



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

**Avaliação da Expressão Gênica de *Tight Junctions* Intestinais em
Modelos Experimentais de Esteatose Hepática Alcoólica e não Alcoólica
em *Zebrafish* (*Danio rerio*)**

CAROLINA BORTOLIN BESKOW

Orientadora: Dra. Valesca Dall'Alba
Co-Orientadora: Dra. Carolina Uribe-Cruz

Dissertação apresentada a Universidade Federal
do Rio Grande do Sul como requisito para
obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2017

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

**Avaliação da Expressão Gênica de *Tight Junctions* Intestinais em
Modelos Experimentais de Esteatose Hepática Alcoólica e não Alcoólica
em *Zebrafish* (*Danio rerio*)**

CAROLINA BORTOLIN BESKOW

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, Brasil

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Beskow, Carolina Bortolin
Avaliação da Expressão Gênica de Tight Junctions
Intestinais em Modelos Experimentais de Esteatose
Hepática Alcoólica e não Alcoólica em Zebrafish (Danio
rerio) / Carolina Bortolin Beskow. -- 2017.
85 f.
Orientador: Valesca Dall'Alba.

Coorientador: Carolina Uribe-Cruz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Esteatose hepática. 2. Tight Junctions. 3.
Etanol. 4. Frutose. 5. Zebrafish. I. Dall'Alba,
Valesca, orient. II. Uribe-Cruz, Carolina,
coorient. III. Título.

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a família maravilhosa que tenho e que sempre me apoiou em todos os projetos que decidi realizar.

Ao meu pai que me estimulou na prática da leitura, me ensinou a arte de administrar e sempre fez questão de valorizar os diplomas expostos na sua parede, com todo o aprendizado e conhecimento que eles simbolizam.

À minha mãe que trouxe para a mesa todos os conhecimentos que cultivava na sua horta e me inspirou a buscar na pesquisa a base científica para os hábitos que aprendi em casa e compartilhá-los com pacientes, alunos e amigos.

Ao meu irmão, que com as habilidades práticas de um engenheiro, sempre facilitou a minha vida, trazendo soluções para os problemas cotidianos.

À minha orientadora de vida, Gutti Fraga, por todos esses anos de muito aprendizado, carinho e amor.

Aos amigos, família que Deus me deu a oportunidade de escolher, que me acompanham de perto, me apoiam e compartilham os bons e maus momentos.

Obrigada por estarem sempre presentes!

E por fim, agradeço a uma força que existe dentro de mim, que não permite que eu esmoreça diante das dificuldades e me entusiasma frente a novas oportunidades, a qual eu chamo de Deus!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Valesca Dall'Alba pela oportunidade de ser sua aluna, por todo o tempo dispendido com orientação, apoio e estímulo. Por ter sido além de orientadora, parceira e amiga durante todo esse processo. Muito obrigada!

Agradeço de coração a toda a equipe do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia do Hospital de Clínicas, cuja parceria, carinho e competência foram essenciais para a realização deste trabalho.

Obrigada queridas colegas Amanda Pasqualotto, Larisse Longo, Jéssica Ferrari e Raquel Ayres, pelo apoio, pelas risadas e por algumas lágrimas compartilhadas ao longo destes anos.

E ao meu querido bolsista de iniciação científica Gabriel Guerreiro pela parceria, trabalho e dedicação em todas as tarefas que lhe eram atribuídas.

A minha co-orientadora Carolina Uribe-Cruz, que me introduziu na área da pesquisa experimental, por estar sempre disponível e trabalhar ao meu lado, compartilhando todo o conhecimento que possuía.

Aos colaboradores Dra. Themis Reverbel da Silveira e Dr. Mário Reis Alvares-da-Silva cuja participação foi fundamental para a construção deste trabalho.

Às colegas Ana Cláudia Schneider e Thais Ortiz Hammes, que me auxiliaram desde o principio, e que hoje ainda irão contribuir como banca. Agradeço também a professora Dvora Joveleviths, que compartilha seus conhecimentos desde as aulas do programa, e a Ana Helena da Rosa Paz por aceitarem fazer parte da banca.

A minha grande amiga Elis Pedrollo, que vislumbrou afinidade e me apresentou a minha orientadora, possibilitando a realização de mais um projeto de vida.

E a todos os envolvidos, que são muitos, que de alguma forma ajudaram a concretizar este estudo, e cuja lista seria enorme. Sempre fui muito bem acolhida no Hospital de Clínicas por todos os profissionais que auxiliaram na construção do meu trabalho, nas mais diversas áreas.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Doença Hepática Alcólica – DHA	16
2.1.1 <i>Definição, etiologia e epidemiologia</i>	16
2.1.2 <i>Patogênese</i>	18
2.1.3 <i>Opções de Tratamento</i>	19
2.2 Doença Hepática Gordurosa Não-Alcólica – DHGNA.....	21
2.2.1 <i>Definição, etiologia e epidemiologia</i>	21
2.2.2 <i>Patogênese</i>	22
2.2.3 <i>Opções de tratamento</i>	23
2.3 O Zebrafish como Modelo Experimental.....	25
2.3.1 <i>Modelo de Etanol em Zebrafish</i>	29
2.3.2 <i>Modelo de Frutose em Zebrafish</i>	30
2.4 Permeabilidade Intestinal	31
2.4.1 <i>Definições</i>	31
2.4.2 <i>Estrutura do Epitélio Intestinal</i>	32
2.4.3 <i>Tight Junctions</i>	34
2.4.3.1 <i>Claudinas</i>	35
2.4.3.2 <i>Molécula de Adesão Juncional - JAM</i>	36
2.5 Eixo entero-hepático	39
2.6 Agentes moduladores da permeabilidade	42

2.7	Métodos de avaliação da permeabilidade intestinal	48
3.	JUSTIFICATIVA.....	52
4.	QUESTÃO DE PESQUISA	53
5.	HIPOTESE	54
5.1	Hipótese verdadeira	54
5.2	Hipótese nula.....	54
6.	OBJETIVO GERAL.....	55
7.	ARTIGO.....	56
8.	CONCLUSÃO.....	73
9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	74
10.	REFERÊNCIAS.....	75

RESUMO

Introdução: A doença hepática alcóolica (DHA) e a doença hepática gordurosa não alcóolica (DHGNA) estão entre as principais causas de morte por doenças hepáticas no mundo. Apesar das etiologias distintas, sendo a DHA causada pelo consumo excessivo de álcool e a DHGNA por dieta inadequada e sedentarismo, apresentam curso de doença semelhante, que pode evoluir de esteatose, para esteato-hepatite, fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. Tanto a DHA quanto a DHGNA estão relacionadas à disbiose, aumento de permeabilidade intestinal, inflamação e dano hepático. Entretanto, ainda não está claro se a doença hepática precede as alterações no epitélio intestinal ou se é o aumento da permeabilidade que promove o dano hepático. **Objetivo:** Avaliar a expressão gênica de *Tight Junctions* em modelo de DHA e DHGNA em *zebrafish* (*Danio rerio*). **Métodos:** No modelo de DHA, os peixes foram divididos em dois grupos: Etanol ($n=30$), expostos a 0,5% de etanol por 28 dias e controle ($n=30$). No modelo de DHGNA, os peixes foram divididos também em dois grupos: Frutose ($n=24$), expostos à frutose 6% durante 2 horas por 14 dias e controle ($n=24$). Ao término dos experimentos os animais foram eutanasiados e coletados fígados, para avaliação histológica por coloração hematoxilina-eosina (HE) e de esteatose por *Oil Red*, e intestinos para avaliação da expressão gênica dos marcadores de permeabilidade intestinal *cln1C*, *cln15a*, *cln15b* e *f11r* por Real Time qPcr. **Resultados:** Tanto os animais expostos ao álcool quanto à frutose apresentaram esteatose hepática por coloração HE e *Oil Red* quando comparados aos seus respectivos controles, sem sinais de infiltrados inflamatórios e de fibrose hepática à microscopia óptica. Não houve diferença significativa na expressão gênica das *tight junctions* intestinais, tanto para a DHA quanto DHGNA ($p > 0,05$). **Conclusão:** Os resultados sugerem que em estágios iniciais de DHA e DHGNA não ocorre alteração da permeabilidade intestinal, e que possivelmente o dano hepático precede o dano intestinal.

Palavras-chaves: Esteatose hepática, *Tight Junctions*, Etanol, Frutose, *Zebrafish*.

ABSTRACT

Introduction: Alcoholic liver disease (ALD) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) are among the leading causes of death from liver disease worldwide. Despite the different etiologies, ALD is caused by excessive alcohol consumption and NAFLD is due to inadequate diet and sedentary lifestyle, they have a similar disease course, which can progress from steatosis to steatohepatitis, fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Both ALD and NAFLD are related to dysbiosis, increased gut permeability, inflammation, and liver damage. However, it is not yet clear whether liver disease precedes changes in the intestinal epithelium or whether it is the increased permeability that promotes liver damage. **Objective:** To evaluate the gene expression of tight junctions in ALD and NAFLD models in zebrafish (*Danio rerio*). **Methods:** In the ALD model, fish were divided into two groups: Ethanol (n=30), exposed to 0.5% ethanol for 28 days and control (n=30). In the NAFLD model, fish were also divided into two groups: Fructose (n=24), exposed to 6% fructose for 2 hours for 14 days and control (n=24). At the end of the experiments the animals were euthanized and livers were collected for histological evaluation by hematoxylin-eosin (HE) staining and steatosis by oil red staining and intestines for evaluation of the gene expression of gut permeability markers *cldnC*, *cldn15a*, *cldn15b* and *f11r* by Real Time qPcr. **Results:** Both animals exposed to alcohol and fructose presented hepatic steatosis by HE and Oil Red staining when compared to their respective controls, without signs of inflammatory infiltrates under optical microscopy. There was no significant difference in the gene expression of the tight junctions for both ALD and NAFLD ($p > 0.05$). **Conclusion:** The results suggest that in the early stages of ALD and NAFLD there are no changes in intestinal tight junctions, and that possibly liver damage precedes intestinal damage.

Key words: Hepatic steatosis, Tight Junctions, Ethanol, Fructose, Zebrafish.

LISTA DE ABREVIATURAS

AASLD	<i>American Association for the Study of Liver Diseases</i>
ALD	Álcool desidrogenase
ALDH	Aldeído desidrogenase
ALT	Alanina aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
Bves	<i>Blood vessel epicardial substance</i>
CAR	<i>Coxsackievirus and Adenovirus receptor</i>
CLDN	<i>Claudin gene family</i>
CMA	Carboximetilcelulose
Crb3	<i>Crumbs protein homolog 3</i>
CTX	Cefotaxime
CYP2E1	Citocromo P 450 2E1
DHA	Doença Hepática Alcólica
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcólica
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dpf	Dias pós-fertilização
EASL	<i>European Association for the Study of the Liver</i>
EHNA	Esteatohepatite não alcólica
EndoCAb	Anticorpos de núcleo de endotoxina circulante
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOS	Fruto-oligossacarídeo
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HFCS	<i>High fructose corn syrup</i>
IgA	Imunoglobulina A
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-17	Interleucina 17
IPEC-J2	<i>Porcine intestinal epithelial cell line</i>
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
JAM	<i>Junction adhesion molecule</i>
JNK	<i>c-Jun N terminal Kinase</i>
LPS	Lipopolissacarídeos

MDA	Malondialdeído
MTZ	Metronidazol
NAD	Dinucleotídeo adenina nicotinamida
NADH	Dinucleotídeo adenina nicotinamida reduzida
NFκB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
P80	Polissorbato-80
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PPAR-α	<i>Peroxisomo proliferator-activated receptor-alpha</i>
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RI	Resistencia à insulina
SIBO	<i>Small intestinal bacterial overgrowth</i>
SREBP1	<i>Sterol regulatory element binding protein-1</i>
TAMP	<i>Tight junction-associated MARVEL proteins</i>
TEER	Resistência elétrica transepitelial
TJ	<i>Tight Junction</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
VAN	Vancomicina
ZO	Zona de oclusão

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	<i>Zebrafish</i>	25
FIGURA 2	Anatomia e arquitetura celular do fígado do <i>zebrafish</i>	28
FIGURA 3	Epitélio intestinal em homeostase	33
FIGURA 4	Via de difusão paracelular e arquitetura das <i>Tight Junctions</i> ...	38
FIGURA 5	Efeito da microbiota intestinal na doença hepática alcóolica ...	40
FIGURA 6	Efeitos da frutose sobre a barreira intestinal e fígado.....	42
FIGURA 7	Disfunções da barreira intestinal	51

1. INTRODUÇÃO

A doença hepática alcóolica (DHA) e a doença hepática gordurosa não-alcóolica (DHGNA) estão entre as causas líderes de mortalidade por doenças do fígado¹. A Organização Mundial de Saúde estima que o consumo excessivo de álcool seja responsável por 5,1% da carga global de doenças e cerca de 5,9% de todas as mortes no mundo², além disso é a principal causa de internações por problemas hepáticos³. Já a DHGNA tem sido reconhecida como uma condição altamente prevalente nos últimos 20 anos⁴, estimada em torno de 20-30% nos países ocidentais, cuja incidência tem aumentado em conjunto com as suas condições clínicas associadas: obesidade, resistência à insulina (RI), síndrome metabólica e diabetes⁵.

Apesar de apresentarem curso de doença semelhante, caracterizado pela presença de esteatose em pelo menos 5% dos hepatócitos, podendo evoluir para esteato-hepatite, fibrose, cirrose e até carcinoma-hepatocelular^{6,7}, são causadas por fatores distintos. Na DHA, a acumulação de lipídios intra-hepáticos é consequência do consumo crônico de etanol entre 40-80g/dia para homens, e 20-40g/dia para mulheres⁸. Por outro lado, na DHGNA há uma forte associação com o estilo de vida ocidental, caracterizado por sedentarismo e dieta inadequada, com elevado consumo de alimentos industrializados, altamente processados, fontes de gordura de baixa qualidade, carboidratos simples e de rápida absorção, além do consumo excessivo de frutose e teor reduzido de fibras e micronutrientes essenciais^{6 9}.

Tanto o álcool quanto os fatores relacionados à dieta podem promover modificações no epitélio intestinal, alterando a sua função de barreira e provocando aumento de permeabilidade. A barreira do epitélio intestinal preservada permite a absorção de nutrientes da dieta e previne a passagem de patógenos e toxinas na circulação sistêmica¹⁰, sendo que crescentes evidências têm demonstrado que o seu correto funcionamento é crucial para garantir a saúde.¹¹ O intestino e o fígado estão

intimamente ligados por meio da circulação êntero-hepática, onde o fígado está continuamente exposto a produtos tóxicos e não tóxicos advindos do intestino e vice-versa^{1,4}.

