado contribuem para alterações na mucosa do epitélio intestinal (SCHNABL e BRENNER, 2014).

2.4 ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL

2.4.1 Considerações gerais

O *Danio rerio*, conhecido popularmente como paulistinha ou *zebrafish*, pertence à família *Cyprinidae* e é um peixe pequeno (3-4cm) da classe dos teleósteos de água-doce, originário da Índia (Figura 6) (PARICHY, 2015). Seu genoma já foi totalmente mapeado, apresentando uma homologia genética de 70% com os seres humanos (HOWE *et al.*, 2013) e tornou-se um modelo de experimentação para o estudo de mecanismos genéticos e biológicos para numerosas doenças humanas (BRIGGS, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2012). O *zebrafish* tem sido utilizado como modelo experimental para estudo no desenvolvimento de doenças. Sua elevada taxa de fecundidade e rápido desenvolvimento o tornam um modelo ideal para elucidar as bases moleculares de diversas doenças (CHEN e EKKER, 2004; MCGRATH e LI, 2008).

Figura 6 - *Zebrafish* e sua localização geográfica



(A) Locais onde o *zebrafish* tem sido encontrado na Índia. (B) Diferentes populações de *Zebrafish* do nordeste da Índia, os dois peixes superiores são machos, e os dois peixes inferiores são fêmeas. Fonte: Modificada de Parichy, 2015.

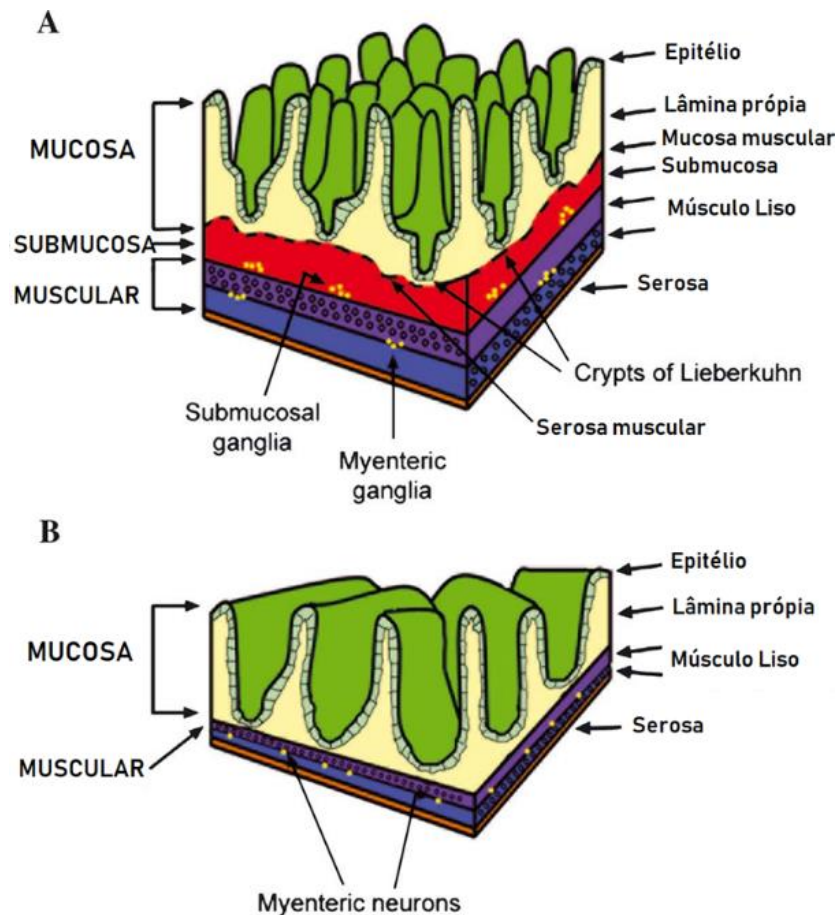
Os métodos laboratoriais para manejo, reprodução e manutenção do *zebrafish* já foram bem estabelecidos por Westerfield (WESTERFIELD, 2000). Em geral possui facilidade e baixo custo de manejo e manutenção, quando comparada com a exigida por animais experimentais como roedores, por exemplo. Além disso, o *zebrafish* é um modelo animal promissor por apresentar características moleculares, bioquímicas, celulares e fisiológicas muito semelhantes aos mamíferos (LIESCHKE e CURRIE, 2007). Outrossim, apresentam elevada taxa de fecundidade, transparência de embriões e larvas, rápido desenvolvimento, tornando-se ideal para investigação da organogênese e de aspectos do desenvolvimento embrionário. É, também, um bom modelo para o estudo do metabolismo.

Assim como outros integrantes da família *Cyprinidae*, o *zebrafish* não apresenta estômago, sendo que seu trato digestivo é composto por boca, faringe, esôfago, intestino e anus. O esôfago se diferencia em intestino, que consiste em um longo tubo no sentido caudal (WANG *et al.*, 2010).

O intestino preenche a cavidade abdominal e possui três divisões funcionais: anterior, média e posterior. Três segmentos intestinais são definidos com base na histologia, pela aparência das dobras epiteliais e pela distribuição dos tipos de células epiteliais diferenciadas; as três divisões funcionais são: anterior (bulbo intestinal), média e posterior (WANG *et al.*, 2010). A porção do bulbo intestinal é a principal região onde ocorre a digestão de proteínas e lipídios (WANG *et al.*, 2010). Consistente com o seu papel de absorção de nutrientes, as enzimas digestivas são fortemente expressas no segmento anterior e no epitélio (WALLACE *et al.*, 2005). A região terminal do intestino médio é composta por enterócitos especializados que parecem desempenhar um papel na imunidade da mucosa. Esta região do intestino médio pode ser análoga à região do íleo de mamíferos, onde antígeno apresentando células epiteliais (células M) e submucosa agregados linfoides conhecidos como Placas de Peyer (WALLACE *et al.*,

2005). A figura 7 apresenta esquematicamente a diferença entre o intestino do *zebrafish* adultos e do mamífero.

Figura 7 - Comparação da arquitetura intestinal de mamíferos e de teleósteos



Este esquema descreve as camadas intestinais no intestino dos mamíferos (A) e teleósteos (B). Os teleósteos não possuem uma mucosa muscular (linha preta entre a lâmina própria e a submucosa em (A)). Como resultado, apenas uma fina camada de tecido conjuntivo separa o epitélio na base das dobras da camada circular interna do músculo liso. O epitélio intestinal do teleósteo está disposto em dobras irregulares do que vilosidades, e não tem criptas de Lieberkuhn. Os corpos celulares neuronais mioentéricos individuais observados no peixe-zebra também são representados em (B). Fonte: Wallace, 2005.

A zona das vilosidades e das criptas intestinais é homóloga em estrutura e função a dos mamíferos. Análises histológicas mostram que o intestino do *zebrafish* adulto é disposto em camadas concêntricas semelhantes no intestino dos mamíferos (WALLACE *et al.*, 2005). O segmento intestinal posterior possui um maior número de colônias de bactérias do que o segmento anterior, como nos mamíferos (RAWLS *et al.*, 2004).

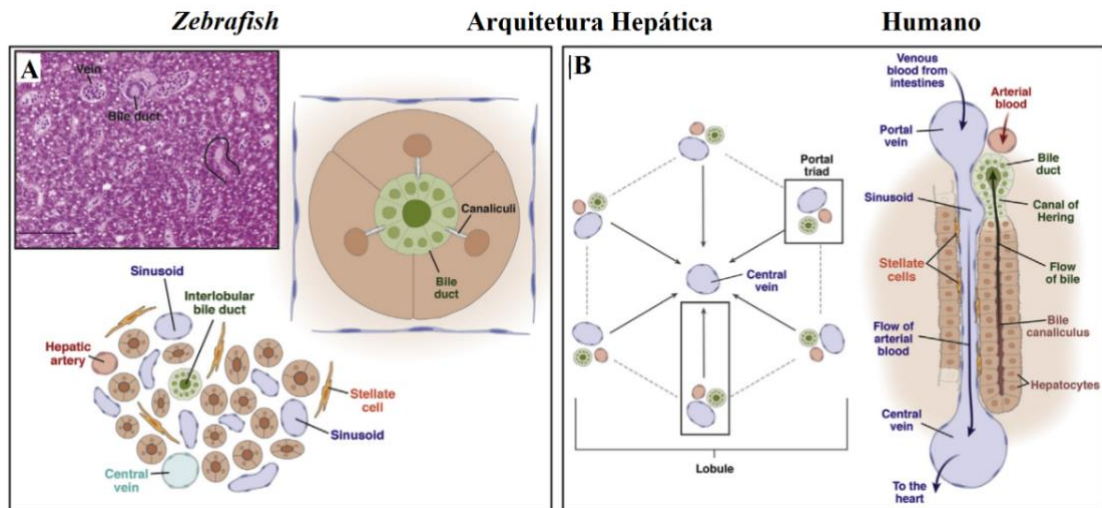
As células epiteliais do intestino são unidas de maneira apical através de um conjunto complexo de TJ; as JA e os desmossomos. Estes complexos restringem a passagem de componentes da membrana entre os domínios celulares apical e basolateral, e servem como uma barreira para o espaço paracelular através do qual o conteúdo luminal pode entrar no organismo. O estudo de Wallace e Packer (2003) demonstrou a presença de caderinas basolateral em células epiteliais de intestino após 34 horas pós-fertilização (hpf) em *zebrafish*. Esta distribuição é considerada evidência para a presença de junções aderentes. (WALLACE e PACK, 2003).

A organização do epitélio intestinal em amplas dobras irregulares em vez de vilosidades semelhantes a dedos, e a presença de células proliferativas na base dessas dobras, e não em criptas, são outras características distintas do intestino do *zebrafish*. Esta configuração do compartimento proliferativo do intestino de *zebrafish* se assemelha a organização de células do intestino embrionário dos mamíferos (KORINEK *et al.*, 1998). Em comparação a esses, o *zebrafish* tem uma anatomia e arquitetura celular hepática singular, apesar da alta conservação dos tipos celulares no fígado.

O fígado do *zebrafish* é responsável por funções metabólicas semelhantes às dos mamíferos, incluindo o processamento e armazenamento de nutrientes, síntese de enzimas e cofatores, excreção de metabólitos e de compostos xenobióticos. Ele é organizado em 3 lobos contíguos (2 laterais e 1 ventral) posicionados no eixo dorsoventral, levemente lateral ao intestino e a outros órgãos do sistema gastrointestinal (GOESSLING e SADLER, 2015). Os lobos não possuem o pedículo que os separa, como nos mamíferos (Figura 8). Diferentemente da presença de espaços porta presente na arquitetura hepática dos mamíferos, os hepatócitos estão arranjados como cordões que apresentam um padrão de organização mais ou menos cilíndrica, onde se concentram pequenos ductos biliares. Formam uma rede de canais onde a bile é coletada e transportada para vesícula biliar e intestinos através de ductos maiores do

sistema biliar extra-hepáticos. Este sistema de coleta e transporte e da bile se dá de maneira semelhante ao de mamíferos (GOESSLING e SADLER, 2015).

Figura 8 - Comparação da arquitetura hepática de *zebrafish* e de humanos



Anatomia celular e arquitetura do fígado em (A) *zebrafish* (A- dentro) corte histológico fígado de *zebrafish* adulto corado com H&E e (B) humanos. Fonte: Traduzido Goesslig e Sadler, 2015.

Os *zebrafish* e os mamíferos apresentam, no fígado, tipos celulares semelhantes, com exceção das células de Kupffer. As estruturas e as células hepáticas realizam funções homólogas as dos mamíferos incluindo: 1) secreção biliar, glicogênio e armazenamento de lipídios; 2) responsividade à insulina, xenobióticos e metabolismo de amônia; e 3) secreção de proteínas séricas tais como fatores de complemento e coagulação, transferrina e albumina (GOESSLING e SADLER, 2015).

É importante ressaltar que muitas das funções hepáticas estudadas nos *zebrafish* o foram, na sua grande maioria, em larvas com 5 dias pós fertilização (dpf). Recentemente foram descritas células estreladas hepáticas *zebrafish* como miofibroblastos que se tornam ativadas e secretam matriz extracelular na lesão hepática (GOESSLING e SADLER, 2015). Contudo, não há descrição de doença hepática crônica com fibrose progressiva em *zebrafish*. Também não há nenhum relato confiável de cirrose devido a qualquer fator etiológica.

2.4.2 *Zebrafish* como modelo de obesidade

O modelo experimental de *zebrafish* tornou-se uma ferramenta bastante utilizada para compreensão dos mecanismos metabólicos da obesidade, bem como de suas doenças associadas (FORN-CUNÍ *et al.*, 2015; SCHLEGEL, 2015; SCHLEGEL e GUT, 2015). Com exceção do estômago, o *zebrafish* possui os órgãos necessários para o controle metabólico, desde o controle do apetite, presente no hipotálamo, e os outros órgãos como, fígado, músculo e tecido adiposo (SETH *et al.*, 2013).

Atualmente, há na literatura estudos que demonstram diferentes modelos de obesidade em *zebrafish*. (MEGURO *et al.*, 2015; OKA *et al.*, 2010; TAINAKA *et al.*, 2011; ZANG *et al.*, 2014). Na Tabela 2 apresentamos alguns estudos que utilizam o *zebrafish* para estudo de Obesidade Induzida por Dieta (OID).

Tabela 2 - Estudos de obesidade em *zebrafish* desencadeado por dieta

<u>Autores</u>	<u>Tipo de dieta</u>	<u>Tipo de alimentação e tempo</u>	<u>N amostral</u>	<u>Tratamento</u>	<u>Avaliações realizadas</u>
<i>Oka et al. 2010</i>	Superalimentação	Artêmia fresca 8 semanas	109 Adultos	Restrição calórica por 2 semanas.	Peso e IMC, TG plasmáticos, OR (hepático), NR e Microarray (TA visceral)
<i>Tainaka et al. 2011</i>	Superalimentação	Artêmia fresca 4 semanas	180 Adultos	Utilização de Tomate Campari	Peso, TG plasmáticos, OR hepático. DNA Microarray e PCR real-time (<i>ppar-ab</i> e <i>ppargc1-like</i>)
<i>Hassamura et al. 2012</i>	Superalimentação	Artêmia fresca 6 semanas	ND	Extrato de chá verde (<i>Camellia sinensis</i>).	Acúmulo de gordura corporal, visceral e subcutânea. Expressão de genes do metabolismo lipídico na gordura visceral e hepáticos de catabolismo de lipídios.
<i>Zang et al. 2014</i>	Superalimentação	Ração seca e Artêmia fresca 6 semanas	450 Adultos	Efeito do citros <i>Yuzu</i> .	Peso, TG plasmático, volume TA visceral, OR hepático, PCR real-time
<i>Menguro et al. 2015</i>	Rica em Gordura	Ração 6 semanas	160 Adultos	Extrato de chá verde.	Peso, volume gordura corporal, atividade da 3-HAD e da CS.
<i>Forn-Cuní et al. 2015</i>	Superalimentação	Ração em pellet ou granulada e Artêmia fresca 8 meses	ND	Não realizou tratamento. Indução inflamação com LPS.	Peso, análise microarray, OR, PCR Real Time citocinas inflamatórias
<i>Devid, 2016</i>	Rica em colesterol	Ração em pellet 8 semanas	36 Adultos	Não realizou tratamento.	IMC, acúmulo de gordura subcutâneo e intra-abdominal. Comportamento.
<i>Montalbano et al.</i>	Superalimentação	Artêmia fresca	56 Adultos	Não realizou tratamento.	Peso e IMC, avaliação morfológica e morfométrica, tecido adiposo e

2016		6 semanas			adipócitos. qRT-PCR e imunohistoquímica (BDNF e TrkB).
Landgraf,2017	Rica em gordura	Artêmia fresca, Artêmia com gema em pó	30 Adultos	Não realizou tratamento.	Peso, IMC, percentual de gordura, glicose, TG e CHO plasmático, histologia (fígado e gordura). PCR real time (TA visceral e fígado), WB (fígado).
		8 semanas			
Mania et al. 2017	Superalimentação	Artêmia fresca	30 Adultos	Não realizou tratamento.	IMC, Expressão de leptina A e leptina B, Imunohistoquímica.
		5 semanas			

OR=*Oil Red*; NR=*Nile Red*; 3-HAD=atividade da enzima de oxidação de ácidos graxos; CS= citrato sintase. WB= western blot, TG=triglicerídeos; CHO= colesterol; ND= Não descrito. LPS = Lipopolissacarídeo.