A integridade do epitélio intestinal é determinada principalmente pelas *Tight Junctions* (TJ), um complexo de proteínas altamente dinâmico, seletivamente permeável, que se forma dentro de domínios lipídicos da membrana plasmática¹². As *Tight junctions* são divididas em dois grupos principais: proteínas de único domínio transmembrana, como as *JAM* (*junctional adhesion molecule*) e proteínas de quatro domínios transmembranas como as claudinas. Estas últimas constituem a maior parte da complexa arquitetura das *Tight Junctions* e exercem papel determinante na permeabilidade das células endoteliais e epiteliais^{13,14}.

O comprometimento da função intestinal está associado a um conjunto de condições clínicas, tanto gastrointestinais quanto sistêmicas, como doença inflamatória intestinal (DII), síndrome do intestino irritável, diabetes¹², além das doenças hepáticas^{15,16}. No entanto, não está claro se o aumento da permeabilidade intestinal é causa ou consequência da doença hepática, e neste último caso, em que estágio da doença ela ocorre. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi verificar se ocorre alteração na expressão das *Tight Junctions* *clnC*, *cln15a*, *cln15b* e *f11r*, indicando dano intestinal, em dois modelos experimentais de esteatose hepática em *zebrafish*: induzida por álcool (DHA) e por frutose (DHGNA).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doença Hepática Alcólica – DHA

2.1.1 Definição, etiologia e epidemiologia

A doença hepática atribuída ao álcool é a maior causa de morbidade e mortalidade no mundo^{1,16,17}, que afeta uma parcela considerável da população, causando graves problemas sociais, econômicos e de saúde¹⁸. A doença hepática alcólica é caracterizada pela acumulação de lipídios intra-hepáticos, sendo a esteatose consequência do consumo crônico de etanol acima de 40-80g/dia para homens, e 20-40g/dia para mulheres⁸.

A acumulação de lipídeos nas células parenquimatosas do fígado geralmente é a primeira manifestação da doença hepática alcoólica e se desenvolve em cerca de 90% a 95% das pessoas que consomem grandes quantidades de álcool^{19,20}, podendo acometer indivíduos com consumo menor^{8,19,20}. O álcool também afeta o intestino, aumenta a permeabilidade intestinal e altera o microbioma bacteriano²¹.

A probabilidade de desenvolver doença hepática ou cirrose progressiva induzida pelo álcool não é completamente dependente da dose, pois acomete apenas um pequeno grupo de pacientes. Apesar da quantidade total ingerida de álcool ser o principal fator de risco, existem outros fatores determinantes no desenvolvimento, progressão e severidade da DHA: consumir álcool longe das refeições principais aumenta o risco de DHA em 2,7 vezes quando comparado ao consumo de álcool junto às refeições²²; mulheres são mais sensíveis ao consumo de álcool, e podem desenvolver DHA mais severa que os homens, com menores doses²³; deficiências de micronutrientes como vitamina A e E, podem agravar a doença²⁴. Além dos fatores ambientais, fatores genéticos podem predispor ao desenvolvimento da DHA, assim como polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo do álcool (incluindo as

enzimas álcool desidrogenase – ALD, acetaldeído desidrogenase – ALDH e o sistema citocromo P450), além da regulação de endotoxinas mediadas por citocinas¹⁹.

A verdadeira prevalência da DHA é de difícil estimativa²⁵. Em linhas gerais, o álcool causa 38 óbitos por 100.000 homens e 28 mortes por 100.000 mulheres por ano na Europa devido à cirrose hepática, hepatite alcoólica, lesões ou câncer atribuíveis ao consumo de álcool²⁶. Em consonância com estes dados, o álcool é a causa mais comum de cirrose hepática na Europa²⁷. No mundo todo, de cada 100 mortes, o álcool causa 5,9 óbitos (7,6 óbitos por 100 mortes em homens e 4 mortes por 100 mortes em mulheres)².

Cerca de 10% a 40% das pessoas com esteatose hepática desenvolvem fibrose^{19,20}. Um quinto das pessoas que desenvolvem fibrose também desenvolvem cirrose alcoólica hepática ou fibrose avançada²⁰. Cerca de 10% a 35% das pessoas que consomem grandes quantidades de álcool também podem desenvolver hepatite alcoólica²⁰. A hepatite alcoólica é caracterizada por necrose e inflamação do parênquima hepático²⁰, e clinicamente apresenta icterícia e insuficiência hepática que geralmente ocorrem após várias décadas de consumo de grandes quantidades de álcool²⁸. Cerca de 30% das pessoas com hepatite alcoólica morrem dentro de três meses de internação hospitalar²⁹. O progresso de hepatite para cirrose acomete em torno de 18% dos alcoolistas, sendo que uma proporção significativa de pessoas pode desenvolver cirrose alcoólica sem desenvolver hepatite alcoólica¹⁹.

Em linhas gerais, podemos afirmar que a cirrose se desenvolve em apenas uma pequena proporção de consumidores de álcool em excesso, sendo a hepatite alcoólica a forma que mais acomete esse grupo da população, e a forma mais tratável da doença hepática alcoólica. No entanto, cerca de 40% dos pacientes com hepatite alcoólica grave morrem dentro dos 6 meses iniciais da manifestação clínica, e por isto o diagnóstico e tratamento adequados são essenciais²⁸. Nos casos de cirrose, enquanto a sobrevivência na fase compensada pode ser superior a 10 anos, na fase

descompensada é inferior a dois anos²⁹. O único tratamento definitivo para a cirrose hepática descompensada é o transplante de fígado, sendo a cirrose alcoólica a segunda causa mais comum de transplante hepático nos Estados Unidos da América²⁵. Além de melhorar a qualidade de vida destes pacientes³⁰, o transplante hepático aumenta a sobrevida em torno de 10 anos^{31,32}.

2.1.2 Patogênese

O fígado é o principal órgão envolvido no metabolismo do álcool¹⁸. O álcool é metabolizado no fígado por três vias: pela enzima álcool desidrogenase (ALD), pelo citocromo P-450E1 (CYP2E1) e via catalase mitocondrial. Ambas as enzimas convertem álcool em acetaldeído, que em parte também é responsável pela injúria do fígado. Entretanto, este processo é bastante complexo, e resulta da interação das desordens bioquímicas, genéticas, celulares, imunológicas e humorais com a ingestão e metabolismo de quantidades excessivas de álcool¹⁸. O estresse oxidativo desempenha o maior papel neste processo, principalmente via CYP2E1, que ocorre simultaneamente com a depleção de antioxidantes nos hepatócitos e por último, pelo acetaldeído sozinho ou em conjunto com o balanço de citocinas alteradas pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)³³. Alterações no metabolismo lipídico e tecido adiposo também aumentam o processo de injúria hepática³⁴. Todas estas alterações promovem danos às membranas e organelas celulares, principalmente às mitocôndrias¹⁸. Os mecanismos de dano hepático com ingestão excessiva de álcool são similares às alterações observadas na esteatohepatite não alcoólica, exceto pela causa primária de dano ser diferente³⁵.

O álcool e seus metabólitos, como o acetaldeído, também podem causar supercrescimento de bactérias no intestino delgado (SIBO) e disbiose da microbiota intestinal, levando a um aumento da permeabilidade intestinal e translocação de endotoxinas do intestino para o fígado. Endotoxinas são os principais componentes da parede celular de bactérias gram-negativas. Células de Kuffer e recrutamento de

macrófagos no fígado são ativados via endotoxinas bacterianas (LPS) através do *Toll-like receptor 4* (TLR4), e são responsáveis pela eliminação de endotoxinas derivadas da microbiota intestinal, e indução do TNF- α , interleucinas (IL)-6, IL-8 e IL-17, acarretando aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e hepatotoxicidade induzida por álcool^{33,36}. As células de Kuffer parecem ser um elemento central na patogênese da DHA³⁷. A ingestão de álcool pode gerar peroxidação lipídica acompanhada de EROS que podem levar a alterações de muitas proteínas e enzimas envolvidas na resposta imune adaptativa^{38,39}. Assim, indivíduos com DHA tendem a ter níveis séricos elevados de anticorpos contra subprodutos da peroxidação lipídica, tais como o malondialdeído (MDA), e aumento da expressão dos linfócitos B e T no fígado, contribuindo para a ativação do sistema imune adaptativo^{39,40}.

2.1.3 Opções de Tratamento

É preconizada a abstinência total de álcool, antes de ser considerado qualquer tratamento para a doença, e a abstinência pode proporcionar melhora nos sintomas clínicos e inclusive regressão parcial de estágios avançados da doença, como a cirrose⁴¹.

Já foram testados tratamentos com silimarina (*Silybum marianum*), fosfolípidos essenciais e vitaminas, desde que a via de estresse oxidativo foi implicada na fisiopatologia da doença. No entanto, não há trabalhos conclusivos que demonstrem melhoras com utilização de medicamentos antioxidantes em termo de sobrevivência e melhora clínica no tratamento da DHA. No momento, entre os agentes farmacológicos utilizados estão os corticoides, recomendados nos *Guidelines* da AASLD (*American Association for the Study of Liver Diseases*) e EASL (*European Association for the Study of the Liver*), para tratamento das formas severas de hepatite alcóolica. Entretanto, apesar dos efeitos positivos do tratamento, a mortalidade após o início do tratamento permanece em torno de 30-40%⁴². Alguns ensaios clínicos randomizados têm demonstrado um melhor risco/benefício na utilização da Pentoxifilina em

substituição aos esteroides, sugerindo que esta poderia ser tratamento de primeira linha para pacientes com severa hepatite alcóolica⁴³.

Em geral, a suplementação com vitaminas, ácido fólico e tiamina, parece ser valiosa, no entanto, os dados na literatura são limitados¹⁸. Adequações dietéticas quanto a ajustes na ingestão energética e suporte proteico adequado são importantes, pois a desnutrição é o fator de pior prognóstico nas doenças hepáticas⁴⁴. A nutrição enteral, para pacientes desnutridos, tem sido considerada como alternativa de tratamento, apesar de alguns estudos se abstenham de confirmar efeitos favoráveis⁴⁵.

2.2 Doença Hepática Gordurosa Não-Alcólica – DHGNA

2.2.1 Definição, etiologia e epidemiologia

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcólica (DHGNA) é um importante problema de saúde pública associada ao aumento da incidência de obesidade^{6,9,46}. Mudanças nos hábitos alimentares e aumento do sedentarismo podem explicar o aumento da prevalência dessa doença hepática em níveis globais⁴⁶. Dissociada de outros fatores de risco, a DHGNA geralmente é uma condição benigna e atinge em torno de um terço da população americana¹⁶. Seu diagnóstico é realizado através de avaliação histológica ou por imagem que evidencie a presença de esteatose hepática, em indivíduo sem uso significativo de álcool ou outras causas conhecidas de doença hepática crônica⁴⁷.

A verdadeira taxa de incidência mundial de DHGNA não é conhecida. Variações no desenho dos estudos, métodos diagnósticos e a natureza assintomática da doença dificultam a obtenção da sua incidência em grande escala. O método diagnóstico padrão-ouro, a biópsia, devido ao seu caráter invasivo, torna provavelmente a verdadeira incidência e prevalência subdiagnosticada⁴⁶. Estima-se que a prevalência da DHGNA esteja em torno de 20 a 30% nos países ocidentais, aumentando ao longo dos últimos anos juntamente com suas condições clínicas associadas: obesidade, resistência à insulina, síndrome metabólica e diabetes⁵. Estudo brasileiro realizado em 2011 com 98 pacientes diabéticos encontrou prevalência de 78% de esteatohepatite não alcólica (EHNA) na biópsia hepática, correlacionada com hipertrigliceridemia, elevação da alanina aminotransferase (ALT) e baixa lipoproteína de alta densidade no soro (HDL)⁴⁸.

Os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da DHGNA, obesidade, resistência à insulina e dislipidemia, também são componentes da síndrome metabólica, cuja causa está vinculada às mudanças no padrão da dieta ao longo dos

anos, com aumento na ingestão calórica, principalmente de alimentos industrializados, altamente processados, fontes de gorduras de baixa qualidade, carboidratos simples e de rápida absorção, como a frutose⁹ e aos desequilíbrios entre o consumo e o dispêndio de energia. Dessa forma, a DHGNA tem sido identificada como a manifestação hepática desta síndrome⁴⁹.

2.2.2 Patogênese

A patogênese da DHGNA não está totalmente esclarecida⁶. A esteatose é caracterizada pela presença de gordura em pelo menos 5% dos hepatócitos, e cerca de 20 a 25% dos casos evoluem para EHNA. Destes pacientes, 20% irão desenvolver fibrose e subsequentemente cirrose⁵⁰. Os mecanismos de lesão hepática em DHGNA podem ser tidos como um “processo de múltiplos *hits*” que envolvem resistência à insulina, apoptose celular, estresse oxidativo, e perturbações nos níveis de adipocinas⁵¹.

O modelo de dois “*Hits*” foi proposto pela primeira vez em 1998 por Day *et al.* O primeiro “hit” reflete a acumulação de triglicerídeos e ácidos graxos livres nos hepatócitos como consequência da RI, maior influxo dietético e aumento da lipogênese hepática. O segundo “hit” envolve peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial e inflamação que resultam em danos aos hepatócitos e desenvolvimento de fibrose no fígado⁵².

Pacientes com DHGNA apresentam redução na sensibilidade à insulina tanto muscular quanto no tecido hepático e adiposo⁵³, o que desempenha um importante papel na patogênese desta doença⁶. Devido a RI, o tecido adiposo torna-se resistente ao efeito antilipolítico da insulina, o que provoca um aumento na entrega de ácidos graxos livres ao fígado, conduzindo a *Lipogênese De Novo*⁵⁴.

O acúmulo de lipídios nos hepatócitos prejudica a capacidade oxidativa mitocondrial, aumenta o estado reduzido dos complexos da cadeia de transporte de

elétrons e estimula as vias peroxissomais de oxidação lipídica. Isto gera um incremento nas EROS e derivados reativos de aldeídos o que causa estresse oxidativo e morte celular por meio do esgotamento de ATP (trifosfato de adenosina), NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e glutatona, além de danos ao DNA, lipídios e proteínas. O estresse oxidativo também desencadeia a produção de citocinas inflamatórias que causam inflamação e resposta fibrogênica⁵⁵.

A ativação da via pró-inflamatória é mediada por citocinas e receptores de reconhecimento padrão como *toll like receptors*, e desta via emergem duas principais vias de sinalização intracelular, conhecidas como NFκB (*nuclear factor kappa B*) e JNK (*c-Jun N terminal Kinase*)^{56 57}. A ativação de NFκB leva à EHNA devido ao aumento da transcrição de vários genes pró-inflamatórios, enquanto JNK causa RI via fosforilação e degradação do fator de substrato para insulina 1 (IRS-1), reduzindo a via de sinalização celular para regulação do receptor de insulina⁵⁶. A peroxidação lipídica pode promover a proliferação das células estreladas contribuindo para a fibrogênese⁵⁸, considerando que as EROS induzem a liberação de citocinas pelos hepatócitos que desencadeiam o início de vários mecanismos envolvendo mediadores imunológicos que contribuem para a lesão no fígado.