3 JUSTIFICATIVA

A obesidade tornou-se um dos principais problemas de saúde no mundo. Estudos recentes têm demonstrado um importante papel da relação entre processos inflamatórios e alteração na permeabilidade intestinal no desenvolvimento da doença, onde o efeito inflamatório poderia estar associado a disfunção da barreira intestinal. Além disso, o papel de citocinas inflamatórias relacionados à obesidade está cada vez mais valorizado, porém ainda são necessárias pesquisas relacionadas aos mecanismos envolvidos.

A disfunção da barreira intestinal causada por reações inflamatórias traz um desequilíbrio para o hospedeiro. A obesidade induzida no *zebrafish* pode gerar danos sistêmicos e hepáticos acarretando alterações na barreira intestinal. Neste sentido, aprofundar o conhecimento das vias de ativação inflamatórias envolvidas na obesidade poderá contribuir para um melhor entendimento da doença e sua condução.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão gênica de citocinas inflamatórias intestinais, hepáticas e de constituintes da barreira do epitélio intestinal bem como a esteatose hepática em *zebrafish*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estabelecer modelo de obesidade com dieta hipercalórica em *zebrafish*;
2. Avaliar a presença de esteatose hepática;
3. Analisar o perfil bioquímico de triglicerídeos, colesterol total, colesterol-HDL e glicemia;
4. Avaliar a expressão gênica de componentes das *tight junction* da barreira intestinal;
5. Avaliar a expressão gênica de citocinas inflamatórias no tecido intestinal;
6. Avaliar a expressão gênica de citocinas inflamatórias no tecido hepático.

5 HIPÓTESE

1. A obesidade induzida pela dieta hipercalórica no *zebrafish* ativa a resposta inflamatória proporcionando um desequilíbrio entre as citocinas anti e pró-inflamatórias, e conseqüentemente diminui a expressão gênica de *tight junctions* da barreira intestinal.
2. Os animais obesos têm maior susceptibilidade de desenvolver esteatose hepática oriundo da alimentação e do aumento de citocinas pró-inflamatórias hepáticas e intestinais.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 LOCAL

Os procedimentos experimentais foram realizados no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no Laboratório de Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG), no Departamento de Patologia Experimental e na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP). Os animais foram alocados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do HCPA.

6.2 ANIMAIS E CÁLCULO AMOSTRAL

Foram utilizados peixes da espécie *Danio rerio*, *wild type*, adultos de ambos os sexos obtidos da loja de aquarismo *Flower Fish* (Porto Alegre, RS, Brasil). A manutenção do *zebrafish* exige cuidados básicos, a começar pelo período de quarentena no qual os peixes são submetidos na entrada do laboratório. Para isso, duas semanas antes do início dos experimentos os peixes foram aclimatados e observados. Nesse período ocorre maior mortalidade devido ao estresse do animal pelo transporte e novo ambiente, animais doentes podem ser detectados e retirados. Pode ocorrer uma mortalidade em torno de 20% dos animais recebidos.

Os peixes foram mantidos em aquários com a densidade 2 peixes/L, com ciclo de claro:escuro de 14h:10h, em temperatura entre $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Alimentados com artêmia (BioArtemia, RN, Brasil) em uma concentração equivalente de 10% do peso corporal e suplementado com 20 calorias de ração suplementar dividido em quatro vezes ao dia, exceto os finais de semana que foram alimentados duas vezes ao dia, respeitando a concentração

necessária diária. Os valores nutricionais da artêmia congelada e da ração estão descritas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Composição nutricional da artêmia congelada

	Matéria Seca (%)	Seco ao Ar (%)
Matéria Seca	100	9,96
Umidade		90,04
Matéria Orgânica	78,63	0
Proteína Bruta	60,44	0
Fibra Bruta	4,69	0
Extrato Etéreo	6,94	0
Cinzas	21,37	0
Extrato Não Nitrogenado	6,56	0
Energia Bruta (kcal/kg)	4920	0
Nutrientes digestíveis	82,45	0
totais		

* Análise Bromatológica realizada pelo Laboratório de Nutrição Animal (LNA) do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

Tabela 4 - Composição nutricional da ração complementar

Ingredientes	Quantidade (%)
Farinha de peixe	5
Farinha de soja	59,4

Milho	31,1
Óleo de soja	0,4
Fosfato de cálcio	2,6
Mix de minerais e vitaminas*	0,5
Sal	0,5
BHT** (antioxidante)	0,02
Cinzas	8,2
Extrato Etéreo	2,96
Proteína Bruta	32,3
Fibra Bruta	3,6
Energia Bruta (kcal/Kg)	4047,83

***Vit. A, 1,200,000IU; Vit. D3, 200,000UI; Vit. E, 12,000mg; Vit. K3, 2400mg; Vit. B1, 4800mg; Vit. B2, 4800mg; Vit. B6, 400mg; Vit. B12, 4800mg; ácido fólico, 1200mg; pantotenato de cálcio, 12,000mg; Vit.C, 48,000mg; biotina, 48mg; colina, 65,000mg; niacina, 24,000; Iron, 10,000mg; cobre, 6000mg; manganês, 4000mg; Zinco, 6000mg; iodo, 20mg; Cobalto, 2mg; Selênio, 20mg. ** butilhidroxitolueno.**

Diariamente foram verificados os parâmetros de qualidade da água dos aquários: pH, presença de nitratos e nitritos, amônia e temperatura. Os parâmetros foram mantidos de acordo com protocolos estabelecidos (WESTERFIELD, 2000).

O presente estudo foi dividido em duas etapas. O cálculo amostral para a primeira etapa do estudo foi baseado no estudo de Oka e colaboradores (OKA *et al.*, 2010), para isto foram utilizados n = 10 peixes/grupo. Na segunda etapa o cálculo do tamanho amostral foi baseado segundo estudos realizados anteriormente em nosso laboratório. O estudo de Schneider e colaboradores, utilizaram soro dos animais para realização das análises bioquímicas

(SCHNEIDER *et al.*, 2014), juntamente com o auxílio do programa de estatística Winpepi V11.43 a fim de obter um nível de significância de 5% e poder de 80%.

6.3 DIETA

A dieta utilizada neste estudo foi estabelecida pelo grupo de pesquisa. Após analisarmos as condições de produção de artêmia fresca e a possibilidade de avaliação do consumo e pesagem da mesma ficou estabelecido o uso da artêmia congelada.

Para realizar o experimento de obesidade precisamos estabelecer uma dieta controle de consumo dos animais, esta dieta foi padronizada e utilizada para os demais estudos. A dieta controle foi determinada a partir do peso dos animais (utilizando a média de peso dos animais de cada aquário), sendo utilizada uma quantidade de artêmia correspondente a 10% do peso corporal dos animais (Siccardi *et al.*, 2009; Watts *et al.*, 2012(GONZALES, 2012). Além disso, realizamos a avaliação bromatológica da artêmia utilizada (Tabela 3) a fim de sabermos a quantidade calórica que os animais estavam recebendo. Com o intuito de suprir as necessidades nutricionais dos animais adicionamos 20 calorias (cal) de uma ração preparada (Tabela 4).

Segundo o estudo de Oka e colaboradores (OKA *et al.*, 2010), foi relatado que a necessidade de energia (calorias) de um peixe seria de 30 cal. Contudo, ao realizarmos um experimento modelo (dados não mostrados) percebemos que se alimentamos os animais com 30 cal por animal os peixes acabam perdendo peso. Por este motivo decidimos utilizar as 20 cal da ração formulada.

A fim de fazer com que os animais mantivessem o recebimento de alimento de acordo com o peso por quarto semanas, após pesar os animais (conforme descrito posteriormente) a dieta de artêmia era ajustada conforme o novo peso dos peixes. Dessa forma mantínhamos o volume de dieta estabelecida durante todo o experimento. O volume de alimentação total foi

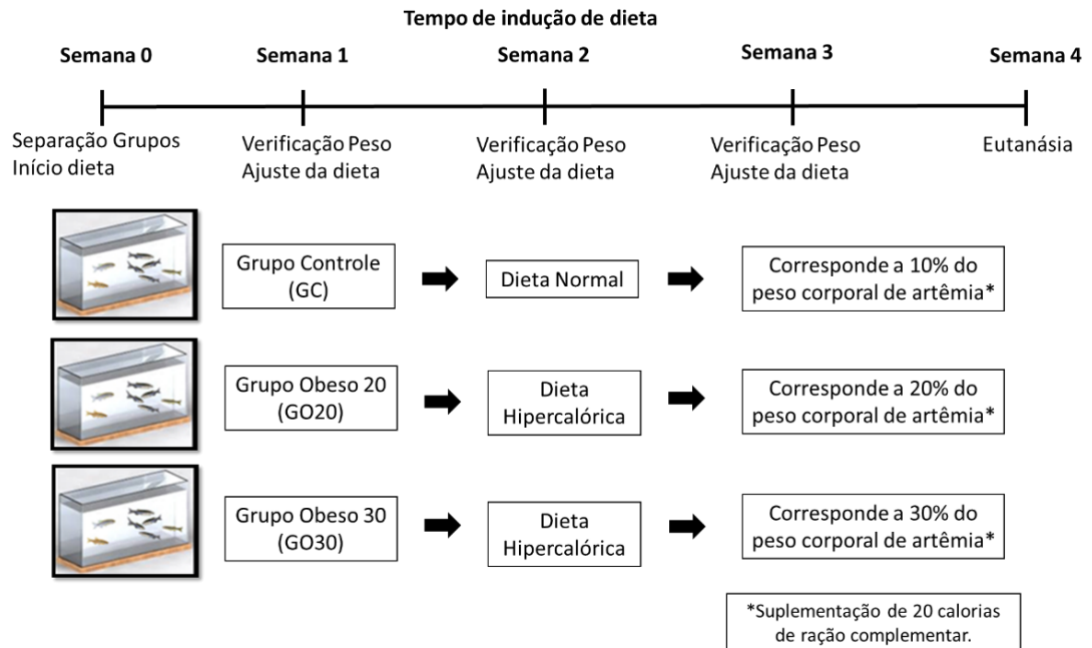
dividido em quatro vezes ao dia, exceto aos finais de semana, quando os animais foram alimentados duas vezes ao dia, respeitando as concentrações necessárias diárias.

6.4 ETAPA 1: ESTABELECIMENTO DO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDO POR DIETA HIPERCALÓRICA EM *ZEBRAFISH* ADULTOS

Para determinar o modelo de obesidade foram testadas duas concentrações de dieta com artêmia congelada. Os animais foram divididos em três grupos (n=10 peixes/grupo) e mantidos em dieta por quatro semanas (Figura 9):

- GC: Grupo Controle, recebeu concentração correspondente a 10% do seu peso corporal suplementado com 20 cal de ração.
- GO20: Grupo Obesidade, recebeu a concentração de artêmia correspondente a 20% do seu peso corporal, suplementado com 20 cal de ração.
- GO30: Grupo Obesidade, recebeu a concentração de artêmia correspondente a 30% do seu peso corporal, suplementado com 20 cal de ração.

Figura 9 - Desenho Experimental e linha do tempo da primeira etapa do estudo



Estabelecimento da obesidade, divisão dos peixes em três grupos (n=10/grupo), com concentrações distintas de dietas 10% (grupo controle), 20% (grupo obeso 20) 30% (grupo obeso 30). O estabelecimento da obesidade deu-se em 4 semanas.

Após as 4 semanas de experimento os animais foram anestesiados por imersão em triclaína (400 mg/L) e mortos por exsanguinação. O sangue foi obtido através da veia retro-orbital utilizando um micropipetador (VLIEGENTHART *et al.*, 2014).

6.4.1 Avaliação do peso e IMC

O peso dos animais foi avaliado semanalmente. Para isso foram anestesiados em triclaína (400 mg/L) e a aferição do peso foi realizada em uma balança analítica (BEL Engineering®, Milão, Itália). Para a obtenção do Índice de Massa Corporal (IMC) os animais também foram medidos, da cabeça até a cauda, utilizando um paquímetro.

6.4.2 Avaliação dos aspectos histológicos do fígado

O tecido hepático foi congelado à -20°C com *Tissue Tek® O.T.C Compound* (Sakura, Califórnia, USA), seccionado em criostato (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) na espessura de $3\ \mu\text{m}$ e montado em lâmina de microscopia.

Coloração com HE

As lâminas foram colocadas no corante Hematoxilina de Harris (LaborClin, Paraná, Brasil) por 5 minutos, depois lavadas em água corrente, diferenciadas em álcool-ácido por 1 minuto, lavadas novamente em água corrente e mergulhadas em carbonato de lítio 1%. Posteriormente as lâminas foram colocadas no corante eosina (Synth, São Paulo, Brasil) por 3 minutos e desidratadas em álcool absoluto (Dinâmica, São Paulo, Brasil) e colocadas em xilol (Dinâmica, São Paulo, Brasil) para a montagem com resina do tipo Entellan (Merck, Alemanha).

Coloração com *Oil Red O*

As lâminas contendo o tecido hepático com cortes criopresevados em *tissue tek* foram fixadas em formol 10% por 10 minutos, lavados 3 vezes com água (cuidadosamente) e adicionado propilenoglicol 100% (LabSynth, Diadema, SP) por 2 min. Em seguida lavados novamente 3 vezes com água e adicionado o corante *Oil red O* (5 mg/mL em propilenoglicol) durante 1h em temperatura ambiente. Transcorridas a 1h a lâmina foi lavada 2 vezes com água e acrescentado propilenoglicol 60% (v/v) por 2 minutos e lavada 3 vezes com água. Por último foi adicionado hematoxilina durante 2 a 3 minutos e lavados novamente em água corrente. Para a montagem da lâmina foi utilizado glicerina e uma lamínula. As microfotografias foram obtidas por microscópio ótico (Olympus, Japão) (n= 4 tecidos /grupo).

6.4.3 Quantificação dos lipídeos hepáticos por *Nile Red*

A técnica de *Nile Red* modificada de Gómez (GÓMEZ-LECHÓN *et al.*, 2007) foi utilizada para quantificar o acúmulo de lipídeos no tecido hepático. O tecido hepático foi homogeneizado com PBS (20 mg/mL; Laborclin, Brasil). Em uma placa de ELISA preta foi adicionado 50 µl do homogeneizado acrescido de 1µl da solução de *Nile Red* (1mg/ml em acetona) (Sigma-Aldrich, Alemanha) por 15 min a 37°C. Após incubação, a fluorescência do sobrenadante foi medida em leitora de placa de ELISA (SpectraMax M5 Molecular Devices, EUA) em excitação de 488nm e emissão de 550nm (n=4pool contendo 3 fígados /grupo).

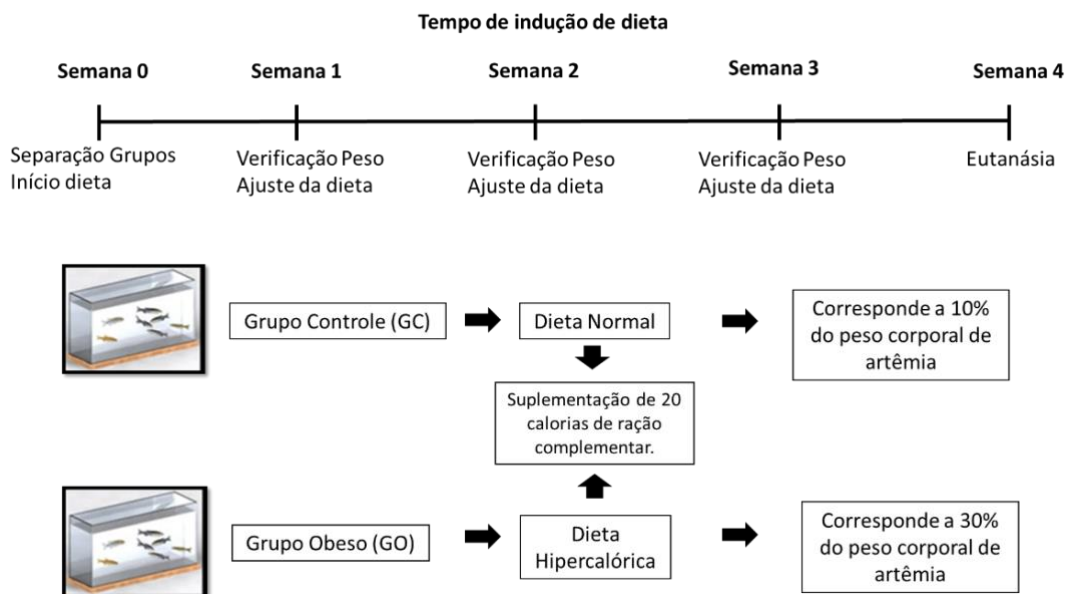
6.5 ETAPA 2: AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS PATOLÓGICOS ASSOCIADOS COM A OBESIDADE

Após estabelecida a concentração de artêmia necessária para o desenvolvimento do modelo e o estabelecimento da obesidade, foi realizada a segunda etapa do estudo, onde os animais foram divididos em dois grupos (n=30 animais/grupo, figura 10):

- GC = Grupo Controle, receberam a concentração de artêmia correspondente a 10% do peso corporal suplementado com 20 cal;
- GO = Grupo Obesidade, recebeu a concentração de artêmia correspondente a 30% do seu peso corporal suplementado com 20 cal.

A quantidade de artêmia era ajustada semanalmente de acordo com o peso dos animais segundo protocolo estabelecido na Etapa 1.

Figura 10 - Desenho experimental e linha do tempo da segunda etapa do estudo



Linha do tempo da etapa 2 do experimento. Os animais foram divididos em dois grupos o grupo controle (GC), que recebeu artêmia o correspondente a 10% do peso corporal e o grupo obeso (GO), que recebeu artêmia o correspondente a 30% do peso corporal. Ambos os grupos receberam suplementação de 20 cal de ração. Semanalmente foi realizada a aferição do peso dos animais e o ajuste do volume de dieta. O experimento teve duração de quatro semanas.

6.5.1 Avaliação do perfil bioquímico no soro

Para as análises bioquímicas os animais foram mantidos em jejum por 8h. O sangue dos animais foi coletado da veia retro orbital e o soro obtido através da centrifugação por 10 minutos a 2400 rpm ($n= 6/$ grupo/ teste) foi armazenado a temperatura de -20°C para as análises bioquímicas.

Para as análises séricas foram utilizados kits comerciais da Labtest® (Minas Gerais, Brasil), colesterol-HDL, colesterol total e triglicerídeos, segundo as instruções do fabricante modificado por Pedroso (Pedroso et al., 2012).

Para calcular as concentrações de colesterol-HDL das amostras, primeiramente diminuiu-se a absorbância encontrada no branco, de todas as amostras e do padrão, para que se desconsidere a contribuição da cor do próprio reagente na hora de quantificar a cor da reação.

Em seguida, dividiu-se a absorvância de cada uma das amostras pela absorvância do padrão e multiplicou-se por 40.

Fórmula para calcular o valor de colesterol- HDL:

$$\text{Colesterol HDL (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância do Teste}}{\text{Absorvância do Padrão}} \times 40$$

As absorvâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro (SpectraMax M5 Molecular Devices, EUA) a 500 nm e 505 nm, para análise de colesterol total e de triglicerídeos respectivamente.

Para calcular as concentrações de colesterol total e triglicerídeos das amostras, primeiramente diminuiu-se a absorvância encontrada no branco de todas as amostras e do padrão, a fim de desconsiderar a contribuição da cor do próprio reagente na hora de quantificar a cor da reação. Em seguida, dividiu-se a absorvância de cada uma das amostras pela absorvância do padrão e multiplicou-se por 200.

Fórmula para calcular o valor de colesterol total e de triglicerídeos.

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância do Teste}}{\text{Absorvância do Padrão}} \times 200 \qquad \text{Triglicérides (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância do Teste}}{\text{Absorvância do Padrão}} \times 200$$

6.5.2 Avaliação glicemia

A glicemia foi avaliada a partir do sangue da veia retro orbital (VLIEGENTHART *et al.*, 2014), com tiras reativas e um medidor de glicose *Freestyle Optium* (Abbot, Chicago, EUA). Para análises de glicemia os animais foram mantidos em jejum por 8h (n=10/grupo).

6.5.3 Quantificação de lipídeos por *Oil red O*

A análise quantitativa da esteatose hepática dos animais foi realizada utilizando a coloração de *Oil Red O* (conforme descrito anteriormente), para avaliar a quantidade de depósito de lipídeos foi utilizado o software *ImageJ* 1.46b (NIH Image, Rockville, MD, USA). Para verificar a quantidade de gotículas de lipídeos do tecido hepático, foram obtidas imagens por microscópio óptico de 5 áreas aleatórias de cada lâmina (n=4/grupo). O processamento de cada imagem foi realizado através da marcação das gotículas de lipídios através da ferramenta automatizada *Threshold*, a fim de estimar a área ocupada pela esteatose.

6.5.4 Expressão gênica de citocinas inflamatórias e de constituintes das *tight junctions*

Após 4 semanas os animais foram eutanasiados como descrito anteriormente. Ambos os tecidos, fígado e intestino, foram coletados em *RNAlater* (Invitrogen, EUA) e armazenados à temperatura de -80°C. O RNA total dos mesmos foi extraído utilizando *RNeasy mini kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), segundo as instruções do fabricante. Duas microgramas (2µg) de RNA foram convertidos a cDNA com o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosytem, Califórnia, EUA), n=10 pools /grupo/ tecido.

Para as avaliações da expressão de genes que compõem as *tight junctions* da barreira do epitélio intestinal como *cldn-c*, *f11r*, *cldn-15a*, *cldn-15b* e, também, a expressão gênica das citocinas inflamatórias intestinais e hepáticas *il-1 β*, *tnf-α* e *il-10*, foi realizado RT-qPCR utilizando sondas *taqman* (Invitrogen, Califórnia, EUA, Tabela 5). Como normalizador foi utilizada a sonda *efα-1* (*elongation factor 1 alpha*, Tabela 5). Os valores foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta ct}$.

Tabela 5 - Sondas Taqman utilizadas para as análises de citocinas inflamatórias hepáticas e intestinas e da barreira intestinal

Gene	Sondas
<i>il-1β</i>	Dr03114368_m1
<i>tnf-α</i>	Dr03126850_m1
<i>il-10</i>	Dr03103209_m1
<i>f11r</i>	Dr03118078_m1
<i>cldn-c</i>	Dr03138426_s1
<i>cldn-15a</i>	Dr03145240_m1
<i>cldn-15b</i>	Dr03072501_m1
<i>efa-1</i>	Dr03432748_m1

6.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Para realizar a análise estatística foram utilizados na primeira etapa:

- *ANOVA two-way* com *post-hoc Bonferroni*, para avaliação da diferença entre o peso e o IMC dos três diferentes grupos.
- *Kruskal-Wallis*, para avaliar a Glicemia e a quantificação de lipídios (*Nile Red*).

Na segunda etapa do estudo foram utilizados os seguintes testes:

- *ANOVA one-away* com *post hoc Tukey*, para avaliar a variação do peso ao longo do tempo.
- *Teste U de Mann-Whitney*, para as avaliações bioquímicas e para análises de expressões gênicas.

Os resultados foram considerados significativos quando o valor de $p \leq 0,05$. Para realizações dos testes estatísticos foram utilizados o pacote estatístico do SPSS v.18 e o programa *GaphPhad Prism v.7.0*.

6.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi desenvolvido segundo a Lei N° 11.794, de 8 de outubro de 2008, que estabelece normas para a criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica e seguindo os regulamentos da utilização humanitária dos animais das resoluções normativas n°12 (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos - DBCA) e n°13 (Diretrizes da Prática de Eutanásia) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Além disso, os procedimentos de experimentação são amparados na oitava edição do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animal* de 2011, provenientes do *National Research Council of the National Academies*.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê em Ética e Pesquisa e pelo Comitê de Ética para uso de Animais para pesquisa do HCPA, sob o número de registro 15.0065 (ANEXO C).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESO. **ABESO** - Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. 2016.

AGUILAR-VALLES, A. *et al.* Obesity, adipokines and neuroinflammation. **Neuropharmacol** v. 96, part A, p. 124-134, Spt 2015.

AL-SADI, R. M.; MA, T. Y. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. **J Immunol**, v. 178, n. 7, p. 4641-9, Apr 2007.

ANEZAKI, Y. *et al.* Sex difference in the liver of hepatocyte-specific Pten-deficient mice: a model of nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatol Res**, v. 39, n. 6, p. 609-18, Jun 2009.

BALDA, M. S.; MATTER, K. Tight junctions as regulators of tissue remodelling. **Curr Opin Cell Biol**, v. 42, p. 94-101, Oct 2016.

BEST, J. D.; ALDERTON, W. K. Zebrafish: An in vivo model for the study of neurological diseases. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 4, n. 3, p. 567-76, Jun 2008.

BISCHOFF, S. C. *et al.* Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. **BMC Gastroenterol**, v. 14, p. 189, Nov 2014. ISSN 1471-230X.

BLOCH KV, K. C. *et al.* ERICA: prevalências de hipertensão arterial e obesidade em adolescentes brasileiros. **Rev Saude Publ**, v. 50, n. 9s, p. 1s-13s, 2016.

BLÜHER, M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 27, n. 2, p. 163-77, Apr 2013.

BRASIL, P. Obesidade cresce 60% em dez anos no Brasil. **Gov do Brasil**. 2017-04-17T13:29:12-02:00 2017. .

BRIGGS, J. P. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, n. 1, p. R3-9, Jan 2002.

CAMPBELL, P. T. Obesity: a certain and avoidable cause of cancer. **Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 727-8, Aug 2014.

CANI, P. D. *et al.* Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1470-81, Jun 2008.

CARDIOLOGIA, S. B. D. [Guidelines for cardiac rehabilitation]. **Arq Bras Cardiol**, v. 84, n. 5, p. 431-40, May 2005.

CHEN, E.; EKKER, S. C. Zebrafish as a genomics research model. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 5, n. 5, p. 409-13, Oct 2004.

CHIN, A. J.; TSANG, M.; WEINBERG, E. S. Heart and gut chiralities are controlled independently from initial heart position in the developing zebrafish. **Dev Biol**, v. 227, n. 2, p. 403-21, Nov 2000.

CHOQUET, H.; MEYRE, D. Genetics of Obesity: What have we Learned? **Curr Genomics**, v. 12, n. 3, p. 169-79, May 2011.

CHU, C. Y. *et al.* Overexpression of Akt1 enhances adipogenesis and leads to lipoma formation in zebrafish. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36474, 2012. I

CRESCI, G. A.; BAWDEN, E. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. **Nutr Clin Pract**, v. 30, n. 6, p. 734-46, Dec 2015.

FARQUHAR, M. G.; PALADE, G. E. Junctional complexes in various epithelia. **J Cell Biol**, v. 17, p. 375-412, May 1963.

FIERABRACCI, P.; TAMBERI, A.; SANTINI, F. Obesity-Related Comorbidities. In: LUCCHESI, M. e SCOPINARO, N. (Ed.). Minimally Invasive Bariatric and Metabolic Surgery: Principles and Technical Aspects. **Sprin Internat Pub**, p.25-34, 2015.

FONTAINE, K. R. A. BAROSFKY, I. Obesity and health-related quality of life. **Obe Rev** v. 2, n. 3, p. 173-182, Dec 2001.

FORN-CUNÍ, G. *et al.* Liver immune responses to inflammatory stimuli in a diet-induced obesity model of zebrafish. **J Endocrinol**, v. 224, n. 2, p. 159-70, Feb 2015.

FURUSE, M. *et al.* Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. **J Cell Biol**, v. 141, n. 7, p. 1539-50, Jun 1998.

GOESSLING, W.; SADLER, K. C. Zebrafish: an important tool for liver disease research. **Gastroenterology**, v. 149, n. 6, p. 1361-77, Nov 2015.

GÓMEZ-LECHÓN, M. J. *et al.* A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. **Chem Biol Interact**, v. 165, n. 2, p. 106-16, Jan 2007.

GONZALES, J. M. Preliminary Evaluation on the Effects of Feeds on the Growth and Early Reproductive Performance of Zebrafish (*Danio rerio*). In: (Ed.). **J Am Assoc Lab Anim Sci**, v.51, p.412-7, 2012.

GROSCWITZ, K. R.; HOGAN, S. P. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 124, n. 1, p. 3-20; quiz 21-2, Jul 2009.

GÜNZEL, D.; FROMM, M. Claudins and Other Tight Junction Proteins. **Compreh Physiol** v. 2, n.3 July 2012.

HASLAM, D. W.; JAMES, W. P. Obesity. **Lancet**, v. 366, n. 9492, p. 1197-209, Oct 2005.

HASUMURA, T. *et al.* Green tea extract suppresses adiposity and affects the expression of lipid metabolism genes in diet-induced obese zebrafish. **Nutr Metab** (Lond), v. 9, n. 1, p. 73, 2012.

HENAO-MEJIA, J. *et al.* Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 179-85, Feb 2012.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-7, Dec 2006.

HOWE, K. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, Apr 2013.

JAHANGIR, E.; DE SCHUTTER, A.; LAVIE, C. J. The relationship between obesity and coronary artery disease. **Transl Res**, v. 164, n. 4, p. 336-44, Oct 2014.

JEBB, S. A.; RENNIE, K. L.; COLE, T. J. Prevalence of overweight and obesity among young people in Great Britain. **Public Health Nutr**, v. 7, n. 3, p. 461-5, May 2004.

JOHNSON, A. M. *et al.* High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0122195, 2015.

JONES, K. S. *et al.* A high throughput live transparent animal bioassay to identify non-toxic small molecules or genes that regulate vertebrate fat metabolism for obesity drug development. **Nutr Metab** (Lond), v. 5, p. 23, Aug 2008.

KOLLMAR, R. *et al.* Expression and phylogeny of claudins in vertebrate primordia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 18, p. 10196-201, Aug 2001.

KOLOSOV, D. *et al.* Claudins in teleost fishes. **Tis Bar**, v. 1, n. 3, p. e25391, Jul 2013.

KOLOTKIN, R. L. *et al.* Development of a brief measure to assess quality of life in obesity. **Obes Res**, v. 9, n. 2, p. 102-11, Feb 2001.

KWONG, R. W.; KUMAI, Y.; PERRY, S. F. Evidence for a role of tight junctions in regulating sodium permeability in zebrafish (*Danio rerio*) acclimated to ion-poor water. **J Comp Physiol B**, v. 183, n. 2, p. 203-13, Feb 2013.

KWONG, R. W.; PERRY, S. F. The tight junction protein claudin-b regulates epithelial permeability and sodium handling in larval zebrafish, *Danio rerio*. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 304, n. 7, p. R504-13, Apr 2013.

LAMBERTZ, J. *et al.* Fructose: A Dietary Sugar in Crosstalk with Microbiota Contributing to the Development and Progression of Non-Alcoholic Liver Disease. **Front Immunol**, v. 8, p. 1159, 2017.

LAUKOETTER, M. G. *et al.* JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. **J Exp Med**, v. 204, n. 13, p. 3067-76, Dec 2007.

LEE, S. H. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. **Intest Res**, v. 13, n. 1, p. 11-8, Jan 2015.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 5, p. 353-67, May 2007.

LIU, Y. *et al.* Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. **J Cell Sci**, v. 113 (Pt 13), p. 2363-74, Jul 2000.

MANIA, M. *et al.* Expression and distribution of leptin and its receptors in the digestive tract of DIO (diet-induced obese) zebrafish. **Ann Anat**, v. 212, p. 37-47, Jul 2017.

MANRESA, M. C.; TAYLOR, C. T. Hypoxia Inducible Factor (HIF) Hydroxylases as Regulators of Intestinal Epithelial Barrier Function. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, v. 3, n. 3, p. 303-315, May 2017.

MATARESE, G. *et al.* Obesity and Inflammation. In book: **Compend of Inflamm Dis** p. 1017-1029, 2016.

MAYNARD, C. L. *et al.* Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 231-41, Sep 2012.

MCGRATH, P.; LI, C. Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **Drug Discov Today**, v. 13, n. 9-10, p. 394-401, May 2008.

MEGURO, S.; HASUMURA, T.; HASE, T. Body fat accumulation in zebrafish is induced by a diet rich in fat and reduced by supplementation with green tea extract. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120142, 2015.

SILVEIRA, T. R. D.; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**,.

MONTALBANO, G. *et al.* Morphological differences in adipose tissue and changes in BDNF/Trkb expression in brain and gut of a diet induced obese zebrafish model. **Ann Anat**, v. 204, p. 36-44, Mar 2016.

MOUZAKI, M.; ALLARD, J. P. The role of nutrients in the development, progression, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. **J Clin Gastroenterol**, v. 46, n. 6, p. 457-67, Jul 2012.