Por fim, a DHGNA é uma doença multifatorial, incluindo fatores genéticos, inflamatórios e ambientais que podem contribuir para a sua patogênese. Dentre os fatores ambientais, destaca-se a dieta, a qual exerce importante papel na modulação da microbiota intestinal. A disbiose pode contribuir de inúmeras formas para o desenvolvimento da EHNA, através da predisposição a obesidade, RI, alterando o metabolismo da colina, entre outros.

2.2.3 Opções de tratamento

Não há tratamento farmacológico específico preconizado para a DHGNA⁵⁹. Tendo em vista que a incidência de DHGNA está fortemente associada ao aumento da

prevalência de obesidade⁶, mudanças de estilo de vida que promovam perda de peso, tanto por dieta quanto por exercício físico, constitui a primeira opção de tratamento e pode contribuir para redução efetiva dos triglicerídeos intra-hepáticos. Entretanto, uma recente meta-análise mostrou que mais da metade desses pacientes não alcançaram a redução de peso desejada⁶⁰. A recomendação é que seja reduzido pelo menos 3 – 5% do peso corporal total, para melhora da esteatose, entretanto, pode ser necessária uma maior perda de peso – acima de 10%, para melhora de necroinflamação, através de dieta em conjunto com prática de atividade física⁴⁷.

Já as medidas farmacológicas são adotadas para tratar as complicações associadas à DHGNA, sendo empregadas drogas com alvos terapêuticos distintos, ou seja, que promovem a sensibilização à insulina, melhoram a dislipidemia, a inflamação e/ou estresse oxidativo^{47,60}.

É preconizada a utilização de Vitamina E (800UI/dia) como primeira escolha farmacológica para pacientes não-diabéticos com diagnóstico histológico de EHNA comprovado por biópsia⁴⁷, com monitoramento dos possíveis efeitos colaterais^{61 62}. Tanto a pioglitazona quanto a metformina não são preconizadas para o tratamento da EHNA, mas para melhorar a resistência à insulina^{47,62}. Estatinas também não são recomendadas especificamente para DHGNA, mas para tratar dislipidemia, e reduzir a frequência de disfunção cardiovascular nestes pacientes⁶².

2.3 O Zebrafish como Modelo Experimental

O zebrafish (*Danio rerio*) é um pequeno peixe teleósteo (3-4 cm) de água doce, pertencente à família *Cyprinidae*, muito utilizado como modelo experimental para estudo no desenvolvimento de doenças^{63,64}. Sua alta fecundidade e rápido desenvolvimento o tornam um modelo ideal para elucidar as bases moleculares de diversas doenças, inclusive das doenças hepáticas⁹. Seus órgãos e tecidos têm demonstrado semelhanças anatômicas, fisiológicas e moleculares com os de outros mamíferos, apresentando vantagens como modelo experimental, devido ao baixo custo de manutenção, a necessidade de espaço reduzido e a alta taxa de reprodução

65



Figura 1. Zebrafish (*Danio rerio*)

Assim como outros integrantes da família *Cyprinidae*, o zebrafish não apresenta estômago⁶⁶, sendo que seu trato digestivo é composto por boca, faringe, esôfago, intestino e ânus. O esôfago se diferencia em intestino, que consiste em um longo tubo, inicialmente largo que vai progressivamente estreitando no sentido rostro-caudal. O intestino preenche a cavidade abdominal e possui três divisões funcionais: anterior, média e posterior. A porção anterior, também conhecida como bulbo intestinal, é o maior e o principal local de digestão de proteínas e lipídeos. O bulbo, a porção média e o terço anterior caudal do intestino do zebrafish correspondem ao intestino delgado dos mamíferos, e a porção posterior corresponde ao intestino

grosso, terminando no ânus. A ausência de estômago, criptas intestinais, células de *Paneth* e glândulas submucosas moldaram o intestino do *zebrafish* como um órgão mais simples, mas único na biologia intestinal dos vertebrados⁶⁷.

Em comparação aos mamíferos, o *zebrafish* tem uma anatomia e arquitetura celular hepática singular, apesar da alta conservação dos tipos celulares no fígado. O fígado do *zebrafish* é organizado em 3 lóbulos contíguos (2 laterais e 1 ventral) e esses lobos não possuem o pedículo que separa os lobos distintos no fígado dos mamíferos. Em vez do sistema portal, os hepatócitos no fígado do peixe estão dispostos em túbulos, com ductos bilaterais que circulam entre 2 filas de hepatócitos⁶⁸⁻⁷¹ (Figura 2A e 2B). As membranas apicais enfrentam o interior do túbulo e os sinusoides seguem o lado basal dos hepatócitos (Figura 2B).

Embora a base celular das doenças do fígado pareça similar entre mamíferos e peixes, as diferenças no microambiente podem contribuir para as respostas específicas de cada espécie à lesão hepática. Com exceção das células de Kupffer (células imunes hepáticas), todos os outros tipos celulares encontrados no fígado de mamíferos foram identificados no *zebrafish*. Além disso, as células hepáticas do *zebrafish* parecem semelhantes às dos mamíferos e desempenham muitas funções idênticas às suas homólogas em mamíferos, incluindo secreção biliar, armazenamento de glicogênio e lipídios^{72,73}, capacidade de resposta à insulina, metabolismo de xenobióticos e amoníaco, secreção de proteínas séricas, como fatores de complemento e coagulação, transferrina e proteína semelhante à albumina⁷⁴.

Os peixes têm dois tipos de células biliares: pequenas células epiteliais biliares pré-parciais, que criam lúmens intracelulares para o transporte de bile dos hepatócitos e colangiócitos colunares maiores, que formam o sistema biliar intra-hepático completo^{68-70,75}. As células estreladas hepáticas foram descritas recentemente no *zebrafish* como os miofibroblastos que se tornam ativados e secretam a matriz

extracelular na lesão hepática⁷⁶. As células endoteliais alinham os vasos hepáticos, com sinusóides no lado basal dos hepatócitos⁷⁷. Além disso, foram desenvolvidos peixes transgênicos que expressam proteínas fluorescentes sob controle de promotores específicos que permitem a visualização de cada célula hepática em embriões vivos e larvas, sendo esta uma ferramenta única para visualizar o comportamento e o desenvolvimento das células hepáticas⁷¹.

É importante destacar que os mesmos princípios subjacentes que regem as variações no fenótipo e as respostas a fatores ambientais em seres humanos, incluindo polimorfismos genéticos e fatores epigenéticos, alteram a suscetibilidade à doença no *zebrafish*. Por exemplo, as variações na suscetibilidade do *zebrafish* à esteatose induzida pelo álcool ou lesão tóxica mediada por acetaminofeno são semelhantes às dos seres humanos^{78 79}.

Dessa forma, o *zebrafish* é similar aos humanos na composição celular hepática, função, sinalização e respostas aos danos assim como aos processos celulares que intermediam as doenças do fígado⁷¹. Os genes do *zebrafish* são altamente conservados em relação aos humanos, tornando-o um sistema útil para estudar os mecanismos básicos da doença hepática.

Zebrafish

Humanos

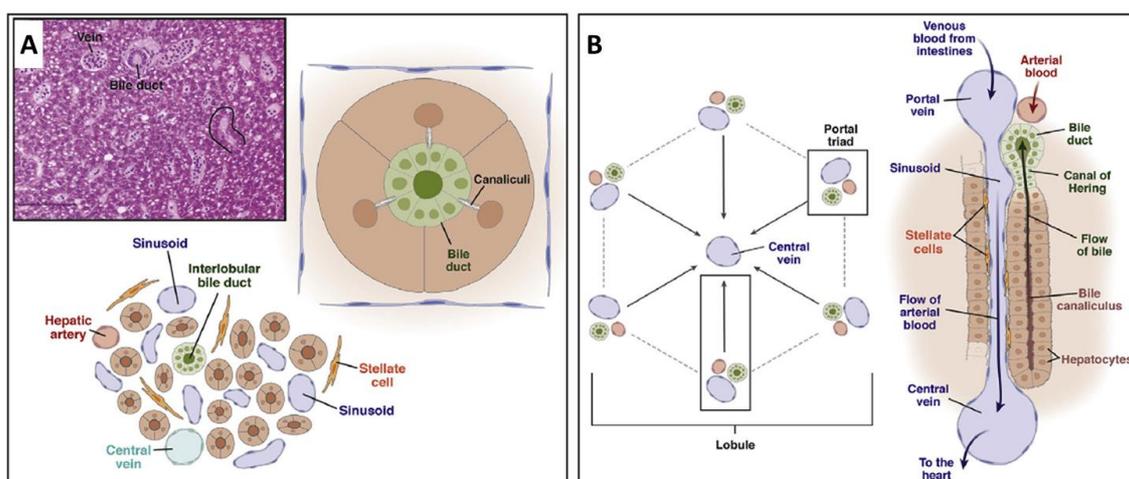


Figura 2. Anatomia e arquitetura celular do fígado do *zebrafish* (A) e de humanos (B). Consta uma seção histológica do fígado de *zebrafish* adulto corado com *hematoxilina-eosina* (HE). Fonte: Goessling e Sadler, 2015⁷¹.

Tanto em humanos quanto no *zebrafish*, a DHGNA é caracterizada por uma série de características comuns, incluindo a ampliação e o balonamento de hepatócitos, a acumulação de triglicerídeos, a disfunção da via secretora e ativação da resposta à proteína desdobrada (UPR) e o aumento das EROS. Embora o *zebrafish* tenha sido útil para estudar os fatores moleculares e celulares que causam EHNA, a interação entre hepatócitos e outros tipos de células, e a progressão para a esteatohepatite mais grave que envolve inflamação e fibrose, continuam a ser exploradas neste modelo. Será importante determinar se as características da esteatohepatite aparecem no *zebrafish* com esteatose hepática, e estudos futuros podem, assim, identificar os fatores modificadores que influenciam a progressão da esteatose para a esteatohepatite.⁷¹ Estudo recente demonstrou que o microbioma intestinal influencia o metabolismo de ácidos graxos⁸⁰ e seria interessante aprofundar a investigação sobre como o microbioma afeta a doença hepática usando este modelo.

Diversos modelos de esteatose hepática têm sido estabelecidos em *zebrafish*, como resposta ao metabolismo deficiente de metionina⁸¹, obesidade⁸², exposição a

moléculas hepatotóxicas como a tiocetamina⁸³ e o etanol^{64,84}, e exposição à frutose⁹. (Ferrari J - dados ainda não publicados).

2.3.1 Modelo de Etanol em Zebrafish

A exposição do *zebrafish* ao etanol foi descrita pela primeira vez em 1971 por Laale *et al* J exp zoo^{71,85}. Em 2009, foi publicado o modelo de DHA em *zebrafish* por Passeri *et al* 2009⁷⁸, onde a exposição de larvas de *zebrafish* ao etanol na concentração de 2% resultou em hepatomegalia, esteatose hepática e alterações na expressão de genes ligados ao metabolismo lipídico no fígado. Já em nosso laboratório, o modelo foi desenvolvido por Schneider *et al* 2014, 2016 e 2017^{64,84,86}, onde o *zebrafish* foi exposto ao etanol adicionado na diretamente na água do aquário na concentração de 0,5%, durante 28 dias, apresentado esteatose hepática e alterações em marcadores inflamatórios como TNF- α e IL-1 β .

Goessling e Sadler 2015⁷¹ ressaltam que a utilização de peixes adultos permite ao pesquisador a coleta de amostras séricas e de fígado maiores, sendo que os peixes apresentam esteatose hepática com baixas concentrações de etanol por períodos prolongados. No entanto, para indução de efeitos agudos do etanol, é mais viável a utilização de larvas, pois a exposição prolongada do *zebrafish* adulto acarreta desafios logísticos e limita o número de animais que podem ser manipulados de forma viável.

É importante destacar que o *zebrafish* é um modelo experimental interessante para estudar doenças hepáticas alcólicas, pois apresenta as vias de metabolização do álcool e sua exposição ao etanol é facilitada, pois este é simplesmente adicionado à água do aquário^{72,78}. Enquanto modelos experimentais em roedores (camundongos, ratos, hamsters), possuem como desvantagem sua aversão natural ao álcool⁸⁷, sendo necessário realizar técnicas como gavagem intragástrica ou administração

endovenosa, procedimentos mais invasivos, para possibilitar a exposição aguda ou contínua ao etanol⁸⁸.

2.3.2 *Modelo de Frutose em Zebrafish*

Sapp e colaboradores (2014)⁹ realizaram estudo experimental onde larvas de *zebrafish* expostas a 4% de frutose apresentaram acúmulo hepático de lipídeos, inflamação, estresse oxidativo, esteatohepatite e anormalidades do retículo endoplasmático em comparação às larvas tratadas com glicose. O modelo possui correlação com o desenvolvimento e progressão da DHGNA em humanos, que está associado ao aumento no consumo de frutose na dieta nos últimos anos⁸⁹. Em nosso laboratório, foi desenvolvido o modelo de DHGNA induzida por frutose, através da exposição contínua do *zebrafish* à frutose 6% durante duas horas diárias, pelo período de 14 dias (Ferrari, J – dados ainda não publicados).

2.4 Permeabilidade Intestinal

2.4.1 Definições

O epitélio intestinal possui funções cruciais na manutenção da saúde, seja pela sua propriedade de absorver fluidos e nutrientes, quanto de impedir que patógenos e toxinas rompam sua barreira, entrem na circulação sistêmica e causem danos ou até mesmo doenças 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 intestinal⁹⁰.

A *barreira intestinal* foi descrita por Cummings em 2004⁹¹ como “barreira da mucosa”, compreendendo uma complexa estrutura que separa o meio interno do lúmen intestinal. 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 muco⁹². Nas proximidades da barreira física, substâncias químicas também assumem a função de barreira: secreções digestivas, moléculas imunes, produtos celulares como citocinas, mediadores inflamatórios e peptídeos antimicrobianos, produzidos principalmente pelas células de Paneth nas criptas do intestino delgado⁹³. Apesar de a microbiota intestinal estar envolvida em processos metabólicos e modular a função de barreira, ela não faz parte da sua constituição. Assim, a barreira intestinal é um termo que foi estabelecido mais recentemente por gastroenterologistas, imunologistas e microbiologistas para enfatizar o componente protetor do intestino contra a invasão de microorganismos e suas toxinas⁹⁰.

Já a *permeabilidade intestinal* pode ser definida como uma característica mensurável da barreira intestinal⁹⁰, 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^{94,95}.

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 efetivas⁹⁶, que constituem uma complexa arquitetura celular, e interagem com os demais componentes do epitélio intestinal, formando uma barreira semipermeável.

2.4.2 *Estrutura do Epitélio Intestinal*

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 *tight junctions* (TJ) que regulam a passagem de íons aquosos e pequenas moléculas através da composição de claudinas e outras proteínas do complexo juncional⁹⁷⁻⁹⁹.