MÜLLER, S. *et al.* Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors. **Diabetologia**, v. 45, n. 6, p. 805-12, Jun 2002.

NEGRIN, K. A. *et al.* IL-1 signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107265, 2014.

OBERG, K. E. The reversibility of the respiratory inhibition in gills and the ultrastructural changes in chloride cells from the rotenone-poisoned marine teleost, *Gadus callarias* L. **Exp Cell Res**, v. 45, n. 3, p. 590-602, Mar 1967.

ODENWALD, M. A.; TURNER, J. R. Intestinal permeability defects: is it time to treat? **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 11, n. 9, p. 1075-83, Sep 2013.

OKA, T. *et al.* Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. **BMC Physiol**, v. 10, p. 21, 2010.

PARICHY, D. M. Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. **Elife**, v. 4, Mar 2015.

PEDROSO, G. L. *et al.* Blood collection for biochemical analysis in adult zebrafish. **J Vis Exp**, n. 63, p. e3865, 2012.

PENDYALA, S. *et al.* Diet-induced weight loss reduces colorectal inflammation: implications for colorectal carcinogenesis. **Am J Clin Nutr**, v. 93, n. 2, p. 234-42, Feb 2011.

RAWLS, J. F.; SAMUEL, B. S.; GORDON, J. I. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 13, p. 4596-601, Mar 2004.

REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595-607, Banting lecture Dec 1988.

REUSER, M.; BONNEUX, L. G.; WILLEKENS, F. J. Smoking kills, obesity disables: a multistate approach of the US Health and Retirement Survey. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, n. 4, p. 783-9, Apr 2009.

ROCHA, V. Z.; FOLCO, E. J. Inflammatory concepts of obesity. **Int J Inflam**, v. 2011, p. 529061, 2011.

ROCHA, V. Z.; LIBBY, P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. **Nat Rev Cardiol**, v. 6, n. 6, p. 399-409, Jun 2009.

SCHLEGEL, A. Studying lipoprotein trafficking in zebrafish, the case of chylomicron retention disease. **J Mol Med**, v. 93, n. 2, p. 115-8, Feb 2015.

SCHLEGEL, A.; GUT, P. Metabolic insights from zebrafish genetics, physiology, and chemical biology. **Cell Mol Life Sci**, v. 72, n. 12, p. 2249-60, Jun 2015.

SCHNABL, B.; BRENNER, D. A. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1513-24, May 2014.

SCHNEIDER, A. C. *et al.* Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on hepatic and serum lipid profiles in zebrafish exposed to ethanol. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 371-8, Aug 2014.

SETH, A.; STEMPLE, D. L.; BARROSO, I. The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. **Dis Model Mech**, v. 6, n. 5, p. 1080-8, Sep 2013.

SHI, H. *et al.* TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116, n. 11, p. 3015-25, Nov 2006.

SICCARDI, A. J. *et al.* Growth and Survival of Zebrafish (*Danio rerio*) Fed Different Commercial and Laboratory Diets. In: (Ed.). **Zebrafish**, v.6, 2009. p.275-80.

SILVEIRA, T. R. D.; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4-5, Jun 2012.

SPRANGER, J. *et al.* Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. **Diabetes**, v. 52, n. 3, p. 812-7, Mar 2003.

STEWART, S. T.; CUTLER, D. M.; ROSEN, A. B. Forecasting the effects of obesity and smoking on U.S. life expectancy. **N Engl J Med**, v. 361, n. 23, p. 2252-60, Dec 2009.

SUMIGRAY, K. D.; LECHLER, T. Cell adhesion in epidermal development and barrier formation. **Curr Top Dev Biol**, v. 112, p. 383-414, 2015.

SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 4, p. 631-59, Feb 2013.

SYMONDS, M. E. *et al.* Nutritional programming of the metabolic syndrome. **Nat Rev Endocrinol**, v. 5, n. 11, p. 604-10, Nov 2009.

TAINAKA, T. *et al.* Transcriptome analysis of anti-fatty liver action by Campari tomato using a zebrafish diet-induced obesity model. **Nutr Metab (Lond)**, v. 8, p. 88, 2011.

TAMURA, A. *et al.* Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. **Gastroenterology**, v. 140, n. 3, p. 913-23, Mar 2011.

TAMURA, A.; TSUKITA, S. Paracellular barrier and channel functions of TJ claudins in organizing biological systems: advances in the field of barrierology revealed in knockout mice. **Semin Cell Dev Biol**, v. 36, p. 177-85, Dec 2014.

TEIXEIRA, T. F. *et al.* Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. **Nutr Res**, v. 32, n. 9, p. 637-47, Sep 2012.

TEIXEIRA, T. F. *et al.* Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. **Clin Nutr**, v. 31, n. 5, p. 735-40, Oct 2012.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **Br J Nutr**, v. 92, n. 3, p. 347-55, Sep 2004.

TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 11, p. 799-809, Nov 2009.

ULLUWISHEWA, D. *et al.* Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. **J Nutr**, v. 141, n. 5, p. 769-76, May 2011.

UMEDA, K. *et al.* Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. **J Biol Chem**, v. 279, n. 43, p. 44785-94, Oct 2004.

VAJRO, P.; PAOLELLA, G.; FASANO, A. Microbiota and gut-liver axis: their influences on obesity and obesity-related liver disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 56, n. 5, p. 461-8, May 2013. ISSN 1536-4801.

VAN DER HEIJDEN, R. A. *et al.* High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. **Aging** (Albany NY), v. 7, n. 4, p. 256-68, Apr 2015.

VLIEGENTHART, A. D. *et al.* Retro-orbital blood acquisition facilitates circulating microRNA measurement in zebrafish with paracetamol hepatotoxicity. **Zebrafish**, v. 11, n. 3, p. 219-26, Jun 2014.

WALLACE, K. N. *et al.* Intestinal growth and differentiation in zebrafish. **Mech Dev**, v. 122, n. 2, p. 157-73, Feb 2005.

WALLACE, K. N.; PACK, M. Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish. **Dev Biol**, v. 255, n. 1, p. 12-29, Mar 2003.

WANG, Z. *et al.* Morphological and molecular evidence for functional organization along the rostrocaudal axis of the adult zebrafish intestine. **BMC Genomics**, v. 11, p. 392, Jun 2010.

WATTS, S. A.; POWELL, M.; D'ABRAMO, L. R. Fundamental Approaches to the Study of Zebrafish Nutrition. **ILAR J**, v. 53, n. 2, p. 144-60, 2012.

WESTERFIELD, M. The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*). 2000.

WHO | Obesity. **WHO**, 2014-09-05 10:57:31 2014.

WHO | Obesity and overweight. **WHO**, 2016-06-27 10:51:11 2016.

WINER, D. A. *et al.* The Intestinal Immune System in Obesity and Insulin Resistance. **Cell Metab**, v. 23, n. 3, p. 413-26, Mar 2016.

ZANG, L. *et al.* Effects of Yuzu (*Citrus junos* Siebold ex Tanaka) peel on the diet-induced obesity in a zebrafish model. **J Funct Foods**, v. 10, p. 499-510, 2014/09/01/ 2014.

**7 ARTIGO 1: ZEBRAFISH OBESITY MODEL INDUCED BY HYPERCALORIC
DIET FOR FOUR WEEKS.**

Zebrafish obesity model induced by hypercaloric diet for four weeks.

Ayres, R^{1,2}; Uribe-Cruz^{2,3}, C; Reverbel da Silveira, T^{1,2}; Matte, U¹.

1. Graduate Program of Child and Adolescent Health of UFRGS.
2. Experimental Hepatology and Gastroenterology Laboratory of the Clinical Hospital of Porto Alegre.
3. Gastroenterology Graduate Program of UFRGS.

Institutional address: Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350. Centro de Pesquisa Experimental. Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia, sala 12214, 2º andar. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Brazil.

Abstract

Obesity is a major public health problem. Zebrafish has been used in scientific research as a vertebrate model for understanding the metabolic causes of obesity and its associated diseases. The aim of this study was to present a model of obesity induced by a hypercaloric diet in zebrafish using a diet of frozen artemia for 4 weeks. Thirty wild type fish were divided into three groups: CG, OF20 and OF30. The standard diet volume for the CG group was calculated as the equivalent of 10% of total fish weight; the OF20 and OF30 groups received a diet of 20% and 30% of the total fish weight, respectively. At the end of the four weeks the effects of the hypercaloric diet the OF30 group were: weight gain of 1.2-fold and BMI of 1.3-fold compared with the CG group. An increased presence of hepatic steatosis was also observed in the CG group. Thus we concluded that the OF30 group is an adequate model for inducing obesity with a hypercaloric diet.

Keywords: *Obesity, hypercaloric diet, zebrafish, model of obesity.*

Introduction

Obesity can be defined as a chronic, complex and multifactorial disease characterized by the excessive accumulation of adipose tissue in the body. Obesity is usually associated with an abuse of caloric intake and sedentary lifestyle, as well as with genetic susceptibility (BLÜHER, 2013; CHOQUET e MEYRE, 2011; KOLOTKIN *et al.*, 2001; STEWART *et al.*, 2009) that leads to a loss in the quality of life (FIERABRACCI *et al.*, 2015; FONTAINE, 2001;

STEWART *et al.*, 2009). There are several comorbidities associated with obesity, including dyslipidemia (CARDIOLOGIA, 2005; JAHANGIR *et al.*, 2014), high blood pressure, insulin resistance (BLÜHER, 2013; CARDIOLOGIA, 2005) and central fat deposit inflammation (JAHANGIR *et al.*, 2014; REAVEN, 1988).

Obesity is currently a major public health problem that constitutes a worldwide epidemic responsible for increased morbidity and mortality (WHO | Obesity and overweight, 2016; FONTAINE, 2001). According to data from the World Health Organization (WHO), the prevalence of obesity worldwide has more than doubled between 1980 and 2014 (WHO | Obesity and overweight, 2016).

In recent years, zebrafish has been widely used in scientific research as a vertebrate model due to ease of maintenance and handling, rapid life cycle and 70% immunological, physiological and molecular homology to mammals, including humans (MCGRATH e LI, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2012). The liver of the zebrafish resembles that of mammals from a pathophysiological perspective (BEST e ALDERTON, 2008; LIESCHKE e CURRIE, 2007; SETH *et al.*, 2013). Zebrafish has been used for implementing animal models of obesity (MEGURO *et al.*, 2015; OKA *et al.*, 2010; TAINAKA *et al.*, 2011; ZANG *et al.*, 2014), but all of these models have a low level of reproducibility due to the way the diets are presented.

Understanding the physiopathological mechanism of obesity using a lower cost and easy maintenance experimental model can amplify the knowledge in this area. And establishing a reproducible model of obesity induced by a hypercaloric diet (HCD) in zebrafish is of interest for studies investigating the pathophysiological mechanisms involved in obesity and a treatment for the obese population.

Results

After 4 weeks of diet administration, the OF30 group had a 1.2-fold increase in weight when compared to the CG group, whereas the CG group had a 1.3-fold increase in BMI ($p \leq 0.05$) (Fig. 1A and 1B). The weight differences in the animals can be observed by the second week of the diet (data not shown). The animals of the OF30 group also showed an increase in abdominal volume (Fig. 1C).

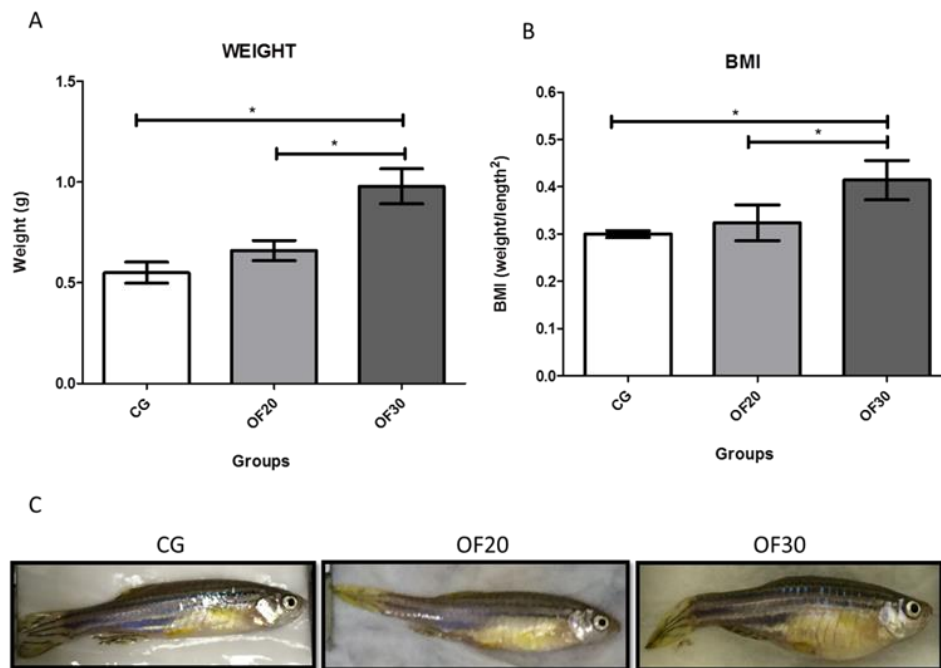


Figure 1. Body evaluation after four weeks of hypercaloric diet. (A) Mean animal weight. The animals of the OF30 group showed an increase in weight when compared to the OF20 and CG groups. (B) Mean BMI. Animals of the OF30 group showed an increase in BMI when compared to the OF20 and CG groups. Two-way ANOVA with a post hoc Bonferroni test, * $p \leq 0.05$; $n = 10$ / group. (C) Images showing the differences in abdominal volumes for the different groups.

Upon histological evaluation of the hepatic tissue, hepatocyte nucleus decentralization and presence of microvesicles were observed in the OF30 group (Fig. 2A top line). The Oil Red O staining demonstrated that the more food the fish received, the greater was the accumulation of lipid in liver tissue (Fig.2A bottom line).

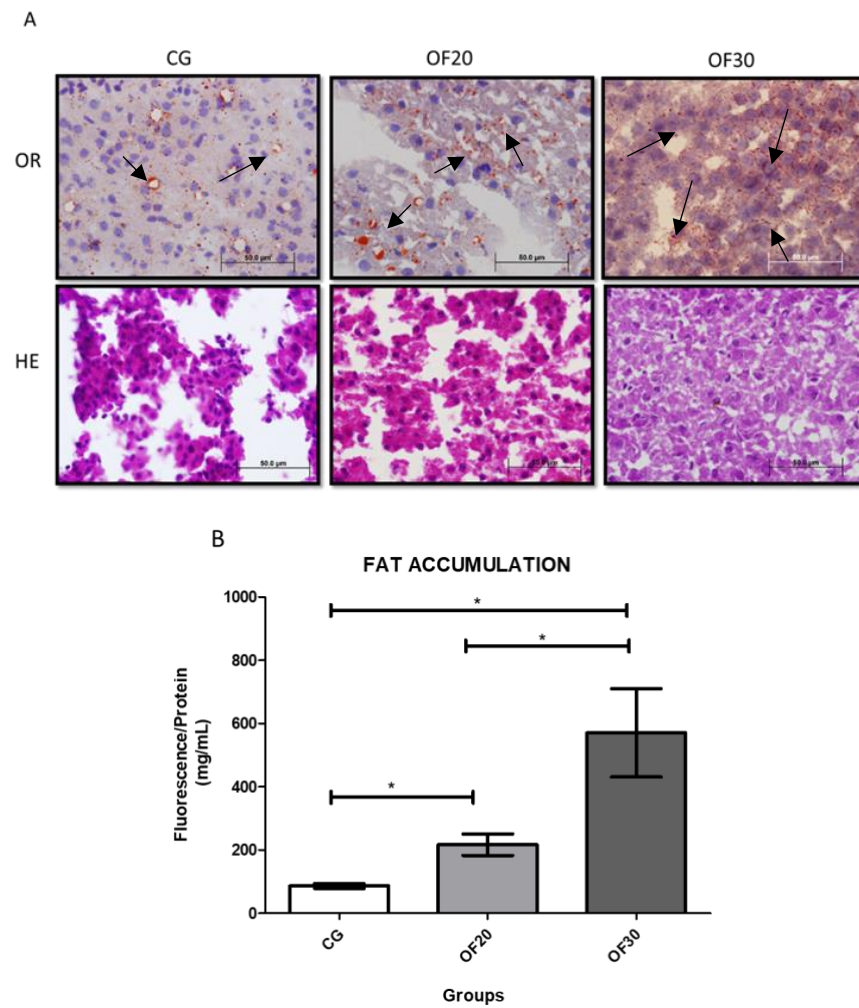


Figure 2. Assessment of accumulation of hepatic lipids. (A) Histological evaluation using H&E and Oil Red O staining. The OF30 group had a higher hepatic steatosis than the OF20 group ($n = 5$ / group). (B) Quantitative assessment of lipid accumulation demonstrated an increase in lipids seen in the OF30 group when compared to the OF20 and CG groups ($n = 4$ pools / group). Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test, * $p \leq 0.05$.