Abaixo das TJ estão as junções aderentes, que são importantes na sinalização celular e restauração epitelial, assim como os desmossomos que mantêm a estabilidade epitelial⁹⁰. Dessa forma, junções aderentes e desmossomos são responsáveis pela manutenção da proximidade entre células através de conexões moleculares intercelulares, enquanto as *tight junctions* são responsáveis pela selagem do espaço paracelular⁹⁶.

Os complexos TJ consistem em proteínas intramembranas, ocludinas e demais membros da família claudina que se ligam dentro do espaço paracelular. Ocludinas, claudinas e tricelulinas ligam células adjacentes ao citoesqueleto de actina através de proteínas andaimes citoplasmáticas como a zona de oclusão (ZO)⁹⁷.

As claudinas são proteínas integrais transmembranas, principal família das *tight junctions*, que constituem tanto a barreira paracelular quanto os poros^{13,14}.

Proteínas zona de oclusão (ZO-1, ZO-2 e ZO-3) são importantes proteínas TJ intracelulares, que atuam como um componente de ancoragem, ligando as células do citoesqueleto às proteínas *tight junctions* transmembrana⁹⁰.

Enquanto as ocludinas e as moléculas junções de adesão tem um papel regulatório, as claudinas são as principais proteínas responsáveis pela função de barreira intestinal, exercendo papel determinante na permeabilidade das células endoteliais e epiteliais^{13,14,90,100}.

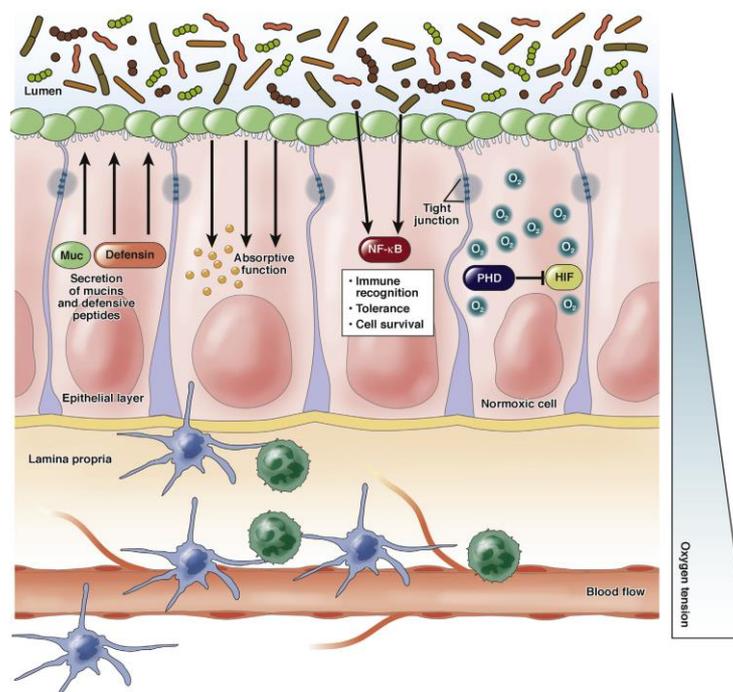


Figura 3. Epitélio intestinal em homeostase: o epitélio intestinal forma uma barreira que separa o lúmen da lâmina própria. As células epiteliais desempenham várias funções, como a produção de mucinas, defensinas e absorção de nutrientes. As *tight junctions* regulam

seletivamente a passagem de componentes do lúmen para o meio interno. Fonte: Manresa e Taylor, 2017⁹⁶.

2.4.3 *Tight Junctions*

Conforme mencionado anteriormente, as células epiteliais estão unidas umas as outras através de sua membrana lateral por um complexo de junções intercelulares¹⁰¹. A mais apical das junções intercelulares é a *tight junction* (TJ), sendo que suas duas principais funções são regular a passagem de solutos e água através das fendas paracelulares entre as células epiteliais e confinar proteínas de membrana da célula epitelial¹⁴.

Bioquimicamente, as *tight junctions* são compostas por um complexo de múltiplas proteínas que incluem proteínas transmembranas, de placa citoplasmática, de sinalização e adaptadoras que as ligam ao citoesqueleto de actina¹³.

As proteínas transmembranas das *tight junctions* podem pertencer a três grupos: de domínio único transmembrana, incluindo as JAM (*junction adhesion molecule*), Crb3 (*Crumbs protein homolog 3*), e CAR (*coxsackievirus and adenovirus receptor*); ao triplo domínio protéico transmembrana, Bves (*blood vessel epicardial substance*); e a quatro domínios protéicos transmembrana como as claudinas e TAMP (*tight junction* associada a proteínas família *MARVEL*), incluindo as ocludinas, *tricellulin*, e MarvelD3. Entre estes, a maioria das evidências sugerem que as claudinas são as principais determinantes da permeabilidade paracelular¹³.

Além de atuar como uma barreira seletivamente permeável entre compartimentos aquosos têm sido atribuídas às *Tight Junctions* epiteliais outras funções, como de fenda e cerca dentro da membrana da célula, restringindo mecanicamente a difusão de proteínas e lipídios no interior da bicamada lipídica¹⁰². Tal vedação garantiria que os componentes lipídicos e proteicos da membrana plasmática

permaneçam separados nos diferentes domínios: basal e apical, um pré-requisito para o transporte *trans* epitelial.

A estrutura e função do complexo *tight junction* nos peixes teleósteos parecem ser fundamentalmente semelhantes à estrutura e função do complexo TJ em outros grupos de vertebrados. Mais especificamente nos teleósteos, é geralmente aceito que as TJ atuam como uma barreira seletivamente permeável, que regulam o movimento de solutos e fluidos entre os compartimentos. Além disso, parece provável que as TJ tenham uma propriedade de “vedação”, embora os estudos não abordem isto especificamente¹⁴.

2.4.3.1 Claudinas

Um grande avanço na compreensão das *Tight Junctions* foi a descoberta das claudinas, que constituem a maior parte da complexa arquitetura das *Tight Junctions*¹⁴.

As claudinas são proteínas integrais transmembrana, que constituem tanto a barreira paracelular quanto os poros, exercendo papel determinante na permeabilidade das células endoteliais e epiteliais^{13,14}.

As claudinas estão expressas em todos os tecidos epiteliais conhecidos. Além disso, parece haver a expressão simultânea de múltiplas claudinas em todos os epitélios. Elas podem ser consideradas as principais proteínas responsáveis pela regulação da permeabilidade intestinal no *zebrafish*¹⁴.

Até o momento, foram relatados em torno de 63 genes que codificam as proteínas claudinas nas TJ em 16 espécies de teleósteos. Coletivamente, as claudinas são encontradas em uma ampla variedade de tecidos dos peixes teleósteos, mas genes selecionados exibem padrões de expressão restritos. Evidências atuais indicam que as claudinas desempenham um papel vital no desenvolvimento embrionário de peixes teleósteos e na fisiologia dos tecidos e órgãos até agora estudados¹⁴.

As claudinas nos peixes teleósteos recebem a mesma nomenclatura adotada para humanos (*cldn-1*, *cldn-7*). No entanto, quando determinada claudina não foi identificada em humanos, um sufixo é atribuído (*cldn-c*)¹⁴.

- **Claudina C**

Em embriões de *zebrafish*, a claudina C é expressa principalmente no estágio inicial do desenvolvimento do trato gastrointestinal e está envolvida na formação e espessamento da haste endodérmica entre os dias 1 e 2 pós-fertilização (dpf). À medida que o desenvolvimento intestinal prossegue, a claudina C persiste em todos os estágios de desenvolvimento: formação do lúmen intestinal, diferenciação, dobra epitelial e motilidade intestinal 5 dpf. Além disso, acredita-se que ela está envolvida na sinalização transmembrana durante a estratificação do epitélio intestinal¹⁰³. Nos estágios posteriores do desenvolvimento embrionário do intestino, como a formação do lúmen, a claudina 15 também parece estar envolvida¹⁰⁴.

- **Claudina 15**

A presença da Claudina 15 parece ser essencial na formação do lúmen intestinal do *zebrafish* durante seu desenvolvimento embrionário.

A Claudina 15 é expressa em todo o intestino e encontrada nas junções e vilosidades das criptas celulares nos peixes adultos. Pode comportar-se como um canal de Na ou Cl, dependendo do contexto celular^{105 106,107}.

2.4.3.2 Molécula de Adesão Juncional - JAM

As proteínas JAM desempenham uma importante função na formação e manutenção da adesão das *Tight Junctions* entre as células¹⁰⁸. Existem três tipos de JAM no genoma humano, cada um codificando um receptor de superfície celular tipo I com dois domínios de imunoglobulina, um único domínio transmembrana e uma região citoplasmática curta, terminando em uma ligação ao domínio PDZ c-terminal. Os membros da família são chamados JAM A (*f11r*), JAM B (JAM2) e JAM C (JAM3)¹⁰⁸.

Além do papel na inflamação, são propostas diversas ações dos membros da família JAM: angiogênese, câncer (cancro), desenvolvimento e motilidade do esperma¹⁰⁸ e a manutenção da bainha de mielina formada pelas células Schwann¹⁰⁹.

Em análise de biópsias de humanos, os níveis de proteína e transcrição de JAM-A foram significativamente menores na mucosa intestinal de pacientes com DHGNA do que nos pacientes sem a doença. A diminuição da expressão de JAM A correlacionou-se com o aumento da inflamação da mucosa nesses pacientes¹¹⁰.

Segundo Gunzel e Yu 2013¹³, apesar de haver um vasto campo de conhecimento a ser desbravado para que possamos compreender melhor o papel das claudinas de uma forma geral, já é conhecido o seu papel em diversas doenças. Mutações em genes claudinas estão envolvidas na origem de doenças hereditárias Mendelianas como a colangite esclerosante neonatal com icterícia, devido a mutações no gene claudina-1 (OMIM 607626)^{13,100}. Além disso, polimorfismos em genes claudinas têm sido associados com doenças poligenéticas, onde podemos citar a associação da claudina-1 com dermatite atópica¹¹¹, e claudina-14 com cálculos renais¹¹². Anormalidades adquiridas na expressão ou localização de claudinas podem desempenhar papéis importantes na doença clínica. Por exemplo, a desregulação da claudina-2 é consistente com a doença inflamatória intestinal em humanos^{113 114}, bem como em modelos animais¹¹⁵, e provavelmente contribui significativamente para o aumento permeabilidade intestinal de íons nesta doença, o que provoca diarreia de fluxo.

Apesar de ter sido descrita a presença de pelo menos 30 claudinas no trato gastrointestinal dos peixes teleósteos estudados até agora, apenas uma pequena fração delas foram examinadas até o momento. Considerando a importância e

complexidade do trato gastrointestinal do peixe do teleósteo, o papel das claudinas neste tecido será uma área de grande interesse para estudos futuros¹⁴.

Dessa forma, o contínuo aprofundamento no vasto campo de conhecimento das TJ, especialmente das claudinas em modelos experimentais no *zebrafish*, se torna relevante para investigar seu papel no desenvolvimento de diversas doenças, assim como a sua modulação poderá contribuir para o desenvolvimento de futuros tratamentos.

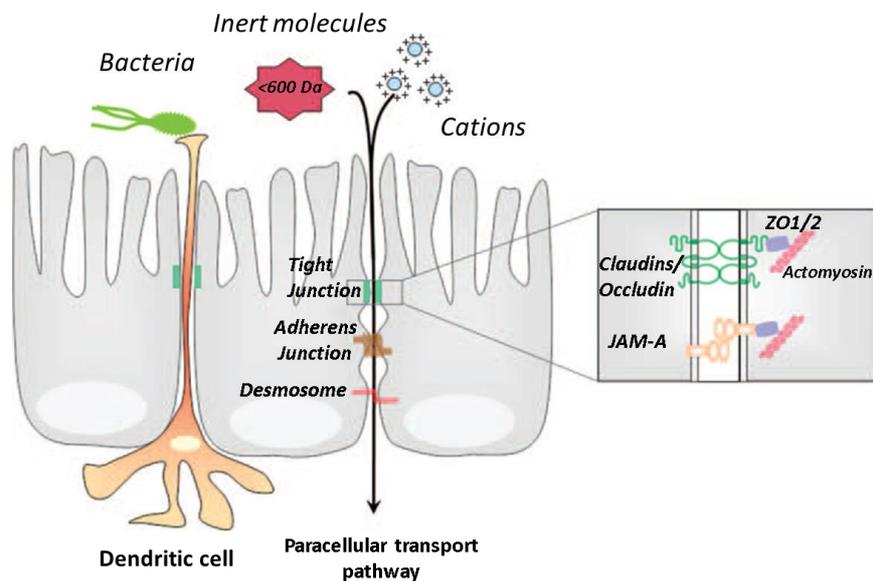


Figura 4. Via de difusão paracelular e arquitetura das *Tight Junctions* - TJ. As TJ atuam como barreiras seletivas para a passagem de moléculas e íons. São compostas pelas Claudinas, Ocludinas e JAM-A que são conectadas a rede de actina através da TJ zona de oclusão (ZO). Fonte: Menard S *et al*, 2010¹⁶.

2.5 Eixo entero-hepático

O intestino se comunica com o fígado através da circulação entero-hepática, via sistema porta. O fígado é o primeiro órgão exposto a exotoxinas derivadas do intestino, recebendo 70% do suprimento de sangue deste órgão¹¹⁷. Por este motivo, o fígado é a primeira defesa contra bactérias patogênicas oriundas do intestino, o que explicaria a relação entre influxo de endotoxinas e a progressão de doenças hepáticas¹¹⁸.

Os ácidos biliares, produzidos no fígado através da conjugação do colesterol com os aminoácidos glicina ou taurina, para secreção no intestino delgado, intermediam a comunicação entre fígado e intestino¹⁶. Entre as funções dos ácidos biliares, está a de inibir a proliferação bacteriana, modulando a expressão da célula hospedeira aos genes antimicrobianos. Dessa forma, a modificação microbiana pelos ácidos biliares é um importante mecanismo pelo qual a microbiota intestinal pode interagir com o hospedeiro e afetar não somente as doenças hepáticas, mas outros órgãos e vias metabólicas¹⁶. Segundo Mouzaki e Allard 2012, a microbiota patogênica é capaz de estimular a deposição lipídica no fígado, contribuindo para as doenças hepáticas como a DHGNA e EHNA¹¹⁸.

Uma característica proeminente no abuso do consumo de álcool é a ruptura da barreira intestinal. Modelos animais de DHA apresentam permeabilidade intestinal aumentada¹¹⁹, e pacientes demonstram comprometimento na função de barreira intestinal¹⁶. O álcool e acetaldeído, seu principal metabólito, podem romper a integridade das *tight junctions*, através da quebra da homeostase intestinal, por alterações na composição da microbiota, com aumento das bactérias patogênicas e redução nas bactérias comensais, redução na camada de muco e aumento da endotoxemia¹²⁰. Além disso, a síntese endógena de etanol pelo microbioma pode lesar as TJ¹²¹. A própria doença hepática induzida pelo álcool poderia reduzir a função de barreira intestinal, aumentando os níveis sistêmicos de IL-1 β ou TNF- α , que

causam ruptura das TJ⁹⁴. Não está claro até que ponto as alterações no fígado contribuem para alterações na mucosa do epitélio intestinal¹⁶.