The accumulation of hepatic lipids was quantified, and the results demonstrated a significant increase in animals from the OF30 group when compared to those from the CG and OF20 groups ($p \leq 0.05$; Fig. 2B). These results could not be compared with the studies in Table 1, since the same parameters were not evaluated.

Discussion

To develop a zebrafish model of HCD, we overfed fish with frozen artemia. We divided the animals into 3 groups: CG, OF20 and OF30, respectively (Fig. S1). The amount of artemia that was fed was adjusted weekly according to weight and maintaining 20 cal of feed. After 4 weeks of HCD we observed some differences in the animals of OF30 group. They have increased in weight and BMI and showed the presence of hepatic steatosis.

Currently, there are several studies in the literature which propose models of obesity in zebrafish. Table 1 presents a comparison between studies using diet-induced obesity (DIO) models in adult zebrafish with artemia as a food source. The table distinguishes zebrafish lineage, type of food, length of diet administration and final weight increase in relation to the control group. The present study demonstrated some differences with those shown in table 1. Among these differences, the animals in the present study were wild type, whereas most of the other studies used animals from the AB line. Also, in the present study animals were not separated by sex. We also used frozen artemia, while other studies used fresh artemia. These differences did not seem to influence the increase in weight.

Table 1. Obesity in zebrafish models induced by diet.

Reference	Strain of zebrafish	Type of food	Volume of food	Number of animals	Induction time of obesity	Weight Increment[#]
Oka <i>et al.</i> , 2010	AB	Fresh arthemia	CG=5 mg/ day /fish OF=60 mg/ day /fish	64 fish	8 Weeks	1.2 times*
Tainaka <i>et al.</i> , 2011	AB	Fresh arthemia	CG=5 mg/ day /fish OF=60 mg/ day /fish	80 fish	2 Weeks	1.75 times*
Hasumura <i>et al.</i> , 2012	AB	Fresh arthemia	CG=5 mg/day /fish OF=60 mg/ day /fish	45 fish	5 Weeks	1.7 times*
Montalbano <i>et al.</i> , 2016	ND	Fresh arthemia	CG=20 mg/ day /fish OF=60 mg/ day /fish	28 fish	6 Weeks	1.3 times**

Mania <i>et al.</i> , 2017	ND	Fresh arthemia	CG=20 mg/ day /fish OF=60 mg/ day /fish	30 fish	6 Weeks	1.7 times**
Present study	WT	Frozen arthemia	CG=5,25 mg/ day /fish ^{\$} OF20=10 mg/ day /fish ^{\$} OF30=18 mg/ day /fish ^{\$}	30 fish	4 Weeks	1.2 times*

The animals used for the studies described in Table 1 were all adults. OF = overfed group. CG = control group. # in relation to the control group.

* Average between males and females. ** Only males. ND (not described) \$ values used at the beginning of the experiment.

When comparing the amount of weight gained in the studies presented in table 1, we observe that the results shown by Oka and coworkers were similar to what was seen in our study (a 1.2-fold increase), although they overfed their animals for 8 weeks (OKA *et al.*, 2010). In the studies by Montalbano et al. and Mania et al., the study animals gained an increase of 1.3 and 1.7 times their body weight, respectively. This increase was larger than the weight gain observed in our model, but the animals in the other studies were overfed for 6 weeks (MANIA *et al.*, 2017; MONTALBANO *et al.*, 2016). It should be noted that male fish were used exclusively in both studies. Hasumura et al. also observed a weight increase that was greater than what we observed in our model (1.7 times), even though the animals were only overfed for 5 weeks; moreover, the other study used both male and female fish (HASUMURA *et al.*, 2012).

Tainaka et al. demonstrated that in a short 2-week period of DIO the overfed fish had a 1.75-fold increase in weight compared to the control group (TAINAKA *et al.*, 2011). This increase may seem superior to our study; however, as in the other studies, the overfed group of animals received 60 mg of artemia per fish per day. In comparison, the present study showed a 1.2-fold increase in the weight of the animals using only 18 mg per fish per day in the OF30 group. Although the amount of food administered increased according to the animal weights, we did not reach 29.5 mg per fish per day in the present study. Therefore, the amount of feed used was approximately 3 times lower than what was used in the models described in Table 1. On the other hand, this study's CG used a similar or lesser amount of artemia.

The Oil Red O stain demonstrated that the accumulation of lipids in the liver tissue was greater as the fish received more food. These results agree with the studies by Oka et al. and Tainaka et al., which both showed hepatic steatosis through the same coloration (OKA *et al.*, 2010; TAINAKA *et al.*, 2011).

Conclusions

In conclusion, our study demonstrates that feeding a volume of frozen artemia equivalent to 30% of the animal's weight for 4 weeks can generate an increase in weight and BMI, as well as an increase in the presence of hepatic steatosis. It is important to note that amount of diet is almost 3 times smaller than the amount diets used in other studies and is easily reproducible. We propose that this diet can be used for an accurate HCD model.

Methods

Animals

Thirty wild type zebrafish, both male and female, were used. The animals were kept in aquariums at a density of 2 fish/L and at a temperature of $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ with a light:dark cycle of 14 h:10 h. The water quality conditions, such as pH, nitrite and ammonia levels, were maintained in accordance with the established protocol and regularly monitored (ZFIN Publication: Westerfield, 2000, 2000). The animals were fed frozen artemia (BioArtemia, RN Brazil) of nutritional composition, as shown in Table S1, and 20 calories (cal) of supplementary ration (elaborated by Fábio Marshall, UFPR, Paraná, Brazil) with a nutritional composition, as shown in Table S2.

Experimental Design

The animals were divided into three groups ($n = 10$ animals/group): the control group (CG), which received artemia equivalent to 10% of the animal's body weights, and the overfed group (OF) 20 and 30 (OF20 and OF30), which received a volume of artemia equivalent to 20% and 30% of the animal's body weights, respectively (Table S1). Amounts of fed artemia were adjusted weekly according to the weight of the animals and maintained 20 cal of feed (SICCARDI *et al.*, 2009; WATTS *et al.*, 2012). After 4 weeks, the animals were anesthetized with tricaine (400 mg/L, Sigma Aldrich, Missouri, USA) and euthanized by exsanguination, and then, the liver tissues were collected and stored at -20°C for further analysis.

Body Evaluation and Serum Glucose Evaluation

The animals were anesthetized in tricaine, weighed and measured every week for four weeks. After four weeks, at the time of euthanasia, the blood glucose of the retro orbital vein (VLIEGENTHART *et al.*, 2014) was evaluated with reactive strips and a glucose meter (Freestyle Optium, Abbot). The animals were fasted for 8 hours before these analyses were performed.

Evaluation of Hepatic Lipids

The hepatic tissue was stored at -20°C and then homogenized with PBS (20 mg/mL; Laborclin, Pinhais, PR) and incubated with Nile Red solution (stock solution 100 ng/mL, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) for 15 minutes at 37°C . The fluorescence of the supernatant was measured in

a plate reader (SpectraMax M5 Molecular Devices, California, USA) at 488 nm excitation and 550 nm emission.

Liver Histological Analysis

The hepatic tissues were frozen at -20°C with Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura, California, USA) and sectioned at a thickness of 3 µm in a cryostat at a cross-sectional orientation. The tissue was stained with H&E and Oil Red O (0.5% on propylene glycol), as previously reported with some modifications (MEHLEM *et al.*, 2013). The microphotographs were obtained using an optical microscope (Olympus, Japan).

Statistical Analysis

For the statistical analysis, a two-way ANOVA with a post hoc Bonferroni test was used to evaluate the differences in weight and BMI between the three different groups. For the non-parametric analyses, including the Nile Red technique and the evaluation of glycemic levels between groups, a Kruskal-Wallis test was used. The results were considered significant when $p \leq 0.05$. Statistical tests were performed using the SPSS v.18 statistical package and the GraphPad Prism v.5.0 program.

Ethics Approval

This study was approved by the CEUA Hospital de Clínicas de Porto Alegre, under number 15-0065. All procedures were carried out in accordance with Brazilian legislation (Law 11,794, of October 8, 2008) on animal experimentation and current resolutions.

Competing Interests

No competing interest declared. The authors have nothing to declare.

Funding

This work was supported by the Fund for Incentive Research and Events of the Clinical Hospital of Porto Alegre (FIPE / HCPA) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: Ayres, R; Uribe-Cruz, C; Reverbel da Silveira, T. Performed the experiments: Ayres, R. Analyzed the data: Ayres, R; Uribe-Cruz. Wrote the manuscript: Ayres, R; Uribe-Cruz, C; Reverbel da Silveira, T. Revised the manuscript: Reverbel da Silveira, T and Matte U. All of the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

FIPE-HCPA (Fund for Incentive Research and Events- Clinical Hospital of Porto Alegre) and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development).

References

BEST, J. D.; ALDERTON, W. K. Zebrafish: An in vivo model for the study of neurological diseases. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 4, n. 3, p. 567-76, Jun 2008. ISSN 1176-6328. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18830398> >.

BLÜHER, M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 27, n. 2, p. 163-77, Apr 2013. ISSN 1878-1594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23731879> >.

CARDIOLOGIA, S. B. D. [Guidelines for cardiac rehabilitation]. **Arq Bras Cardiol**, v. 84, n. 5, p. 431-40, May 2005. ISSN 0066-782X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15917979> >.

CHOQUET, H.; MEYRE, D. Genetics of Obesity: What have we Learned? **Curr Genomics**, v. 12, n. 3, p. 169-79, May 2011. ISSN 1875-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22043165> >.

FIERABRACCI, P.; TAMBERI, A.; SANTINI, F. Obesity-Related Comorbidities. In: LUCCHESI, M. e SCOPINARO, N. (Ed.). **Minimally Invasive Bariatric and Metabolic Surgery: Principles and Technical Aspects**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p.25-34. ISBN 978-3-319-15356-8.

FONTAINE, K. R. A. B., I. Obesity and health-related quality of life. **Obesity Reviews**, v. Volume 2, n. 3, p. 173-182, 2001. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1467-789x.2001.00032.x/abstract> jsessionid=A91FC04C1AD4E335A242ED8EF99EEB91.f02t03?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false >.

HASUMURA, T. et al. Green tea extract suppresses adiposity and affects the expression of lipid metabolism genes in diet-induced obese zebrafish. **Nutr Metab (Lond)**, v. 9, n. 1, p. 73, 2012. ISSN 1743-7075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22871059> >.

JAHANGIR, E.; DE SCHUTTER, A.; LAVIE, C. J. The relationship between obesity and coronary artery disease. **Transl Res**, v. 164, n. 4, p. 336-44, Oct 2014. ISSN 1878-1810. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24726461> >.

KOLOTKIN, R. L. et al. Development of a brief measure to assess quality of life in obesity. **Obes Res**, v. 9, n. 2, p. 102-11, Feb 2001. ISSN 1071-7323. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11316344> >.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 5, p. 353-67, May 2007. ISSN 1471-0056. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17440532> >.

MANIA, M. et al. Expression and distribution of leptin and its receptors in the digestive tract of DIO (diet-induced obese) zebrafish. **Ann Anat**, v. 212, p. 37-47, Jul 2017. ISSN 1618-0402. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28477448> >.

MCGRATH, P.; LI, C. Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **Drug Discov Today**, v. 13, n. 9-10, p. 394-401, May 2008. ISSN 1359-6446. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18468556> >.

MEGURO, S.; HASUMURA, T.; HASE, T. Body fat accumulation in zebrafish is induced by a diet rich in fat and reduced by supplementation with green tea extract. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120142, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25785691> >.

MEHLEM, A. et al. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. **Nature Protocols**, v. 8, p. 1149-1154, 2013-05-23 2013. ISSN 1754-2189. Disponível em: < <http://www.nature.com/nprot/journal/v8/n6/abs/nprot.2013.055.html?foxtrotcallback=true> >.

MONTALBANO, G. et al. Morphological differences in adipose tissue and changes in BDNF/Trkb expression in brain and gut of a diet induced obese zebrafish model. **Ann Anat**, v. 204, p. 36-44, Mar 2016. ISSN 1618-0402. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26617157> >.

OKA, T. et al. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. **BMC Physiol**, v. 10, p. 21, 2010. ISSN 1472-6793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20961460> >.

REAVEN, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595-607, Dec 1988. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3056758> >.

SETH, A.; STEMPLE, D. L.; BARROSO, I. The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. **Dis Model Mech**, v. 6, n. 5, p. 1080-8, Sep 2013. ISSN 1754-8411. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24046387> >.

SICCARDI, A. J. et al. Growth and Survival of Zebrafish (*Danio rerio*) Fed Different Commercial and Laboratory Diets. In: (Ed.). **Zebrafish**, v.6, 2009. p.275-80. ISBN 1545-8547 (Print)1557-8542 (Electronic).

SILVEIRA, T. R. D.; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4-5, 06/2012 2012. ISSN 0009-6725. Disponível em: < http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0009-67252012000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=pt >.Disponível em: < http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252012000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=pt >.Disponível em: < http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0009-67252012000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=pt >.

STEWART, S. T.; CUTLER, D. M.; ROSEN, A. B. Forecasting the effects of obesity and smoking on U.S. life expectancy. **N Engl J Med**, v. 361, n. 23, p. 2252-60, Dec 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19955525> >.

TAINAKA, T. et al. Transcriptome analysis of anti-fatty liver action by Campari tomato using a zebrafish diet-induced obesity model. **Nutr Metab (Lond)**, v. 8, p. 88, 2011. ISSN 1743-7075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22152339> >.

VLIEGENTHART, A. D. et al. Retro-orbital blood acquisition facilitates circulating microRNA measurement in zebrafish with paracetamol hepatotoxicity. **Zebrafish**, v. 11, n. 3, p. 219-26, Jun 2014. ISSN 1557-8542. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24625211> >.

WATTS, S. A.; POWELL, M.; D'ABRAMO, L. R. Fundamental Approaches to the Study of Zebrafish Nutrition. **ILAR J**, v. 53, n. 2, p. 144-60, 2012. ISSN 1084-2020 (Print)1930-6180 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/ilar.53.2.144> >.

WHO | Obesity and overweight. **WHO**, 2016-06-27 10:51:11 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> >.

ZANG, L. et al. Effects of Yuzu (*Citrus junos* Siebold ex Tanaka) peel on the diet-induced obesity in a zebrafish model. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 499-510, 2014/09/01/2014. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614002503> >.

ZFIN Publication: Westerfield, 2000. 2000. Disponível em: < <https://zfin.org/ZDB-PUB-101222-52> >.

Supplementary Material

Table S1. Nutritional composition of frozen Artemia (BioArtemia).

	Dry Matter (%)	Dried Air (%)
Dry Matter	100	9.96
Moisture		90.04
Organic Matter	78.63	0
Crude Protein	60.44	0
Crude Fiber	4.69	0
Ether Extract	6.94	0
Ashes	21.37	0
Nitrogen (Not Extracted)	6.56	0
Raw	4920	0
Energy (kcal/kg)		
NDT	82.45	0

* Bromatological Analysis was performed by the Animal Nutrition Laboratory (LNA) of the Animal Science Department of Agronomy Faculty of the UFRGS.

Table S2. Nutritional composition of the feed supplement.

Ingredients	Quantity (%)
Fish meal	5
Soy flour	59.4
Corn	31.1
Soybean oil	0.4
Calcium Phosphate	2.6
Mix of minerals and vitamins*	0.5
Salt	0.5
BHT** (antioxidant)	0.02
Ashes	8.2
Ether Extract	2.96
Crude Protein	32.3
Crude Fiber	3.6
Raw Energy (kcal/Kg)	4047.83

* Vit. A, 1200,000 IU; Vit. D3, 200,000UI; Vit. E, 12,000 mg; Vit. K3, 2400mg; Vit. B1, 4800mg; Vit. B2, 4800mg; Vit. B6, 400 mg; Vit. B12, 4800mg; folic acid 1200 mg; Calcium Pantothenate, 12,000 mg; Vit C, 48,000 mg; biotin, 48mg; colina, 65,000 mg; Niacin, 24,000; Iron, 10 mg; copper, 6000 mg; manganese, 4000 mg; Zinc, 6000 mg; iodine, 20 mg; Cobalt, 2 mg; Selenium, 20 mg. ** butylhydroxytoluene.