Evidências sugerem que existem três possíveis mecanismos envolvidos na endotoxemia induzida pelo álcool: 1) disfunção das células de Kupffer, reduzindo a sua capacidade para detoxificar endotoxinas, 2) supercrescimento bacteriano no intestino levando a geração excessiva de endotoxinas e 3) ruptura da função de barreira intestinal e aumento da permeabilidade a endotoxinas e bactérias. A terceira possibilidade tem recebido crescente atenção nos últimos anos¹²⁰.

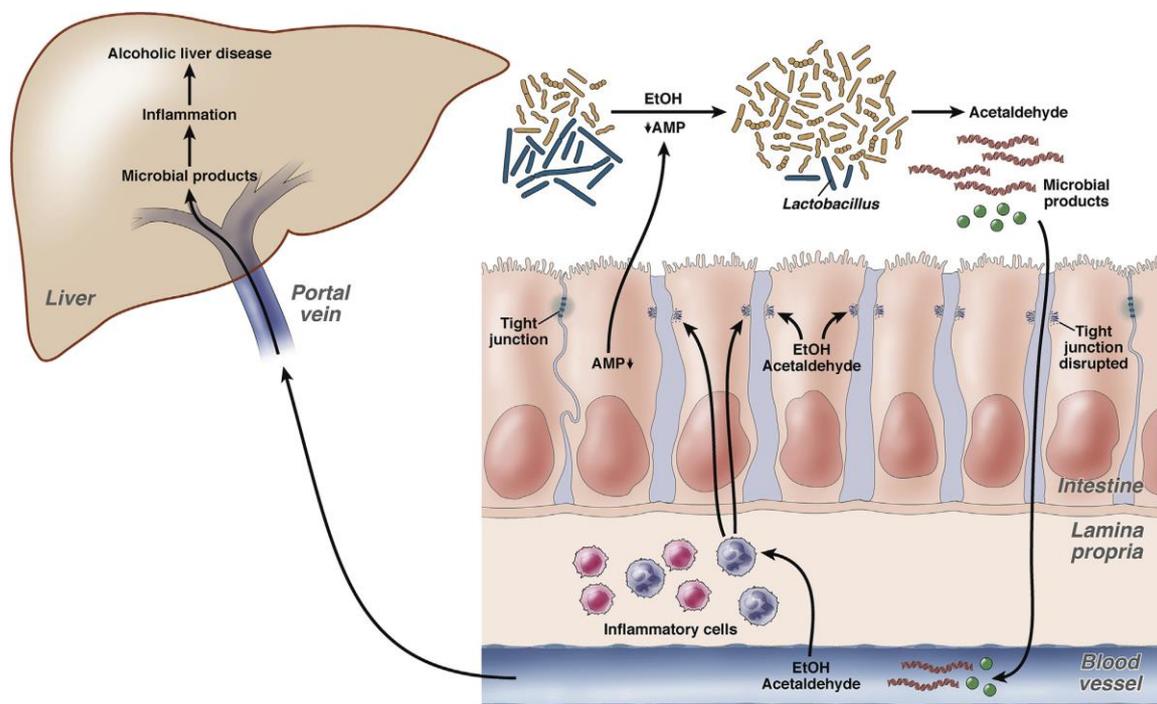


Figura 5. Efeito da microbiota intestinal na Doença Hepática Alcohólica: Tanto o etanol quanto o acetaldeído alteram a microbiota, promovendo direta ou indiretamente a ruptura das *tight junctions*, permitindo o acesso de produtos microbianos ao fígado, causando inflamação e doença hepática. Fonte: Schnabl e Brenner, 2014¹⁶.

Assim como o álcool, a ingestão crônica de frutose também está associada a prejuízos na função de barreira no epitélio intestinal, promovendo ruptura das TJ, aumento na translocação de endotoxinas e inflamação¹¹⁷.

A frutose pode ser responsável pela ativação de uma cascata inflamatória, através da indução de *toll-like receptors* (TLRs) no fígado. Os TLRs são ativados pelos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o LPS

(lipopolissacarídeos de membrana das bactérias gram negativas). O LPS se liga ao TLR4 induzindo o NFκB, resultando em uma expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α, IL-6 e IL-1β¹¹⁷. Especialmente as TJ ocludina e claudina-1 tem demonstrado declínio com o consumo de frutose¹²². Este processo causa inflamação da mucosa, ruptura da função de barreira do epitélio intestinal e aumento da translocação de endotoxinas¹¹⁰.

O supercrescimento bacteriano no intestino delgado é uma desordem em que um grande número de bactérias cresce no intestino delgado. Pacientes obesos ou com DHGNA tem uma alta prevalência de SIBO^{15,123}. Segundo o estudo de Miele e col. 2009, pacientes com DHGNA tem aumento significativo da permeabilidade intestinal e alterações nas TJ intestinais, quando comparados com indivíduos saudáveis. Neste estudo, o aumento da permeabilidade intestinal e o supercrescimento bacteriano são correlacionados com esteatose severa, mas não fibrose ou inflamação hepática, baseado em análises de biópsias hepáticas¹⁵. Dessa forma, Schnabl e Brenner 2014 reforçam a importância da barreira intestinal íntegra, para prevenir translocação de produtos microbianos, que podem contribuir para a progressão de DHGNA, EHNA, DHA, esteatohepatite alcóolica entre outras¹²⁴⁻¹²⁶.

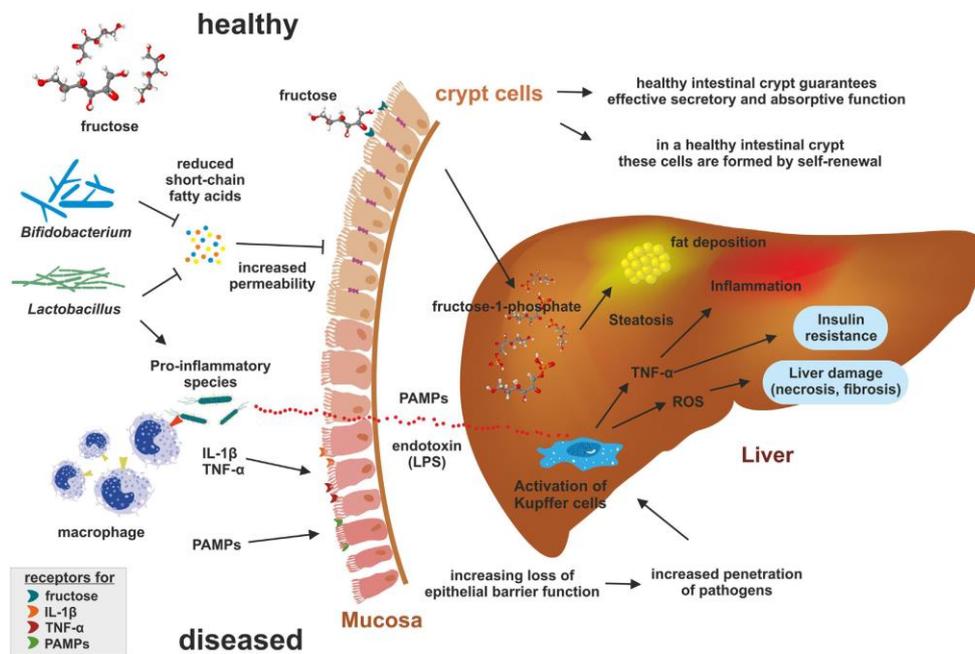


Figura 6: Efeitos da frutose sobre a barreira intestinal e fígado. Excesso de frutose altera microbiota, aumenta produção de endotoxinas pró-inflamatórias (LPS), reduz produção de ácidos graxos de cadeia curta, estimulando processo inflamatório e ruptura das *tight junctions*. Fonte: Lambertz *et al*, 2017¹¹⁷.

2.6 Agentes moduladores da permeabilidade

Alterações de permeabilidade intestinal se referem a danos na função de barreira do epitélio intestinal, que podem ser causadas por diversos fatores como o consumo excessivo de álcool^{36,37,127}, componentes da dieta ocidental como alimentos ricos em energia, gorduras e açúcares, especialmente a frutose^{128,129}, modificações na microbiota intestinal e alterações na camada de muco⁹⁰. A seguir, serão detalhados os principais fatores que contribuem para o aumento da permeabilidade intestinal:

Álcool

Pesquisas recentes têm sido capazes de detectar mudanças quantitativas e qualitativas no microbioma associadas à ingestão de álcool, sendo observado supercrescimento bacteriano em todo o trato gastrointestinal¹⁶. A disbiose é caracterizada por uma significativa redução na proporção de bactérias probióticas

como os *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus*¹³⁰. Estas alterações na composição do microbioma e um decréscimo nas bactérias probióticas comensais podem contribuir para a perda da barreira protetiva das TJ¹²¹.

Além disso, o etanol e seu metabólito derivado, o acetaldeído, produzido por bactérias intestinais, rompem a integridade das TJ^{120,131}. O microbioma intestinal também sintetiza etanol, que pode ter um efeito deletério adicional na barreira intestinal¹⁶.

Dieta Ocidental

Estudos populacionais em humanos têm atribuído à dieta atual os índices crescentes de obesidade e comorbidades associadas, enquanto os estudos experimentais em modelos animais têm evidenciado os mecanismos pelos quais este processo ocorre. A dieta ocidental é caracterizada pelo alto consumo de alimentos industrializados, altamente processados, ricos em gorduras e carboidratos simples, especialmente a frutose oriunda do xarope de milho (HFCS)^{46,132}. É bastante estudada em modelos animais, através da administração de uma alimentação composta por altas concentrações de carboidratos e gorduras, com ou sem adição de frutose. Os resultados destes estudos têm indicado altos níveis de endotoxemia e aumento da permeabilidade intestinal¹³³. A frutose, um monossacarídeo obtido originalmente das frutas, e atualmente muito utilizado pela indústria alimentícia na sua forma sintética, obtido a partir do xarope de milho, tem sido um dos componentes da dieta ocidental com alto poder atribuído de lesar a mucosa intestinal e causar danos ao organismo como um todo, o qual iremos dedicar um tópico detalhado.

Frutose

Estudos preliminares têm demonstrado o potencial da frutose como disruptor da barreira intestinal. De acordo com Volynets 2017¹²⁹, ratos que ingeriram água adicionada de frutose apresentaram aumento nas concentrações de endotoxemia no

sangue portal, independente de terem sido alimentados com uma dieta rica em açúcar e gordura (dieta ocidental) ou com uma dieta controle padrão. A dieta ocidental resultou em ganho de peso, mas não em translocação de endotoxinas, que ocorreu apenas com a alta ingestão de frutose. As concentrações de LPS também estavam aumentadas nos grupos que ingeriram frutose, tanto no grupo controle quanto no grupo dieta ocidental. No entanto, apenas os ratos alimentados com a dieta ocidental adicionada de frutose apresentaram aumento da permeabilidade intestinal pelos testes da lactulose & manitol e FITC-D4000. Em 2003 Busserolles¹³⁴ já havia relatado que o tratamento concomitante de ratos alimentados com frutose e pré e próbióticos eram protegidos dos danos ao fígado induzidos por frutose, cuja hipótese de injúria hepática, pelo menos em parte, se devia a mecanismos que envolvem supercrescimento bacteriano e aumento da permeabilidade intestinal, assim como de endotoxemia. No entanto, os mecanismos subjacentes sobre como frutose leva ao SIBO e aumento da permeabilidade intestinal ainda não foram totalmente elucidados¹²⁸.

Emulsificantes

Emulsificantes dietéticos como a carboximetilcelulose (CMA) e o polissorbato-80 (P80) são utilizados em alimentos industrializados, altamente processados em concentrações acima de 2%¹³⁵. Estudos experimentais têm demonstrado que estes aditivos alimentares induzem ganho de peso corporal, baixo nível de inflamação e distúrbios metabólicos, através de alterações da microbiota e disfunção da barreira intestinal¹³⁶. Estes estudos sugerem que a ampla utilização de agentes emulsificantes pode estar contribuindo para uma maior incidência de obesidade, síndrome metabólica e outras doenças inflamatórias crônicas^{135,136}.

Antibióticos

Está bem documentada a ação de antibióticos sobre a microbiota intestinal, que acarreta redução na quantidade e diversidade das bactérias comensais, além de promover danos à parede epitelial intestinal, aumentando a sua permeabilidade¹³⁷.

No estudo de Tulstrup 2015¹³⁷, a administração dos antibióticos amoxicilina, cefotaxime (CTX), vancomicina (VAN) e metronidazol (MTZ), em modelo experimental em ratos, alteraram tanto a composição bacteriana quanto provocaram alteração na barreira epitelial intestinal avaliada pelo teste FITC-dextrano, sendo que a CTX e VAN diminuíram e a MTZ aumentou a permeabilidade. Curiosamente, nenhuma alteração na família de *tight junctions* foi encontrada com o uso dos antibióticos.

Antiinflamatórios não-esteroidais

Os antiinflamatórios não esteroidais são largamente conhecidos por seus danos à parede do epitélio intestinal, causando aumento da permeabilidade. De acordo com Utzeri e Usai 2017¹³⁸, as alterações na microbiota causadas por esta classe de antiinflamatórios pode contribuir para o desenvolvimento de DHGNA, por duas vias: primeiro, causando danos ao funcionamento das *tight junctions*, que possuem um papel importante na permeabilidade intestinal e segundo, levando ao desenvolvimento de resistência a insulina, ganho de peso corporal, lipogênese, fibrogênese e estresse oxidativo hepático.

Vitaminas A e D

Tem sido demonstrado que a vitamina A e seus derivados regulam o crescimento e diferenciação de células intestinais, enquanto sua deficiência está associada com aumento da suscetibilidade a infecções tanto em humanos quanto em modelos animais^{90,139}. Estudo de coorte com crianças com altas taxas de deficiência subclínica de vitamina A demonstrou que a concentração de retinol é inversamente

correlacionada com permeabilidade intestinal¹⁴⁰. Já o retinol, uma forma da vitamina A, atenua parcialmente a redução na TEER induzida pela toxina A do *clostridium difficile* em células intestinais Caco-2¹⁴¹. Assim como a vitamina A, a deficiência de vitamina D parece ter um papel importante na permeabilidade intestinal⁹⁰. Experimentos com receptores de vitamina D em ratos demonstraram que a sua deficiência pode comprometer a barreira da mucosa, acarretando danos e aumentando o risco de doença inflamatória intestinal¹⁴². No mesmo estudo, foi verificado que a vitamina D melhora a expressão de TJ como a claudina-1 e ZO-1¹⁴².

Prebióticos

Os prebióticos são substâncias alimentares, constituídos principalmente por polissacarídeos não-amido e oligossacarídeos mal digeridos por enzimas humanas, que nutrem um grupo selecionado de microorganismos que vivem no intestino. Eles favorecem o crescimento de bactérias benéficas sobre as prejudiciais¹⁴³. Exemplos de prebióticos são os fruto-oligossacarídeos (FOS) e a inulina¹⁴⁴.

Podem atuar modulando a parede da barreira intestinal tanto como produtos para fermentação dos ácidos graxos de cadeia curta, quanto diretamente, estabilizando a barreira intestinal⁹⁰. Recentemente, Pachikian BD demonstrou que o prebiótico FOS atenuou esteatose hepática experimental, possivelmente pela modulação da microbiota intestinal, função de barreira ou ambos¹⁴⁵.

Ácidos graxos de cadeia curta

São ácidos orgânicos compostos pelo acetato, propionato, butirato e valerato que são produzidos pela fermentação microbiana de carboidratos não digeríveis no cólon. Conforme demonstrado na DII, a deficiência de butirato causa lesões nas TJ e aumento da permeabilidade intestinal¹⁴⁶. Em consonância com estes dados, estudo *in vitro* demonstrou que o butirato protegeu as células IPEC-J2 expostas ao LPS, através do aumento na expressão das claudinas 3 e 4¹⁰.

Probióticos

Os probióticos são definidos pela Organização Mundial de Saúde como “organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício para a saúde do hospedeiro¹⁴⁷”.

Diversos estudos com probióticos têm demonstrado que promovem a integridade da barreira intestinal, apesar de alguns estudos serem negativos ou inconclusivos. Por exemplo, a administração do *Lactobacillus Plantarum* no duodeno de voluntários saudáveis mostrou aumento significativo de ZO-1 e ocludina nos arredores das estruturas *tight junctions*¹⁴⁸. Estes resultados sugerem que a administração do *Lactobacillus Plantarum* pode melhorar a estabilidade dos complexos TJ em humanos e atenuar a sua ruptura por citocinas, toxinas e patógenos.

Em suma, o desequilíbrio na composição da comunidade bacteriana no intestino pode levar a disfunções no trânsito intestinal, na modulação da barreira, e a doenças crônicas como DII. O entendimento de como este ecossistema é regulado por dieta e outros fatores exógenos, e como isto pode ser manipulado, é essencial para a prevenção e tratamento de doenças⁹⁰.

2.7 Métodos de avaliação da permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal pode ser avaliada de várias formas, tanto in vitro como in vivo, em humanos ou em modelos animais, com a utilização de diferentes moléculas como marcadores para a avaliação como íons, carboidratos de diferentes tamanhos, macromoléculas e antígenos, bactérias ou produtos bacterianos. Além disso, deve ser selecionado o compartimento utilizado, como sangue periférico, sangue via veia porta ou urina⁹⁰. A seguir serão destacados alguns testes bastante utilizados tanto para avaliação em humanos quanto em modelos animais:

In-vitro

TEER – Resistência elétrica transepitelial: é considerado padrão ouro para avaliação da permeabilidade intestinal em estudos in vitro¹¹⁶. Esta técnica permite avaliar a expressão funcional e a regulação das TJ¹⁴⁹, através da medição do fluxo de íons paracelulares. A linhagem celular mais utilizada para avaliar permeabilidade intestinal é a Caco-2, obtida a partir de células epiteliais de adenocarcinoma colorretal em humanos¹⁵⁰. Quando cultivada em condições específicas, podem criar uma monocamada de células com uma polarização luminal e basolateral.

FITC-Dextrano: Avalia a permeabilidade a partir de extratos de biópsia humana através do isotiocianato de fluoresceína em monocamadas confluentes de células Caco-2¹⁵¹.

Ex-vivo

Ussing Chamber. ou câmara de uso, é utilizada tanto em humanos quanto em modelos animais, é uma técnica ex-vivo que necessita de tecido intestinal fresco, obtido via biópsia ou cirurgia, característica que limita a sua utilização. Permite a mensuração de correntes com curtos-circuitos como indicador da atividade de transporte de íons através do epitélio⁹⁰.

In-vivo

Teste da lactulose e manitol: trata-se de um ensaio para avaliação de permeabilidade intestinal em humanos. Consiste na administração de oligossacarídeos com pesos moleculares elevados, como a lactulose, e açúcares de tamanho pequeno, como o manitol. Considera-se que a molécula de tamanho grande atravessa a via paracelular intestinal somente se a função de barreira estiver comprometida. Nesse caso, tais açúcares atravessam a barreira intestinal, entram na circulação e podem ser detectados na urina após a excreção renal. A molécula de tamanho pequeno atravessa a barreira intestinal livremente, independente da perda da função barreira e é afetada da mesma forma que moléculas maiores por fatores de confundimento como diluições gástricas, motilidade gastrointestinal, degradação bacteriana e função renal. Dessa forma, a razão da concentração urinária de ambas as moléculas medidas após 5-6 horas, reflete com maior precisão a passagem paracelular através da barreira intestinal do que a medida isolada dos oligossacarídeos urinários⁹⁰. A utilização clínica deste teste é útil, pois discrimina a passagem via paracelular (lactulose) e transcelular (manitol), e pode fornecer informações importantes sobre o status geral do intestino (atrofia dos vilos e inflamação)¹¹⁶. É considerado teste padrão ouro para mensuração da permeabilidade intestinal em humanos¹⁵².

Mais recentemente, têm sido utilizado “**teste multi açúcar**”, baseado na administração simultânea de sacarose, lactulose, sucralose, eritritol e rhamnose para avaliar a permeabilidade de diferentes segmentos do trato gastrointestinal. Consiste na administração de bebida composta pelos 4 açúcares diluídos em água, e coleta de urina em 24 horas, em dois tempos: 0 – 5h, que reflete a permeabilidade gastroduodenal e do intestino delgado através da excreção urinária de sacarose e razão entre lactulose e L-rhamnose (L/R), respectivamente; em 5 – 24h, a razão

sucralose e eritritol (S/E) representou a permeabilidade do cólon, enquanto a sua quantificação em 0 – 24h indicou a permeabilidade total do intestino¹⁵³.

Medição de LPS: São ensaios utilizados para demonstrar endotoxemia, que pode indicar translocação bacteriana do lúmen intestinal para a circulação em função de falhas na função de barreira do epitélio celular. Possui como limitação o fato de que os LPS são detectáveis apenas em baixos níveis no sangue periférico. Já em modelos experimentais, é facilmente medido através da veia porta dos animais⁹⁰. Em humanos, tem sido utilizado com sucesso para demonstrar endotoxemia em pacientes com sepse¹⁵⁴ e níveis aumentados de LPS em pacientes com obesidade e síndrome metabólica^{155,156}. Schnabl & Brenner 2014¹⁶ referem que provavelmente o melhor método para avaliar aumento da permeabilidade intestinal é através da medida direta de produtos bacterianos que se originam apenas no lúmen intestinal e, portanto, devem ser translocados para o espaço extraintestinal, sangue e órgãos.

Anticorpos de núcleo de endotoxina circulante (EndoCAb): É utilizado para o dano da barreira intestinal de fase aguda, como medida alternativa aos ensaios de endotoxemia. É medido no sangue periférico, e permite a quantificação de imunoglobulinas como a IgA, contra o núcleo interno que consiste de uma parte hidrofóbica, o lípido A, que está ligado a um oligossacarídeo central. O lípido A é altamente conservado em todas as bactérias gram-negativas. Além disso, essa parte é considerada a responsável pela toxicidade da endotoxemia^{157,158}. Essas imunoglobulinas circulantes fornecem informação sobre a função da barreira epitelial intestinal. Esta abordagem é limitada, pois fornece informações apenas em pacientes pós-operatórios⁹⁰.

Concentração de butirato fecal: A deficiência de butirato pode ser utilizada como uma medida indireta para danos na função de barreira intestinal, tendo em vista que o butirato diminui a translocação bacteriana em modelos celulares¹⁵⁹ e modifica a

expressão das claudina-1 e claudina-2^{146,160}, e das claudina-3 e claudina-4¹⁰ em favor da preservação da barreira. No entanto, os testes de butirato estão mal estabelecidos para avaliação de permeabilidade até o momento⁹⁰.

Avaliação do conteúdo bacteriano no muco intestinal: Bischoff e col. sugerem que a medição de bactérias no muco do cólon interno, através de biópsias, pode servir como um novo marcador para a permeabilidade intestinal, tendo em vista que estudo recente demonstrou que defeitos de barreira associado à penetração de bactérias do muco geraram colite em animais e humanos¹⁶¹. Entretanto, os autores alertam para a necessidade de padronização dessa análise para o fim a que se destina.

Biomarcadores da integridade celular epitelial: podem ser utilizadas diversas partículas, como a citrulina, proteínas de ligação de ácidos graxos, glutathione S-transferases e *tight junctions* para avaliar a barreira intestinal em humanos. Especialmente as TJ são utilizadas como marcador para avaliar a perda da integridade da barreira paracelular, sendo as claudinas as principais proteínas epiteliais responsáveis pela função de barreira⁹⁰.

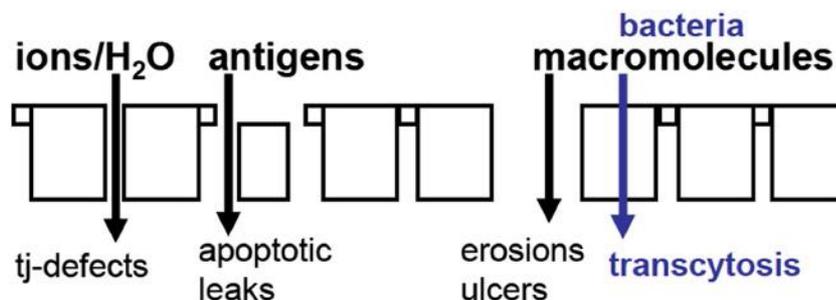


Figura 7. Disfunções da barreira intestinal. A mensuração da permeabilidade intestinal é determinada por marcadores moleculares, desde que o tipo de molécula analisada passe pelo lesão. Fonte: Bischoff *et al*, 2014⁹⁰.

3. JUSTIFICATIVA

As doenças hepáticas constituem importante problema de saúde pública e entre elas, a Doença Hepática Alcólica e a Doença Hepática Gordurosa não alcólica estão entre as principais causas de morte por doença hepática no mundo. Os mecanismos de desenvolvimento das doenças não estão completamente elucidados, e recentemente tem sido implicado o eixo entero-hepático como importante via na patogênese das doenças, entretanto, não é possível determinar se as lesões intestinais são causa ou consequência do dano hepático.

Sendo os modelos de doenças hepáticas desenvolvidos em *zebrafish* uma importante ferramenta para elucidar a patogênese destas doenças, e contribuir para o desenvolvimento de futuros tratamentos, a avaliação de marcadores de dano intestinal como as *Tight Junctions* em modelos de esteatose hepática induzida por álcool (DHA) e frutose (DHGNA) se tornam relevantes para avançar neste campo de conhecimento.

4. QUESTÃO DE PESQUISA

A exposição ao álcool e à frutose pode causar alteração nas *Tight Junctions*, indicando dano intestinal nos modelos experimentais de esteatose hepática alcóolica e não alcóolica em *zebrafish*?

5. HIPÓTESE

5.1 Hipótese verdadeira

Os animais expostos ao etanol e à frutose apresentam alteração na expressão gênica das *Tight Junctions cldn C*, *cldn 15a*, *cldn 15b* e *f11r*, em relação aos seus controles em estágios iniciais de esteatose hepática, induzida por álcool e frutose.

5.2 Hipótese nula

Os animais expostos ao etanol e à frutose não apresentam alteração na expressão gênica das *Tight Junctions cldn C*, *cldn 15a*, *cldn 15b* e *f11r*, em relação aos seus controles em estágios iniciais de esteatose hepática, induzida por álcool e frutose.

6. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão gênica das *Tight Junctions* intestinais, *cldn C*, *cldn 15a*, *cldn 15b* e *f11r* em dois modelos experimentais de esteatose hepática no *zebrafish*: induzida por álcool (DHA) e por frutose (DHGNA).

7. ARTIGO

**Intestinal tight junctions are not altered in the early stages of alcoholic
and non-alcoholic hepatic steatosis in zebrafish**

Status: a submeter

Title page

Intestinal tight junctions are not altered in the early stages of alcoholic and non-alcoholic hepatic steatosis in zebrafish

Carolina Bortolin Beskow^{1 2}, Amanda Pasqualotto^{1 2}, Carolina Uribe-Cruz^{1 2}, Larisse Longo^{1 2}, Raquel Ayres^{1 2}, Jessica Tonin Ferrari^{1 2}, Themis Reverbel da Silveira^{2 4}, Mário Reis Alvares-da-Silva^{1 2 3}, Valesca Dall'Alba^{1 2 5}

Authors' institutions:

- 1 Postgraduate Program in Gastroenterology and Hepatology Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;
- 2 Experimental Laboratory of Hepatology and Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.
- 3 Department of Internal Medicine, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Division of Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.
- 4 Postgraduate Program in Pediatrics: Health Care of Children and Adolescents, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.
- 5 Department of Nutrition, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRGS.

Corresponding author: Carolina Bortolin Beskow

Adress: Rua Ramiro Barcellos, 2350 – Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia – HCPA. Porto Alegre, RS. Zip code: 90.035-903, Brazil.

Phone: 55 51 3359 8847; 55 51 99822 2807; fax: 55 51 3359 8760

Electronic mail: carolbeskow@uol.com.br

ABSTRACT

Background: Alcoholic liver disease (ALD) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) are among the leading causes of death from liver disease worldwide. Both ALD and NAFLD are related to dysbiosis, increased gut permeability, inflammation, and liver damage. However, it is not clear whether liver disease precedes changes in the intestinal epithelium or whether it is the increased permeability that promotes liver damage. **Aim:** To evaluate the gene expression of tight junctions in ALD and NAFLD models in Zebrafish (*Danio rerio*). **Methods:** In the ALD model, fish were divided into two groups: Ethanol (n=30), exposed to 0.5% ethanol for 28 days and control (n=30). In the NAFLD model, fish were also divided into two groups: Fructose (n=24), exposed to 6% fructose for 2 hours for 14 days and control (n=24). At the end of the experiments the animals were euthanized and livers were collected for histological analysis (hematoxylin-eosin - HE and Oil Red staining) and intestines for evaluation of the gene expression of gut permeability markers *cldnC*, *cldn15a*, *cldn15b* and *f11r* by Real Time qPcr. **Results:** Both animals exposed to alcohol and fructose presented hepatic steatosis by HE and Oil Red staining, without signs of inflammatory infiltrates under optical microscopy. There was no significant difference in the expression of the gut tight junctions for both ALD and NAFLD ($p>0.05$) **Conclusion:** The results suggest that in the early stages of ALD and NAFLD there are no changes in intestinal tight junctions, and that possibly liver damage precedes intestinal damage.