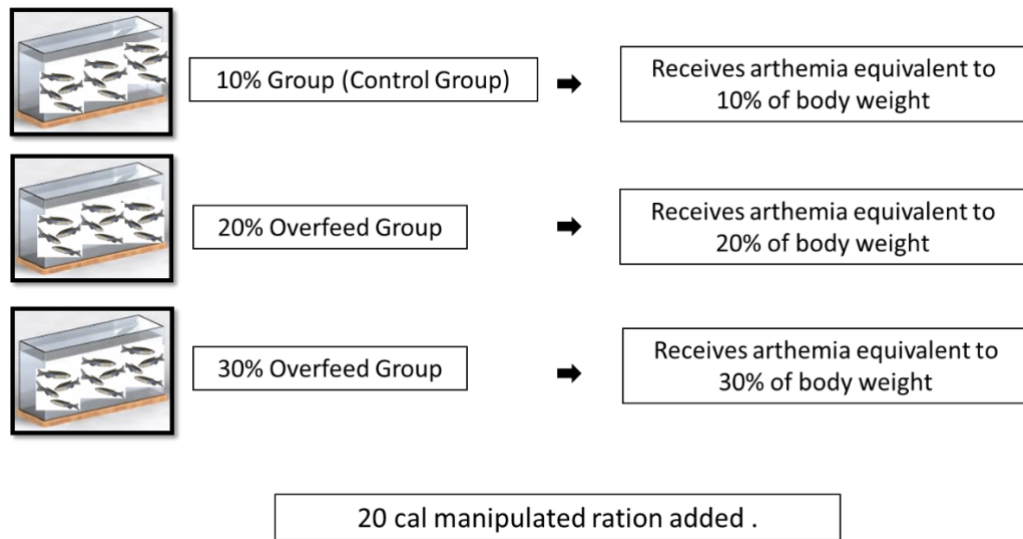


Figure S1. Experimental design. Division of the diet groups to establish the model of obesity induced by hypercloric diet.

**8 ARTIGO 2: INFLAMMATORY CYTOKINES AND INTSTINAL BARRIER IN
OBESE ZEBRAFISH**

Inflammatory cytokines and intestinal barrier in obese zebrafish.

Ayres, R.^{1,2}; Ferrari, J.T.², Bruch-Bertani J.P.², Guerreiro, G.T.S.², Uribe-Cruz², C; Da Silveira, T.¹; Matte, U.¹

1. Programa de Pós-graduação Saúde da Criança e do Adolescente

2. Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastreenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Abstract

Obesity can be characterized by accumulation of adipose tissue and increase of fat mass that generates a pro-inflammatory state. Some mechanisms of this state have been associated with adipokines and increased intestinal permeability. The use of zebrafish as a model of obesity has been shown as promising for presenting immunological and molecular similarities with mammals. The aim of this study was to evaluate the modifications of intestinal and hepatic inflammatory cytokines and intestinal barrier markers in the obese zebrafish. The fish were divided in two groups (n=30): obese group (OG) animals fed on concentration equivalent to 30% of body weight, and the control group (CG) animals fed on concentration equivalent to 10% of body weight. After four weeks of diet, OG showed an increase in their weight and serum triglycerides levels when compared to CG ($p \leq 0,05$). When evaluating the presence of hepatic steatosis, the OG presents a higher concentration of hepatic lipids than the CG. Gene expression analysis of hepatic inflammatory cytokines in OG, showed an increased expression of *il-1 β* while the expression of *il-10* was decreased. The evaluation of these cytokines in the intestinal tissue had their increased expression in the OG, as well as *tnf- α* . The constituent molecules of tight junction (TJ) claudin-c (*cldn-c*) and junctional adhesion molecule-A (*f11r*) showed decreased expression in OG when compared to CG. However, claudins-15a (*cldn-15a*) e claudins-15b (*cldn-15b*) showed no difference in their expression when the OG and CG groups were compared. Modifications in intestinal markers and hepatic inflammatory cytokines, as well as markers of the intestinal epithelial barrier in obese zebrafish, suggest an increased intestinal permeability and a stimulus in the accumulation of fat in the liver.

Key words: *Obesity, inflammatory cytokines, intestinal epithelium barrier, tight junction, zebrafish.*

Introduction

Obesity is one of main public health problem, constituting in a global epidemic responsible for increased morbidity and mortality—(AGUILAR-VALLES *et al.*, 2015; FONTAINE, 2001; REUSER *et al.*, 2009). It is characterized by the presence of dyslipidemia (CARDIOLOGIA, 2005; JAHANGIR *et al.*, 2014), elevated blood pressure, insulin resistance (BLÜHER, 2013; CARDIOLOGIA, 2005) central fat deposition (CARDIOLOGIA, 2005) and increased inflammation (JAHANGIR *et al.*, 2014; REAVEN, 1988). Among the main causes associated with obesity are excess of caloric intake, absence or reduction of physical activity and genetic susceptibility (CHOQUET e MEYRE, 2011).

Pathological conditions related to obesity are associated with chronic inflammation, characterized by abnormal production of cytokines, generating the hypothesis that obesity is a chronic and systemic low-grade inflammatory disease (AGUILAR-VALLES *et al.*, 2015; ROCHA e FOLCO, 2011; WINER *et al.*, 2016). Several mechanisms have been suggested for the increase of adipokine such as: recruitment of immune cells, including macrophages; hypoxia due to increased adipocyte size (increased oxidative stress); increased intestinal permeability (endotoxemias and changes in microbiota), associated with the inflammatory response (AGUILAR-VALLES *et al.*, 2015; WINER *et al.*, 2016).

Intestinal epithelium works as a physical barrier that restricts the input of antigenic molecules, in balance with the exposure an amount of dietary and microbial components (CRESCI e BAWDEN, 2015).

When there is damage of the intestinal barrier it occurs an increase of passage of molecules from the lumen to the lamina propria, inducing an immune system response. According with Odenwald and Turner (2013); and Suzuki and col, (2013) the injury in intestinal barrier would lead to an increase in intestinal permeability and could act as stimulus for the development of intestinal and systemic diseases (ODENWALD e TURNER, 2013; SUZUKI, 2013).

The animal model of zebrafish has become a widely used tool for understanding the cause of obesity as well as its associated diseases (FORN-CUNÍ *et al.*, 2015; SCHLEGEL, 2015; SCHLEGEL e GUT, 2015). Currently in the literature some studies have presented different models of obesity on zebrafish (MEGURO *et al.*, 2015; OKA *et al.*, 2010; TAINAKA *et al.*, 2011; ZANG *et al.*, 2014).

The obesity model induced by diet by that was used in this study was developed by our group (data not shown; Ayres, *et al.* 2018), in which were evaluated different feed concentrations (20% and 30%) according to the animal's body weight . The results showed that after 4 weeks of diet the group that received arthemina concentration equivalent to 30% of their weight were obese, had increased glycemia and hepatic steatosis. Therefore, it was established that the concentration of 30% feed according body weight is able to determinate obesity (data not shown).

The main objective of this research was to study inflammatory intestinal and hepatic marks on obese zebrafish evaluating the gene expression of intestinal barrier components.

Material and methods

Zebrafish feeding and maintenance

Sixty adult zebrafish, wild type, male and female were used. The animals were kept in aquariums at the density of 2 fish/L. Fish were kept at 28°C ± 2°C, light:dark cycle of 14h:10h,

and water quality conditions such as temperature, pH, nitrite and ammonia were maintained according to established protocol and periodically monitored (WESTERFIELD, 2000). The animals were fed with frozen artemia (BioArtemia, RN Brazil; table 1, supplemented with 20 calories (cal) of fed (Elaborated by Fábio Meurer, UFPR, PR, Brazil) of fed of nutritional composition according to table 2.

Table 1. Nutritional composition of frozen Artemia (BioArtemia).

	Dry Matter (%)	Dried Air (%)
Dry Matter	100	9.96
Moisture		90.04
Organic	78.63	0
Matter		
Crude	60.44	0
Protein		
Crude	4.69	0
Fiber		
Ether	6.94	0
Extract		
Ashes	21.37	0
Nitrogen	6.56	0
(Not Extracted)		
Raw	4920	0
Energy (kcal/kg)		
NDT	82.45	0

Table 2. Nutritional composition of the feed supplement.

Ingredients	Quantity (%)
Fish meal	5
Soy flour	59.4
Corn	31.1
Soybean oil	0.4
Calcium Phosphate	2.6
Mix of minerals and vitamins*	0.5
Salt	0.5
BHT** (antioxidant)	0.02
Ashes	8.2
Ether Extract	2.96
Crude Protein	32.3
Crude Fiber	3.6
Raw Energy (kcal/Kg)	4047.83

*** Vit. A, 1200,000 IU; Vit. D3, 200,000UI; Vit. E, 12,000 mg; Vit. K3, 2400mg; Vit. B1, 4800mg; Vit. B2, 4800mg; Vit. B6, 400 mg; Vit. B12, 4800mg; folic acid 1200 mg; Calcium Pantothenate, 12,000 mg; Vit C, 48,000 mg; biotin, 48mg; colina, 65,000 mg; Niacin, 24,000; Iron, 10 mg; copper, 6000 mg; manganese, 4000 mg; Zinc, 6000 mg; iodine, 20 mg; Cobalt, 2 mg; Selenium, 20 mg. ** butylhydroxytoluene.**

Experimental design

The animals were divided into two groups (n=30 animals/group): Control Group (CG) which received arthemias concentration equivalent to 10% of body weight supplemented with 20 cal of feed; and the Obesity Group (OG) which received arthemias concentration equivalent

to 30% of the body weight supplemented with 20 cal of fed. Weekly, the amount of arthemia was adjusted according to the weight of the animals (SICCARDI *et al.*, 2009; WATTS *et al.*, 2012). After four weeks the animals were anesthetized in tricaine submersion (400 mg/L, Sigma Aldrich, Missouri, USA) and euthanized by exsanguination; the blood was collected and stored at -20°C. The liver and intestinal tissues were collected for analysis.

Body and Serum evaluation

The animals were weighed and measured (head to tail) weekly during the study, they were anesthetized in tricaine immersion (400 mg / L; Sigma Aldrich, Missouri, USA).

For serum evaluations, the animals were fasted for 8 hours and the blood was collected from the retro orbital vein at the time of euthanasia. Serum was obtained by centrifugation. Serum levels of HDL-cholesterol, total cholesterol and triglycerides were evaluated using Labtest® colorimetric kits (Minas Gerais, Brazil) according to the manufacturer's instructions modified by Pedroso *et al.* (PEDROSO *et al.*, 2012). For each test we used n = 3 pools serum/group (1 pool serum = 10 fish).

Evaluation of inflammatory cytokines and tight junction constituents

The intestine was collected and stored in RNAlater at -80°C. Extraction of total RNA was done using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA was converted to cDNA with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Invitrogen, California, USA) according to the manufacturer's instructions. Expression of the *cldn-c*, *f11r*, *cldn-15a*, *cldn-15b* (tight junction components) and *il-1β*, *tnf-α* and *il-10* inflammatory cytokines were evaluated by RT-qPCR using TaqMan probes (Invitrogen, California, USA, table 3). The *ef1a* gene was used as the normalizer. The values were calculated by the formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (n = 10 pool / group).

Table 3. Taqman probes used for the analysis of inflammatory cytokines of the liver and intestine and the components of tight junctions.

Gene	Assay ID
<i>il-1β</i>	Dr03114368_m1
<i>tnf-α</i>	Dr03126850_m1
<i>il-10</i>	Dr03103209_m1
<i>f11r</i>	Dr03118078_m1
<i>cldn-c</i>	Dr03138426_s1
<i>cldn-15a</i>	Dr03145240_m1
<i>cldn-15b</i>	Dr03072501_m1
<i>ef1α</i>	Dr03432748_m1

Evaluation of inflammatory cytokines and hepatic steatosis

In the hepatic tissue the gene expression of inflammatory cytokines *il-1 β* , *tnf- α* and *il-10* (table 3) was evaluated as previously described (n = 10 pool/group).

The lipid deposits in the tissue were analyzed and quantified using the histological staining technique of Oil Red O and its quantification as described below.

The hepatic tissue was frozen at -20°C with Tissue Tek® O.T.C Compound (Sakura, California, USA) for subsequent histological cross-sections in a cryostat in the thickness of 3-5 μ m. The tissue was stained with HE and Oil Red O (0.5% on propylene glycol) following modified protocol from Mehlem et al. (Mehlem et al., 2013). Microphotographs were obtained by optical microscope (Olympus, Japan).

Quantitative analysis of hepatic steatosis was performed using ImageJ software 1.46b (NIH Image, Rockville, MD, USA). Using Oil Red O staining, optic microscopy images of 5 random areas of each slide (n = 4/group) were obtained.

Statistical analysis

The ANOVA one-way test with Tukey post-hoc was used to evaluate the weight variation. For the non-parametric analyzes the Mann-Whitney U test, for biochemical evaluations and evaluations of inflammatory cytokines and constituents of tight junctions. The results were considered significant when the value of $p \leq 0.05$. Statistical tests were performed using the SPSS v.18 statistical package and the GaphPhad Prism v.7.0 program.

Ethical consideration

This study was approved by the CEUA and the CEP of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (RS), under number 15-0065. All experiments were carried out in accordance with Law No. 11,794 of October 8, 2008 and following the regulations of normative resolutions n° 12 and 13 of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Results

Weight gain and BMI of zebrafish submitted to hypercaloric diet

At the end of four weeks of diet, the OG presented a 1.2-fold increase in their weight compared to CG, as well as an increase 1.3-fold in their BMI ($p \leq 0.05$) (Figure 1A and 1B). The animals' weight and BMI difference could be observed from the second week of diet. The OG also presented a representative increase in its abdominal volume (Figure 1C).

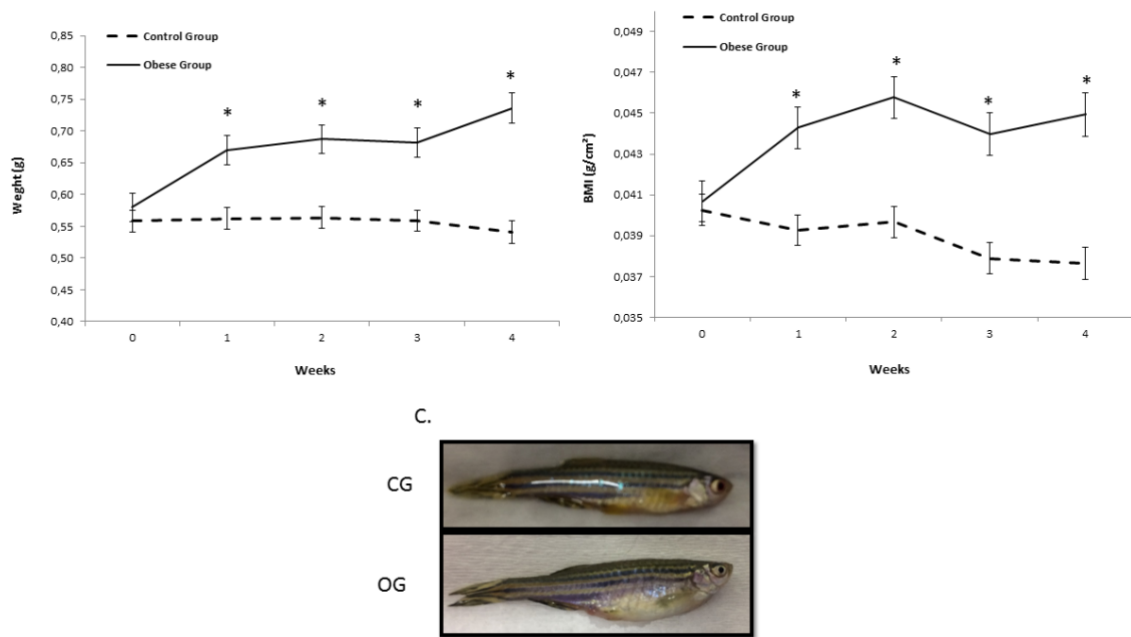


Figure 1. Body evaluation after four weeks of diet. (A) Weight. The OG showed an increase in weight from the second week of diet compared to CG. (B) BMI. OG shows an increase in BMI compared to GC from the second week. ANOVA ONE-WAY, mean \pm standard deviation, * $p \leq 0.05$ $n = 30$ /group. (C) Animals photograph at the end of the 4th week of experiment, showing the difference in the abdomen size between the groups. GC = control group, GO = obese group.

Lipid profile in the obesity model

The OG had higher serum triglyceride levels when compared to the CG ($p = 0.021$). Serum levels of total cholesterol and HDL-cholesterol did not show significant differences between groups (Table 4).

Table 4. Biochemical analyzes of serum lipid profile.

Variables	CG	OG	P
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
Triglyceride	638.69 \pm 41.22 ^a	1090.6 \pm 264.1 ^b	0.021
Total cholesterol	381.0 \pm 38.9 ^a	437.7 \pm 76.9 ^a	0.218
HDL-cholesterol	0.06 \pm 0.05 ^a	0.07 \pm 0.002 ^a	0.507
Glycemia*	43.0 \pm 11.0 ^a	233.0 \pm 45.0 ^b	0.05

^{a,b} Equal letters do not differ by the Mann-Whitney test at 5% significance $n=3$ pool/10 animals each. *Kruskal-Wallis, $p \leq 0.05$.

Gene expression of intestinal inflammatory disease/state (bowel disease)

Gene expression of inflammatory intestinal cytokines was evaluated, since obesity generates a low-grade chronic and systemic inflammatory state (AGUILAR-VALLES *et al.*, 2015; ROCHA e FOLCO, 2011). In this sense, OG animals showed a significant increase ($p \leq 0.05$) in the expression of *il-1 β* , *tnf- α* and *il-10* genes in the intestinal tissue when compared with CG (Figure 2A-2C).

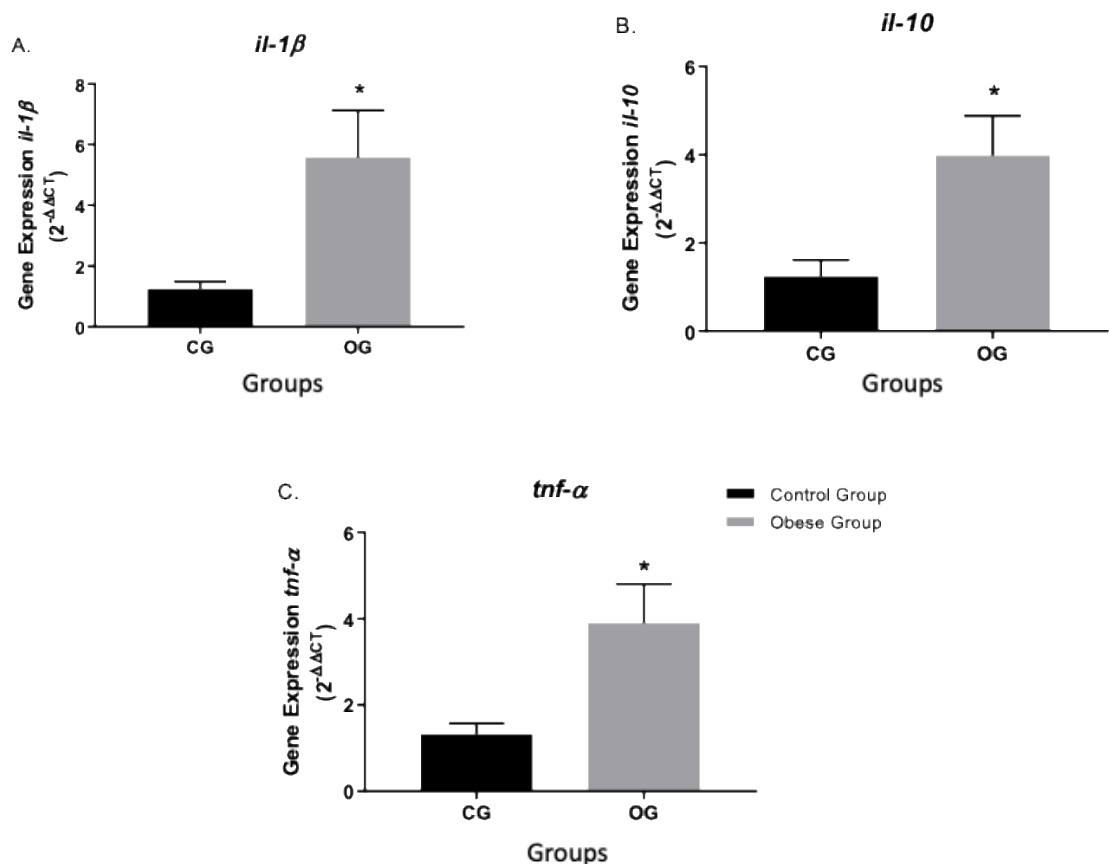


Figure 2. Evaluation of gene expression the inflammatory cytokines of intestinal tissue. (A) *il-1 β* gene expression was increased in OG when compared to CG. (B) *tnf- α* , the OG showed an increase in its expression when compared to CG. (C) *il-10*, showed an increase in its expression in OG when compared with CG. Mann-Whitney U test, mean \pm standard error; * $p \leq 0.05$. n = 10 pool/group

Expression of genes forming tight junction

Expression of tight junction (TJ) genes from the intestinal barrier was evaluated. The *f11r* and *cldn-c* genes had their expressions decreased in OG; 1.5-fold and 1.6-fold,

respectively, compared to CG (Figure 3A and 3B). However, the TJ *cldn-15a* and *cldn-15b* had no difference in their expression when compared between the groups (Figure 2C and 2D, respectively).

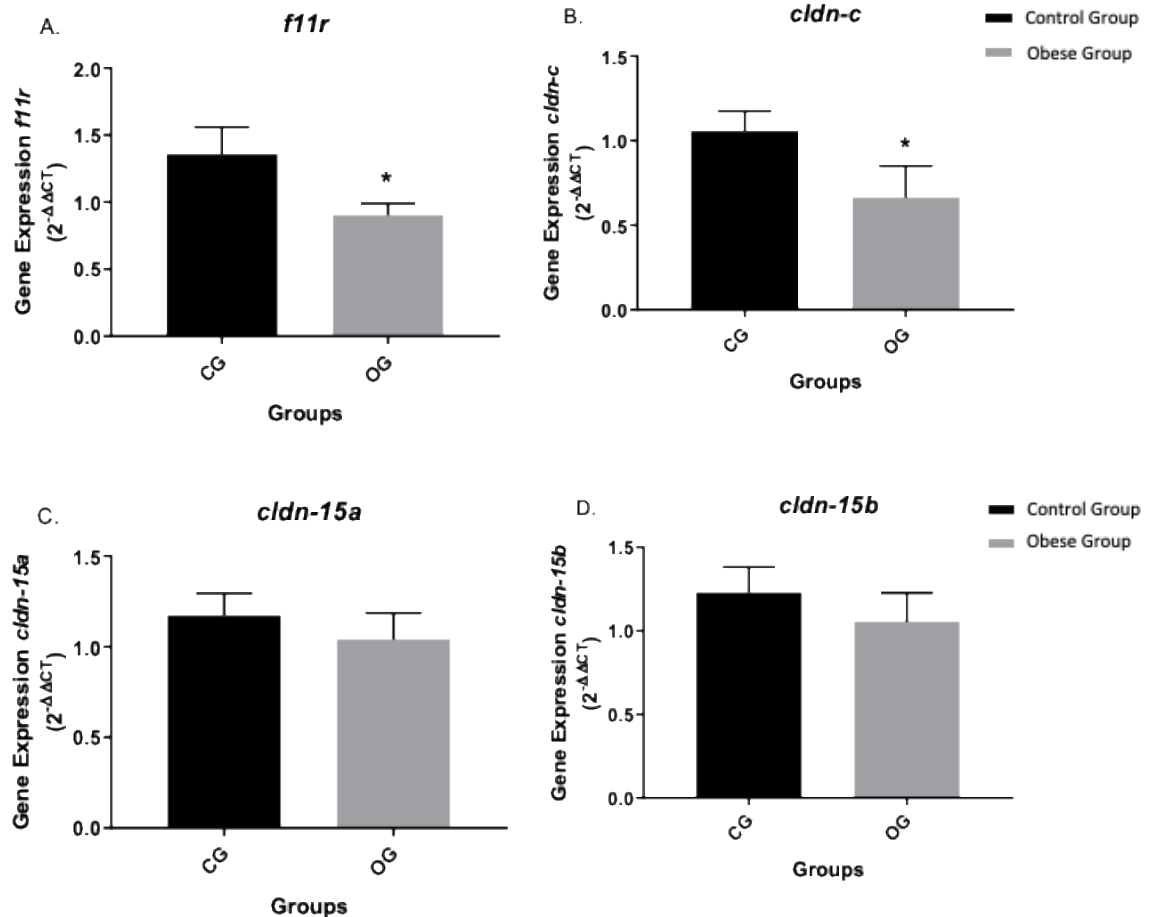


Figure 3. Evaluation of the gene expression of tight junction components of the intestinal epithelium. (A) *f11r* gene, showed a decrease in its expression in OG compared to CG. (B) *cldn-c* gene, the OG showed a decrease in its expression when compared to CG. (C) and (D) genes *cldn-15a* and *cldn-15b*, respectively; showed no difference in their expression when compared to CG and OG. Mann-Whitney U test, mean \pm standard error * $p \leq 0.05$. n = 10 pool/group.

Inflammatory cytokines and accumulation of hepatic lipids

The hypercaloric diet generates an increase of fat in liver. In the histological staining with Oil Red O in the hepatic tissue, the OG presents more accumulation of lipids than the GC

(Figure 4A-B). The quantification of this accumulation of lipids shows that the OG compared with the GC has more fat in the liver ($p \leq 0.05$; Figure 4C).

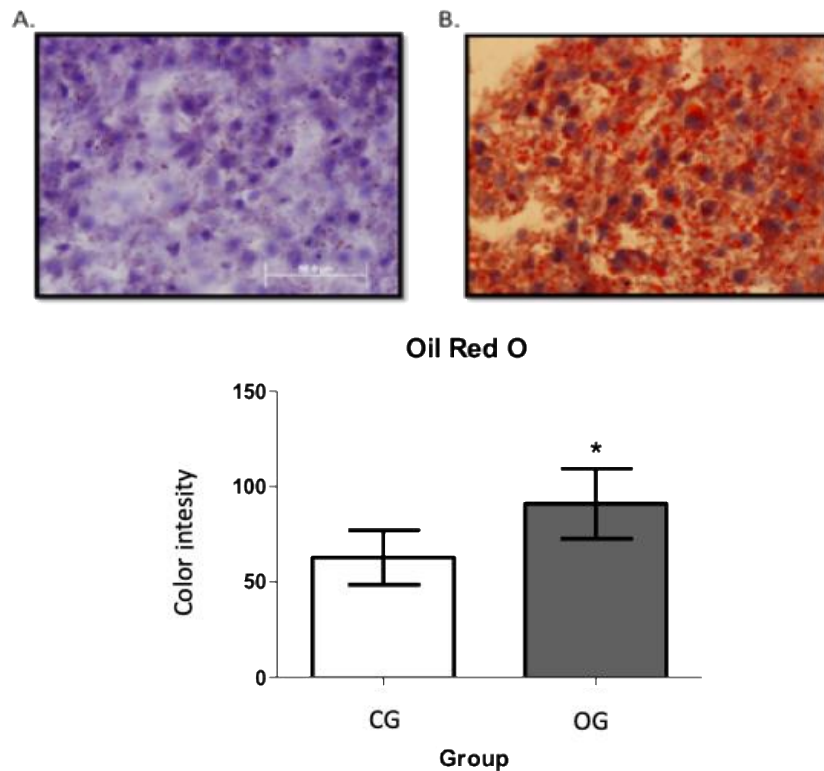


Figure 4. Evaluation of accumulation the hepatic lipids. Coloration Oil Red O. CG, control group (A) and OG, obese group (B). 100x. (C) Quantification of hepatic lipid accumulation. The OG has a higher accumulation of hepatic lipids than CG ($n = 4/\text{group}$). Mann-Whitney U test; mean \pm standard error, * $p \leq 0.05$.

The gene expression of inflammatory cytokines in hepatic tissue was evaluated. We observed that *il-1 β* showed a 2.81-fold increase in its expression in OG compared to CG (Figure 5A, $p \leq 0.05$). And *il-10* presented a 2.5-fold decrease in OG when compared to CG (Figure 5C, $p \leq 0.05$). However, *tnf- α* , did not present significant statistical difference between the groups (Figure 5B).

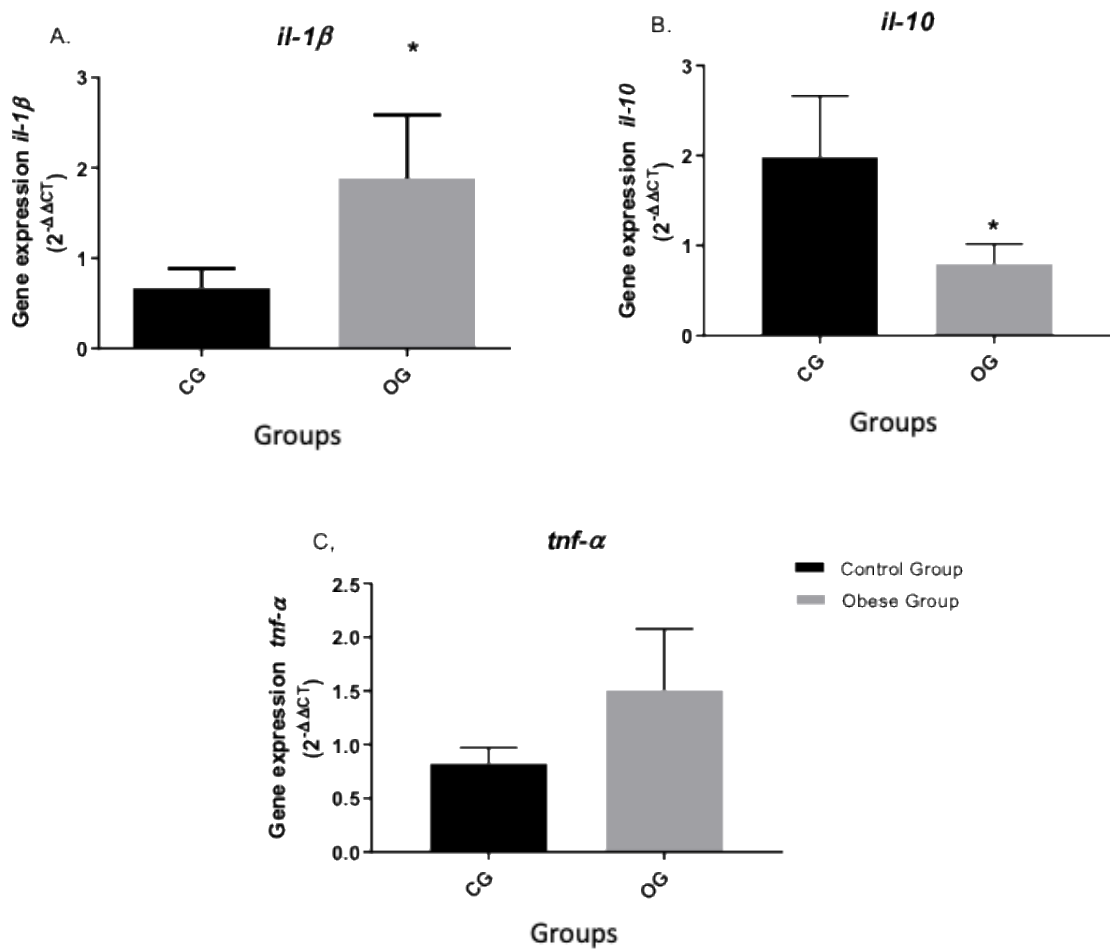


Figure 5. Evaluation of the gene expression of hepatic inflammatory cytokines. (A) *il-1β*, OG showed an increase in its expression when compared to CG. (B) *il-10*, showed a decrease in its expression in the OG when compared with the CG. (C) *tnf-α*, showed no difference in its expression when compared to OG and CG. Mann-Whitney U test, mean ± standard error; * $p \leq 0.05$. $n = 10$ pool/group

Discussion

In this study, we showed in an adult zebrafish model that the hypercaloric diet that corresponds to 30% of the body weights of frozen artemia supplemented to 20 calories of usual ration produces obesity. After four weeks with diet the animals increased weigh and BMI, there was accumulation of hepatic lipids and hypertriglyceridemia. In order to evaluate the effect of diet in relation to inflammation, intestinal permeability and lipid accumulation in the

liver, we evaluated the gene expression of inflammatory cytokines and of molecules genes belonging to intestinal tight junction.