Key Words: Hepatic steatosis, tight junctions, ethanol, fructose, zebrafish.

INTRODUCTION

Alcoholic liver disease (ALD) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) are among the leading causes of death from liver diseases^{1,2,16}. The World Health Organization estimates that excessive alcohol consumption is responsible for 5.1% of the global burden of disease and about 5.9% of all deaths worldwide². However, NAFLD has been recognized as a highly prevalent condition in the last decades⁴, estimated at around 20-30% in Western countries, along with the obesity epidemic⁵. Although they present a similar disease course, characterized by the presence of steatosis in at least 5% of the hepatocytes, with the possibility of progressing to steatohepatitis, fibrosis, cirrhosis and even hepatocellular carcinoma^{6,7}, they are caused by different factors. The Western diet, with a high consumption of ultraprocessed foods, sources of low quality fat and simple carbohydrates, such as fructose, is among the main factors associated with NAFLD^{9,46,89,117}. However, ALD is a consequence of chronic ethanol consumption between 40-80g/day for men and 20-40g/day for women⁸.

It is known that both alcohol and fructose may promote changes in the intestinal epithelium, altering its barrier function and causing increased permeability^{16,162}. The integrity of the intestinal epithelium is determined mainly by tight junctions (TJ), a highly dynamic protein complex, selectively permeable, which forms within plasma membrane lipid domains¹², and are composed of two main groups: single transmembrane domain proteins, such as JAM (junctional adhesion molecule) and four-transmembrane domain proteins such as claudins. These constitute the major part of the complex architecture of TJ and play a key role in the permeability of endothelial and epithelial cells, both in humans and animal models, especially in zebrafish^{13,14}. The study of liver diseases in zebrafish has been shown to be a valuable tool due to the high conservation of liver cells as with mammals, and also has correspondence in intestinal functions, although they have a simpler structure⁷¹. Thus, the objective of this study was to verify if

intestinal permeability changes through the expression of tight junctions *cldnC*, *cldn15a*, *cldn15b* and JAM A (*f11r*) in two experimental models of hepatic steatosis in zebrafish: alcohol^{64,84} and fructose induced (Ferrari 2017, manuscript submitted).

ANIMALS AND METHODS

Animals

A total of 108 zebrafish (*Danio rerio*), wild type, adult, male and female were purchased from a commercial distributor. The animals were kept under controlled conditions: water temperature of $28 \pm 2^\circ\text{C}$, light/dark cycle of 14/10 hours and fed with Artemia feed (BioArtémia - Brazil), calculated at the proportion of 7% of the animals' weight, fractionated into 4 times a day. The following parameters of water quality were monitored daily: pH, ammonia, nitrates and nitrites. To maintain the equalization, the animals were weighed and allocated in the aquariums maintaining a similar weight between the groups, with the density of 3 fish/L.

Two different experiments were performed to induce hepatic steatosis: ALD model and NAFLD model. The studies were approved by the Research Ethics Committee for the Use of Animals of *Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS* and conducted according to the international standards for the use of animals in the laboratory.

Alcoholic Hepatic Disease

The ALD model was previously standardized in our research group^{64,84}. The animals were divided into two groups (n=30): Ethanol, with animals exposed to 0.5% (v/v) of ethanol (Merck® KGaA, Germany) in the aquarium water, and control, kept in the aquarium without the addition of ethanol. The aquarium water was changed every two days. The animals were euthanized after 28 days.

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

The fructose induced hepatic steatosis model was also previously standardized by our group (Ferrari J - manuscript submitted). The animals were divided into two groups (n=24): Fructose, with animals exposed to 6% of fructose (Synth, Brazil), and control, without exposure to fructose. The animals were kept in an aquarium called "residence" and transferred daily for two hours to an aquarium called "induction" that contained fructose. The control group was submitted to the same transfer to another aquarium daily, but without addition of fructose. The water of the residence aquarium was changed daily, and the aquarium's induction water every other day with added fructose. All the aquariums were maintained with 250 mg/ml fungizone (Gibco, USA), 25 µg/ml ampicillin (Blau, BRA) and 5 µg/ml kanamycin (Gibco, USA) to avoid possible microbial contamination due to the presence of fructose⁹. The animals were euthanized after 14 days.

At the end of each experiment the animals were anesthetized by immersion in 400 µg/mL tricaine (Sigma-Aldrich, Germany) and euthanized by exsanguination¹⁶³. Livers and intestines were collected from all animals and stored according to the necessity of each technique.

Histological Analysis

For histological evaluation liver sections were used (n=3/group), which were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, stained with hematoxylin-eosin (HE) and examined under an optical microscope.

For the evaluation of hepatic steatosis, liver sections were used, (n=3/group), which were fixed in Tissue-Tek (Sakura Finetek, USA) and cryosectioned (8µ thick) and stained with Oil Red (Sigma-Aldrich, USA)⁶⁴.

Evaluation of Gene Expression

For both experiments, the samples were grouped into a pool of 3 intestines. The intestines were preserved in RNAlater (Invitrogen, USA) and stored at -80°C. Total RNA was isolated with a RNeasy Mini Kit (Invitrogen, USA), and converted to cDNA with High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Termo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer's instructions. Gut permeability markers *cldnC*, *cldn15a*, *cldn15b*, and *f11r* gene expression were assessed by TaqMan probes (Life Technologies, USA). Number of Assay ID in table 1. PCR was performed in Step One™ Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA) and the temperature cycling was 2 minutes at 50°C, 10min at 95°C followed by 40 cycles with 15s at 95°C and 1min at 60°C. Gene expression was quantified by: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (threshold cycle) method and normalization was done using the *elongation factor- alpha 1* gene (*ef α -1*)⁶⁴. Were used for the ALD model the n=10 pools and for the NALFD model the n=8 pools.

Table 1. Probes identification assays:

Gene	Assay ID
<i>cldnC</i>	dr03138426
<i>cldn15a</i>	dr03145240
<i>cldn15b</i>	dr03072501
<i>f11r</i>	dr03118078
<i>efα-1</i>	dr03432748

Statistical analysis

The results were described in medians and interquartile ranges. Differences between groups were measured using the Mann-Whitney test. The SPSS program (Statistical Package for Social Sciences), version 18.0 was used to process and analyze the data. The level of significance was 5%.

Results

Effects of Ethanol and Fructose on the histological analysis of the Liver

The hematoxylin-eosin (HE) stained liver sections of the control groups, in both of ethanol and fructose experiments, presented hepatocytes with preserved characteristics, with no signs of lipid deposition (Figures 1B and 2B). After the exposure period to ethanol and fructose, increased lipid droplets infiltrated into hepatocytes can be observed causing displacement of the nucleus to the periphery of the cytoplasm (Figures 1A and 2A). No signs of inflammatory infiltrates were identified by optical microscopy.

The liver sections of control groups stained with Oil Red, both ethanol and fructose present a small amount of lipid droplets (Figures 1D and 2D) in relation to the groups exposed to ethanol for fructose, which present an abundance of lipid droplets (Figures 1C and 2C).

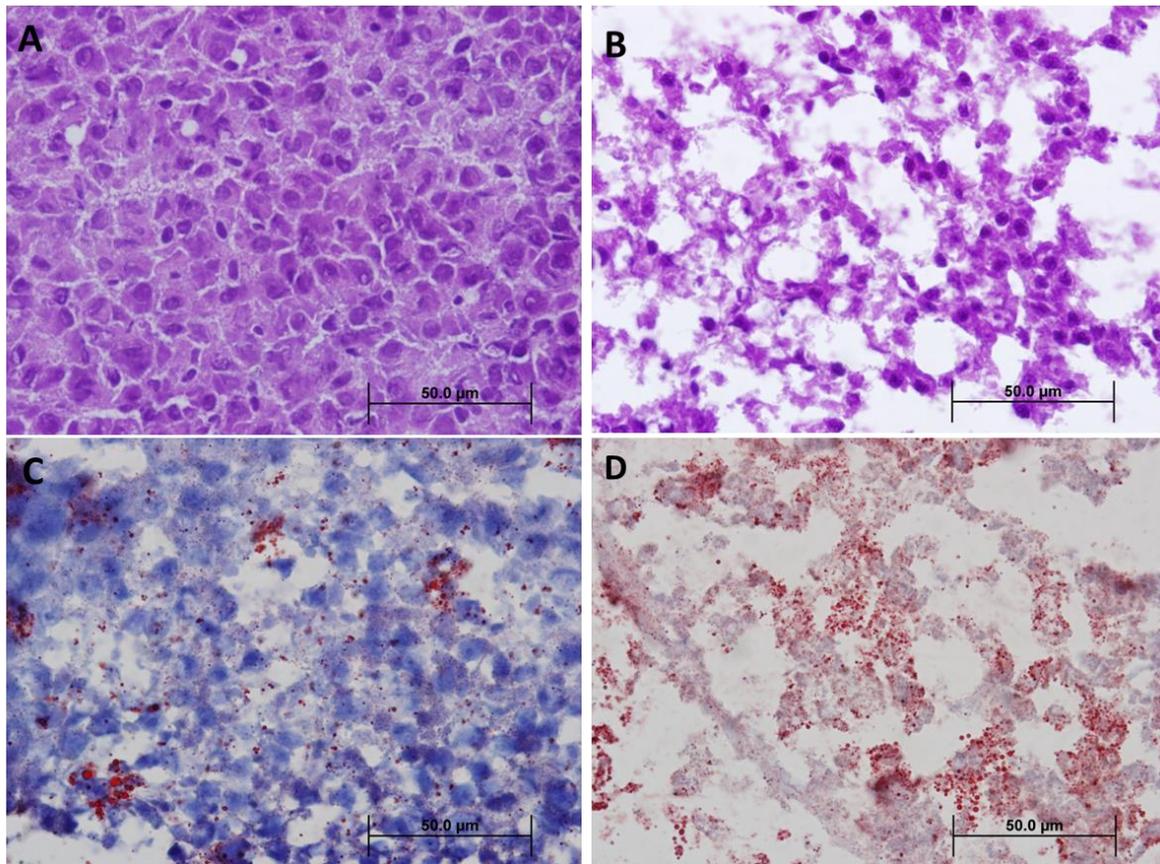


Figure 1. HE staining (100x) of zebrafish liver sections: in figure B, enlarged hepatocytes by lipid infiltration due to exposure to ethanol in relation to the control: A. Oil Red staining (100x) of zebrafish liver sections: in figure D, hepatocytes present abundant lipid droplets due to exposure to ethanol in relation to control, in figure C.

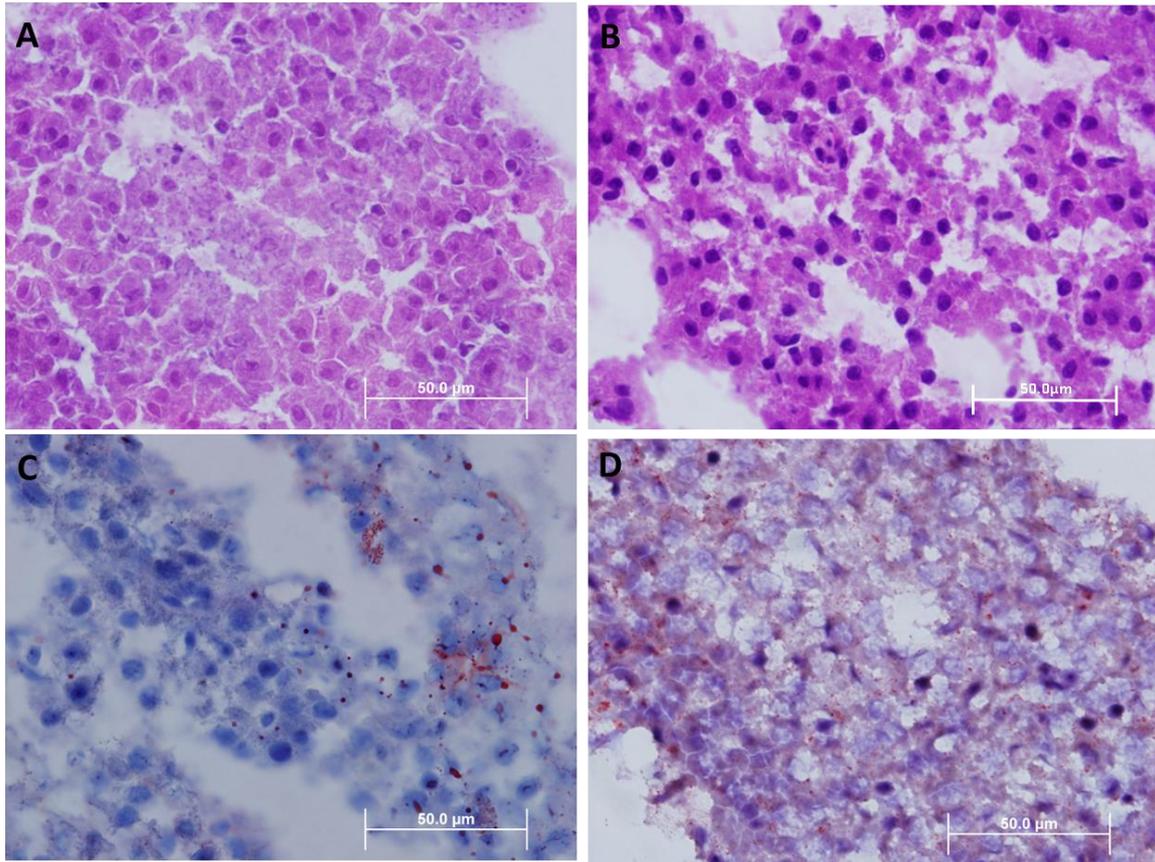


Figure 2. HE staining (100x) of zebrafish livers sections exposed to fructose, demonstrating enlarged hepatocytes by lipid infiltration in figure B in relation to control: A. Oil Red staining (100x) of zebrafish livers exposed to fructose with abundant presence of lipid droplets in figure D in relation to control, in figure C.

Evaluation of Gene Expression

In the evaluation of the gene expression of the *cldnC*, *cldn15a*, *cldn15b*, and *f11r* markers, there was no significant difference between the groups for both the ALD and the NAFLD model, as shown in the table below:

Table 2. Evaluation of the gene expression of tight junctions as gut permeability markers in experimental models of alcoholic liver disease (ALD) and non-alcoholic fat liver disease (NAFLD).