The obesity model used in this study was previously established by our group when we observed a weight gain 1.2-fold higher in the OG group compared to the CG. The same weight gain has now been observed. Compared with studies analyzing obesity in adult zebrafish, we emphasize that the amount of fed used was approximately 3-fold lower (FORN-CUNÍ *et al.*, 2015; MONTALBANO *et al.*, 2016; OKA *et al.*, 2010; TAINAKA *et al.*, 2011).

In the study by Johnson and coworkers, rats with a high fat diet showed inflammatory alterations through the activation of NF- κ B and the expression of TNF- α and IL-1 β , that contribute to the onset of increased intestinal permeability (JOHNSON *et al.*, 2015). Our study in zebrafish demonstrated an increase intestinal tissue gene expression of *il-1 β* , *tnf- α* and *il-10* compared the OG and CG animals ($p \leq 0,05$).

In relation to the intestinal lesion IL-1 β is involved in both the early and late inflammatory response (AL-SADI e MA, 2007). Pendyala *et al.* evaluated proinflammatory cytokines and gene expression in colonic mucosa biopsies of obese women before and after a very low-calorie diet. The authors observed association between weight loss and reduction in TNF- α , IL-1 β and IL-8 expression, and down-regulation of genes linked to proinflammatory signaling pathways (PENDYALA *et al.*, 2011). Van der Heidjein *et al* (2015), in mouse, showed that IL-10 overexpression maybe associated with immunological activation, meaning that the persistence of this cytokine would represent protection, neutralizing proinflammatory events (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2015). In our study, we also observed overexpression of *il10* in the intestinal tissues of zebrafish submitted to HCD.

The molecules that make up the TJ are important in the regulation of solutes and water in the cells of vertebrates and also play an important role in the selective regulation of intestinal permeability in relation to the intestinal microbiota in human and in zebrafish (KWONG *et al.*,

2013; VAJRO *et al.*, 2013). Our results showed that HCD determined a decrease in gene expression of *cldn-c* about 1.6 - fold in the OG compared to CG. Likewise, the gene expression of *fllr* decreased 1.5-fold in OG. Cani *et al.* (2008), in mice, and Teixeira *et al.* (2012), in humans, suggest that the reduction of TJ protein expression leads to an increase in intestinal permeability. It is known that the intestinal microbiota plays a relevant role in the intestinal-liver relations (CANI *et al.*, 2008; TEIXEIRA, SOUZA, *et al.*, 2012).

When dysbiosis is present the barrier function will be altered by increased intestinal permeability and endotoxin may translocate from the intestinal lumen to the submucosa and from there to the bloodstream (VAJRO *et al.*, 2013). It is known that intestinal dysbiosis stimulate the IL-1 β production, which plays a central role in the proinflammatory response in obesity. Heine-Mejia *et al.* (2012) have shown that the genetic deficiency of the constituents of inflammasome associated with dysbiosis determines a high concentration of bacterial products in the portal vein system, which can trigger hepatic steatosis (HENAO-MEJIA *et al.*, 2012).

In quantitative evaluation of fat droplets in the liver with the Oil Red staining it was demonstrated that the OG animals presented higher lipid accumulation when compared to the CG ($p \leq 0,05$). We observed that in addition to fat gain there was also elevation in the expression of inflammatory cytokine genes in the liver. In a recent study, Negri and colleagues demonstrated the importance of IL-1 β in cases of obesity-induced hepatic steatosis and suggested that the inflammatory process of the liver is responsible for hepatic lipogenesis in obesity (NEGRIN *et al.*, 2014). In our study, the gene expression of cytokine *il1- β* was increased in the OG in comparison to CG. However, the *il-10* gene expression in liver was reduced, whereas *tnf- α* gene expression showed no difference between the groups.

Conclusion

We have shown that HCD in addition to weight change and BMI also had effects on the gene expression of inflammatory cytokines and components of the intestinal epithelial barrier. Obese animals showed hepatic steatosis, hypertriglyceridemia and elevated glucose. There was increased gene expression of inflammatory hepatic and intestinal cytokines and decreased gene expression of intestinal barrier components. We believe that the proposed model resembles the characteristics frequently observed in obese patients.

Acknowledgments

FIPE-HCPA (Fund for Incentive Research and Events- Clinical Hospital of Porto Alegre) and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development). Centro de Pesquisa Experimental do HCPA e a Dr. Emily Ferreira Salles Pilar from Experimental Pathology HCPA

Competing interests

No competing interest declared. The authors have nothing to declare.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: Ayres, R; Uribe-Cruz, C; Reverbel da Silveira, T. Performed the experiments: Ayres, R. Ferrari, J.T, Bruch-Bertani J.P, Guerreiro, G.T.S. Analyzed the data: Ayres, R; Uribe-Cruz. Wrote the paper: Ayres, R; Uribe-Cruz, C; Reverbel da Silveira, T. Revised the manuscript: Reverbel da Silveira, T, Matte U. All of the authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the Fund for Incentive Research and Events of the Clinical Hospital of Porto Alegre (FIPE / HCPA) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-VALLES, A. et al. Obesity, adipokines and neuroinflammation. **Neuropharmacology**, Jan 2015. ISSN 1873-7064. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25582291> >.

AL-SADI, R. M.; MA, T. Y. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. **J Immunol**, v. 178, n. 7, p. 4641-9, Apr 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17372023> >.

BLÜHER, M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 27, n. 2, p. 163-77, Apr 2013. ISSN 1878-1594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23731879> >.

CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1470-81, Jun 2008. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305141> >.

CARDIOLOGIA, S. B. D. [Guidelines for cardiac rehabilitation]. **Arq Bras Cardiol**, v. 84, n. 5, p. 431-40, May 2005. ISSN 0066-782X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15917979> >.

CHOQUET, H.; MEYRE, D. Genetics of Obesity: What have we Learned? **Curr Genomics**, v. 12, n. 3, p. 169-79, May 2011. ISSN 1875-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22043165> >.

CRESCI, G. A.; BAWDEN, E. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. **Nutr Clin Pract**, v. 30, n. 6, p. 734-46, Dec 2015. ISSN 1941-2452. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26449893> >.

FONTAINE, K. R. A. B., I. Obesity and health-related quality of life. **Obesity Reviews**, v. Volume 2, n. 3, p. 173-182, 2001. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1467-789x.2001.00032.x/abstract> >

jsessionid=A91FC04C1AD4E335A242ED8EF99EEB91.f02t03?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false >.

FORN-CUNÍ, G. et al. Liver immune responses to inflammatory stimuli in a diet-induced obesity model of zebrafish. **J Endocrinol**, v. 224, n. 2, p. 159-70, Feb 2015. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25371540> >.

HENAO-MEJIA, J. et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 179-85, Feb 2012. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22297845> >.

JAHANGIR, E.; DE SCHUTTER, A.; LAVIE, C. J. The relationship between obesity and coronary artery disease. **Transl Res**, v. 164, n. 4, p. 336-44, Oct 2014. ISSN 1878-1810. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24726461> >.

JOHNSON, A. M. et al. High fat diet causes depletion of intestinal eosinophils associated with intestinal permeability. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0122195, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25837594> >.

KWONG, R. W.; KUMAI, Y.; PERRY, S. F. Evidence for a role of tight junctions in regulating sodium permeability in zebrafish (*Danio rerio*) acclimated to ion-poor water. **J Comp Physiol B**, v. 183, n. 2, p. 203-13, Feb 2013. ISSN 1432-136X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22843140> >.

MEGURO, S.; HASUMURA, T.; HASE, T. Body fat accumulation in zebrafish is induced by a diet rich in fat and reduced by supplementation with green tea extract. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120142, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25785691> >.

MONTALBANO, G. et al. Morphological differences in adipose tissue and changes in BDNF/Trkb expression in brain and gut of a diet induced obese zebrafish model. **Ann Anat**, v. 204, p. 36-44, Mar 2016. ISSN 1618-0402. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26617157> >.

NEGRIN, K. A. et al. IL-1 signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107265, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25216251> >.

ODENWALD, M. A.; TURNER, J. R. Intestinal permeability defects: is it time to treat? **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 11, n. 9, p. 1075-83, Sep 2013. ISSN 1542-7714. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23851019> >.

OKA, T. et al. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. **BMC Physiol**, v. 10, p. 21, 2010. ISSN 1472-6793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20961460> >.

PEDROSO, G. L. et al. Blood collection for biochemical analysis in adult zebrafish. **J Vis Exp**, n. 63, p. e3865, 2012. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664657> >.

PENDYALA, S. et al. Diet-induced weight loss reduces colorectal inflammation: implications for colorectal carcinogenesis. **Am J Clin Nutr**, v. 93, n. 2, p. 234-42, Feb 2011. ISSN 1938-3207. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21147860> >.

REAVEN, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595-607, Dec 1988. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3056758> >.

REUSER, M.; BONNEUX, L. G.; WILLEKENS, F. J. Smoking kills, obesity disables: a multistate approach of the US Health and Retirement Survey. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, n. 4, p. 783-9, Apr 2009. ISSN 1930-7381. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19165165> >.

ROCHA, V. Z.; FOLCO, E. J. Inflammatory concepts of obesity. **Int J Inflamm**, v. 2011, p. 529061, 2011. ISSN 2042-0099. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21837268> >.

SCHLEGEL, A. Studying lipoprotein trafficking in zebrafish, the case of chylomicron retention disease. **J Mol Med (Berl)**, v. 93, n. 2, p. 115-8, Feb 2015. ISSN 1432-1440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25572701> >.

SCHLEGEL, A.; GUT, P. Metabolic insights from zebrafish genetics, physiology, and chemical biology. **Cell Mol Life Sci**, v. 72, n. 12, p. 2249-60, Jun 2015. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25556679> >.

SICCARDI, A. J. et al. Growth and Survival of Zebrafish (*Danio rerio*) Fed Different Commercial and Laboratory Diets. In: (Ed.). **Zebrafish**, v.6, 2009. p.275-80. ISBN 1545-8547 (Print)1557-8542 (Electronic).

SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 4, p. 631-59, Feb 2013. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782113> >.

TAINAKA, T. et al. Transcriptome analysis of anti-fatty liver action by Campari tomato using a zebrafish diet-induced obesity model. **Nutr Metab (Lond)**, v. 8, p. 88, 2011. ISSN 1743-7075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22152339> >.

TEIXEIRA, T. F. et al. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. **Clin Nutr**, v. 31, n. 5, p. 735-40, Oct 2012. ISSN 0261-5614. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2012.02.009> >.

VAJRO, P.; PAOLELLA, G.; FASANO, A. Microbiota and gut-liver axis: their influences on obesity and obesity-related liver disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 56, n. 5, p. 461-8, May 2013. ISSN 1536-4801. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23287807> >.

VAN DER HEIJDEN, R. A. et al. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. **Aging (Albany NY)**, v. 7, n. 4, p. 256-68, Apr

2015. ISSN 1945-4589. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25979814> >.

WATTS, S. A.; POWELL, M.; D'ABRAMO, L. R. Fundamental Approaches to the Study of Zebrafish Nutrition. **ILAR J**, v. 53, n. 2, p. 144-60, 2012. ISSN 1084-2020 (Print)1930-6180 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/ilar.53.2.144> >.

WESTERFIELD, M. The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*). 2000. Disponível em: < <https://zfin.org/ZDB-PUB-101222-52> >.

WINER, D. A. et al. The Intestinal Immune System in Obesity and Insulin Resistance. **Cell Metab**, v. 23, n. 3, p. 413-26, Mar 2016. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26853748> >.

ZANG, L. et al. Effects of Yuzu (*Citrus junos* Siebold ex Tanaka) peel on the diet-induced obesity in a zebrafish model. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 499-510, 2014/09/01/2014. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614002503> >.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Limitações:

Nosso estudo apresentou algumas limitações. Os peixes utilizados neste estudo foram adquiridos de lojas de aquarismo. Não sabemos, portanto, a sua procedência e se os animais estavam saudáveis ou sob que condições foram manejados. Isso implicou a utilização de altos períodos de quarentena

Houve dificuldade no preparo de artêmia viva, por isso utilizamos artêmia congelada. Mas não encontramos nenhum outro estudo que tenha utilizado este tipo de alimentação para estabelecer obesidade nos animais. Assim, houve dificuldade de equiparar os métodos utilizados com estudos já publicados mesmo tendo realizado a análise bromatológica da artêmia utilizada no estudo. Isso, no entanto, nos garantiu a composição nutricional do alimento e a capacidade de realizarmos os cálculos da quantidade de calorias de ingesta do peixe.

Perspectivas:

Hoje tem se falado na associação da microbiota intestinal com uma gama de doenças, dentre estas a obesidade. O aumento da ingesta calórica altera o perfil da microbiota intestinal destes indivíduos. A disbiose também tem sido associada com o desenvolvimento de esteatose hepática e sua progressão para esteatohepatite. A interação entre a microbiota intestinal e outros fatores, como a deficiência de inflamassomas, podem ser mecanismos que influenciem o desenvolvimento da obesidade e de suas comorbidades. Disbiose e aumento da PI, ocorrem devido ao acúmulo de LPS e de endotoxinas, estimulando a síntese de NF- κ B e da produção de IL1- β . Neste sentido de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, as perspectivas seriam aprofundar o estudo com inflamassomas e microbiota intestinal. E também avaliar profundamente as análises de PI, com pesquisas de microscopia eletrônica e associação

de outros genes. E ainda realizar um tratamento com inibidor de IL-1 β e/ou bloqueador da via de NF-kB.

10 CONCLUSÕES

1. Estabelecer um modelo de obesidade com dieta hipercalórica em *zebrafish*.

O modelo de obesidade com dieta hipercalórica em *zebrafish* adultos foi estabelecido, utilizando a concentração de 30% do peso corporal do animal de artêmia congelada suplementada com 20 cal de ração.

2. Analisar o perfil bioquímico de triglicerídeos, colesterol total e colesterol-HDL e glicose no soro.

Houve aumento nos níveis de glicemia e de triglicerídeos nos peixes submetidos à DHC, GO. O nível de colesterol-total não apresentou diferença entre os grupos.

3. Avaliar a presença de esteatose hepática.

Houve aumento da presença de acúmulo de gordura no fígado dos peixes submetidos à DHC.

4. Avaliar a expressão gênica de componentes das *tight junction* da barreira intestinal.

Houve diminuição na expressão gênica de *clnd-c* e *f11r* nos animais submetidos à DHC. E não houve alteração na expressão das *cldn-15a*, *cldn-15b*.

5. Avaliar a expressão gênica de citocinas inflamatórias no tecido intestinal.

Houve aumento na expressão das citocinas inflamatórias *il-1 β* , *tnf- α* e *il-10* nos peixes submetidos à DHC.

6. Avaliar a expressão gênica de citocinas inflamatórias no tecido hepático.

Houve aumento na expressão genica de *il-1 β* e diminuição na expressão genica de *il-10* nos animais obesos. A expressão genica de *tnf- α* não apresentou diferença entre os grupos.

Em resumo, a partir desse estudo foi possível desenvolver um novo modelo de obesidade em *zebrafish* adulto. As alterações observadas nesse modelo em relação às citocinas inflamatórias hepáticas e intestinais associadas a esteatose hepática e as modificações nas *tight junction* parecem exercer um aumento na permeabilidade intestinal. Novos achados a respeito

de inflamação e permeabilidade intestinal em *zebrafish* adultos e obesos foram observados neste estudo. Até o presente momento não observamos na literatura qualquer referência à expressão gênica de citocinas inflamatórias hepáticas e intestinais associadas à permeabilidade intestinal aumentada como no modelo estudado na presente tese. Acreditamos que este estudo tem potencial para explorar as relações entre a dieta hipercalórica e os seus mecanismos patogênicos que contribuem à obesidade.

ANEXOS

ANEXO C – APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 150065

Data da Versão do Projeto: 16/06/2015

Pesquisadores:

THEMIS REVERBEL DA SILVEIRA

ODONE FELIPE PIPPI DA ROSA

RAQUEL AYRES

CAROLINA URIBE CRUZ


JÉSSICA TONIN FERRARI

Título: Mediadores anti e pro-inflamatórios em um modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica em Zebrafish (Danio rerio)

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 14 de julho de 2015.


Biol. Michael Everton Andrades
Coordenador CEUA/HCPA