Evaluated Genes	ALD		<i>p</i> value	NAFLD		<i>p</i> value
	Control	Ethanol		Control	Fructose	
<i>cldn C</i>	0,66 (0,44 – 4,57)	0,42 (0,30 – 0,78)	0,131	1,41 (0,64 – 1,55)	1,38 (1,25 – 1,55)	0,674
<i>cldn15a</i>	1,39 (0,94 – 1,73)	1,34 (1,05 – 1,63)	0,940	1,25 (0,79 – 1,54)	1,55 (1,42 – 1,70)	0,074
<i>cldn15b</i>	0,53 (0,42 – 4,79)	0,52 (0,36 – 0,64)	0,597	1,31 (0,68 – 1,56)	1,48 (0,93 – 18,16)	0,345
<i>f11r</i>	1,29 (0,41–2,04)	1,34 (0,77 – 2,30)	0,650	0,69 (0,37– 2,63)	2,05 (0,70 – 2,98)	0,294

Mann-Whitney test: Median [q1 - q3]; value of $p > 0.05$.

DISCUSSION

The experiments confirm the findings of previous studies carried out in our laboratory^{64,84} where exposure to ethanol and fructose resulted in hepatic steatosis in zebrafish, without signs of inflammatory infiltrate. Although several studies in zebrafish have demonstrated hepatic steatosis for different causes^{64,83,84}, according to Goessling and Sadler⁷¹, it has not yet been possible to identify the evolution to more advanced stages of disease such as fibrosis and cirrhosis.

Kottra G and colleagues in 1983¹⁶⁴ already emphasized the importance of tight junctions as the main causers of the paracellular flow in an intact epithelium, whose alterations may indicate increased permeability. In this study, we used TJ belonging to the JAM and claudins groups, which have a determinant role in the permeability of endothelial and epithelial cells in zebrafish^{13,14}.

In the evaluation of the gene expression of the TJ, there was no significant difference for the evaluated markers, between the exposed groups and their controls

for both ethanol and fructose experiments. The results seem to indicate that hepatic damage precedes the intestinal lesion, and that perhaps in the early stages of the disease, without characteristics, steatohepatitis, fibrosis or cirrhosis, it is not possible to identify significant intestinal changes. These findings are in agreement with data from the study by Miele and col. 2009¹⁵, where there was no increase in permeability in lower degrees of steatosis.

There is still a discussion, in both experimental and human studies, whether loss of intestinal barrier alone is sufficient to trigger disease¹². Likewise, it is still unclear whether liver damage is a cause or consequence of intestinal damage¹⁶. A study performed on patients with NAFLD showed a significant increase in gut permeability with changes in TJ compared to healthy individuals, evaluated by the gene expression of zonula occludens-1 (ZO-1)¹⁵. Besides that, was demonstrated that increased permeability occurs in parallel with the increased prevalence of bacterial overgrowth in the small intestine (SIBO). These findings were associated with severe steatosis. In the present study, in zebrafish, the liver histological characteristics found are compatible with simple steatosis, both for exposure to ethanol and fructose, signaling that these are early stages of the disease.

Alcohol and its metabolites, mainly acetaldehyde, are central elements in the pathogenesis of alcoholic liver disease, since they cause inflammation, increased intestinal permeability, changes in the microbiota and endotoxin translocation through the gut-liver axis^{16 37}. Its effects on the dysfunction of the intestinal epithelial barrier can occur by the increase of the systemic levels of inflammatory cytokines such as interleukin 1 β (IL-1 β) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)⁹⁴ or promoting the disruption of TJ and increased paracellular permeability to macromolecules^{120,165}. The disruption of the intestinal barrier function would be the essential condition for the endotoxins produced by the intestinal microbiome to invade the systemic circulation and access the liver⁹⁴. However, some studies of murine have not demonstrated a

significant difference in the translocation of bacterial endotoxins into the systemic circulation in initial periods of exposure to alcohol^{166,167}. In vitro studies suggest that alcohol concentration may have an influence on increased permeability. According to Rao 2009¹⁶⁵, ethanol concentrations above 1% are needed for rupture of the intestinal barrier^{165,168,169}. Reduction in the expression of TJ ZO-1 and claudin-1, consistent with increased permeability by transepithelial electrical resistance - TEER in Caco-2 cells, occurred only with 5% alcohol exposure¹⁷⁰. Our research group^{64,86} showed that with the exposure of zebrafish to the concentration of 0.5% of ethanol it was already possible to identify the presence of steatosis, a much lower concentration used than that by Wang Y, *et al* 2014¹⁷⁰.

Regarding fructose, previous studies have demonstrated its potential as a disruptor of the intestinal barrier. According to Volynets V, *et al* 2017¹²⁹, rats that ingested fructose-added water, fed either a Western diet or a control diet, showed an increased endotoxin translocation, which did not occur with the Western diet group. In addition, the ingestion of fructose resulted in a reduction in the mucus layer, alteration of the intestinal microbiota and increase in intestinal permeability by lactulose and mannitol and FITC-D4000 tests. The dysfunction in the intestinal barrier caused by fructose occurred both in the control diet group, with reduction of mRNA expression levels for TJ occludin and claudin-2 in the ileum, as for the Western diet with fructose, with reduction in the occludin and ZO-1 mRNA expression. These data demonstrate the harmful power of fructose, including in relation to an unhealthy diet such as the Western diet, rich in sugars and fats.

According to Ouyang X *et al* 2008⁸⁹, fructose, especially synthetic, deriving from high fructose corn syrup (HFCS), which is widely used by the industry due to its low cost and high sweetening power, has a direct effect on the intestinal barrier, favoring the endotoxin translocation and reduction in mucus layer, leading to microbiota alteration and increased intestinal permeability^{89,129}. In the present study, we also used

synthetic fructose for the induction of NAFLD, as well as Volynets V, *et al* 2017¹²⁹. In humans, Jin R and colleagues 2014¹⁷¹ reported that adolescents with NAFLD have elevated endotoxin levels after ingesting fructose beverages when compared to healthy adolescents.

Significant changes in intestinal barrier function, as in the Volynets V, *et al* 2017 study, may have occurred in more advanced stages of disease, which can be demonstrated by the severe increase in liver weight in relation to control, especially in the fructose with Western diet (80%). In addition, the time of exposure of the mice to fructose was 12 weeks, in contrast to our study, where the zebrafish was exposed to fructose for only 14 days, except for the unique characteristics of each experimental model, demonstrating hepatic steatosis without advanced disease characteristics.

In the present study, both the experimental model of alcoholic disease and that of non-alcoholic disease induced by fructose, were able to cause liver damage, proven by the presence of steatosis. No significant changes in tight junctions were identified, suggesting that liver disease precedes intestinal damage, not the other way around.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank FIPE – HCPA – HCPA (Research Incentive Fund – Hospital de Clínicas de Porto Alegre) and PROAP (PostGraduation Program Support by CAPES (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), for financial support.

REFERENCES

1. Schnabl B, Brenner DA. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1513-1524.
2. WHO. Global status report on alcohol and health. In. Geneva, Switzerland: World Health Organization 2014.
3. Kirpich IA, Feng W, Wang Y, et al. The type of dietary fat modulates intestinal tight junction integrity, gut permeability, and hepatic toll-like receptor expression in a mouse model of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2012;36(5):835-846.
4. Tappy L, Lê KA. Does fructose consumption contribute to non-alcoholic fatty liver disease? *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012;36(6):554-560.
5. Masarone M, Federico A, Abenavoli L, Loguercio C, Persico M. Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history. *Rev Recent Clin Trials*. 2014;9(3):126-133.
6. Yeh MM, Brunt EM. Pathological features of fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2014;147(4):754-764.
7. Than NN, Newsome PN. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*. 2015;239(1):192-202.
8. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2008;48(6):993-999.
9. Satapathy SK, Sanyal AJ. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis*. 2015;35(3):221-235.
10. Lambert J, Weiskirchen S, Landert S, Weiskirchen R. Fructose: A Dietary Sugar in Crosstalk with Microbiota Contributing to the Development and Progression of Non-Alcoholic Liver Disease. *Front Immunol*. 2017;8:1159.
11. Sapp V, Gaffney L, EauClaire SF, Matthews RP. Fructose leads to hepatic steatosis in zebrafish that is reversed by mechanistic target of rapamycin (mTOR) inhibition. *Hepatology*. 2014;60(5):1581-1592.
12. Ceccarelli S, Nobili V, Alisi A. Toll-like receptor-mediated signaling cascade as a regulator of the inflammation network during alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(44):16443-16451.
13. Sellmann C, Priebs J, Landmann M, et al. Diets rich in fructose, fat or fructose and fat alter intestinal barrier function and lead to the development of nonalcoholic fatty liver disease over time. *J Nutr Biochem*. 2015;26(11):1183-1192.
14. Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(9):1075-1083.
15. Günzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*. 2013;93(2):525-569.
16. Kolosov D, Bui P, Chasiotis H, Kelly SP. Claudins in teleost fishes. *Tissue Barriers*. 2013;1(3):e25391.

17. Goessling W, Sadler KC. Zebrafish: an important tool for liver disease research. *Gastroenterology*. 2015;149(6):1361-1377.
18. Schneider AC, Machado AB, de Assis AM, et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on hepatic and serum lipid profiles in zebrafish exposed to ethanol. *Zebrafish*. 2014;11(4):371-378.
19. Schneider AC, Gregório C, Uribe-Cruz C, et al. Chronic exposure to ethanol causes steatosis and inflammation in zebrafish liver. *World J Hepatol*. 2017;9(8):418-426.
20. Wilson JM, Bunte RM, Carty AJ. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2009;48(6):785-789.
21. Hammes TO, Pedroso GL, Hartmann CR, et al. The effect of taurine on hepatic steatosis induced by thioacetamide in zebrafish (*Danio rerio*). *Dig Dis Sci*. 2012;57(3):675-682.
22. Kottra G, Frömter E. Functional properties of the paracellular pathway in some leaky epithelia. *J Exp Biol*. 1983;106:217-229.
23. Miele L, Valenza V, La Torre G, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2009;49(6):1877-1887.
24. Szabo G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease. *Gastroenterology*. 2015;148(1):30-36.
25. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):799-809.
26. Rao RK, Seth A, Sheth P. Recent Advances in Alcoholic Liver Disease I. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286(6):G881-884.
27. Rao R. Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2009;50(2):638-644.
28. Mason CM, Dobard E, Kolls J, Nelson S. Effect of alcohol on bacterial translocation in rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998;22(8):1640-1645.
29. Fleming S, Toratani S, Shea-Donohue T, Kashiwabara Y, Vogel SN, Metcalf ES. Pro- and anti-inflammatory gene expression in the murine small intestine and liver after chronic exposure to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001;25(4):579-589.
30. Rao RK. Acetaldehyde-induced increase in paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998;22(8):1724-1730.
31. Ma TY, Nguyen D, Bui V, Nguyen H, Hoa N. Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol*. 1999;276(4 Pt 1):G965-974.
32. Wang Y, Tong J, Chang B, Wang B, Zhang D. Effects of alcohol on intestinal epithelial barrier permeability and expression of tight junction-associated proteins. *Mol Med Rep*. 2014;9(6):2352-2356.

33. Schneider AC, Rico EP, de Oliveira DL, et al. Lactobacillus rhamnosus GG Effect on Behavior of Zebrafish During Chronic Ethanol Exposure. *Biores Open Access*. 2016;5(1):1-5.
34. Volynets V, Louis S, Pretz D, et al. Intestinal Barrier Function and the Gut Microbiome Are Differentially Affected in Mice Fed a Western-Style Diet or Drinking Water Supplemented with Fructose. *J Nutr*. 2017;147(5):770-780.
35. Jin R, Willment A, Patel SS, et al. Fructose induced endotoxemia in pediatric nonalcoholic Fatty liver disease. *Int J Hepatol*. 2014;2014:560620.

8. CONCLUSÃO

No presente estudo, tanto o modelo experimental de doença hepática alcóolica quanto o de doença hepática não alcóolica induzida por frutose, foram capazes de provocar dano ao fígado, atestado pela presença de esteatose. Não foram identificadas alterações significativas nas *tight junctions*, sugerindo que a doença hepática possa preceder a lesão intestinal, e não o contrário.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O objetivo deste estudo foi verificar se os efeitos deletérios do etanol e da frutose, nos dois modelos experimentais de doença hepática em *zebrafish*, produziram danos intestinais, além de esteatose hepática.

Através das análises realizadas, foi possível demonstrar que ambos os modelos de doença hepática em *zebrafish*, induzida por álcool e frutose, causam dano hepático em estágio inicial, caracterizado pela esteatose simples. A literatura atesta que não foi possível até o presente momento encontrar doença hepática em estágios mais avançados no *zebrafish*, com a presença de fibrose ou cirrose. Considerando que não obtivemos alteração nas *Tight Junctions* intestinais analisadas, podemos sugerir que a doença hepática preceda as lesões intestinais.

Para o futuro, seria interessante estudar ambos os modelos em tempos distintos, buscando o desenvolvimento de esteatose em estágios mais avançados, para avaliação tanto de danos hepáticos e intestinais, com o propósito de desenvolver possíveis alvos terapêuticos no futuro. Além disso, seria importante validar as *Tight Junctions* utilizadas neste estudo como marcadores de permeabilidade intestinal no *zebrafish*, comparando com outros métodos ou formas de avaliação de disfunção na barreira intestinal, que ainda são limitadas neste modelo animal. O estudo da microbiota intestinal no *zebrafish* também pode auxiliar no avanço neste campo de conhecimento.

10. REFERÊNCIAS

1. Kirpich IA, Feng W, Wang Y, et al. The type of dietary fat modulates intestinal tight junction integrity, gut permeability, and hepatic toll-like receptor expression in a mouse model of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2012;36(5):835-846.
2. WHO. Global status report on alcohol and health. In. Geneva, Switzerland: World Health Organization 2014.
3. Ndugga N, Lightbourne TG, Javaherian K, et al. Disparities between research attention and burden in liver diseases: implications on uneven advances in pharmacological therapies in Europe and the USA. *BMJ Open*. 2017;7(3):e013620.
4. Tappy L, Lê KA. Does fructose consumption contribute to non-alcoholic fatty liver disease? *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012;36(6):554-560.
5. Masarone M, Federico A, Abenavoli L, Loguercio C, Persico M. Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history. *Rev Recent Clin Trials*. 2014;9(3):126-133.
6. Than NN, Newsome PN. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*. 2015;239(1):192-202.
7. Yeh MM, Brunt EM. Pathological features of fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2014;147(4):754-764.
8. Ceccarelli S, Nobili V, Alisi A. Toll-like receptor-mediated signaling cascade as a regulator of the inflammation network during alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(44):16443-16451.
9. Sapp V, Gaffney L, EauClaire SF, Matthews RP. Fructose leads to hepatic steatosis in zebrafish that is reversed by mechanistic target of rapamycin (mTOR) inhibition. *Hepatology*. 2014;60(5):1581-1592.
10. Yan H, Ajuwon KM. Butyrate modifies intestinal barrier function in IPEC-J2 cells through a selective upregulation of tight junction proteins and activation of the Akt signaling pathway. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179586.
11. Neunlist M, Van Landeghem L, Mahé MM, Derkinderen P, des Varannes SB, Rolli-Derkinderen M. The digestive neuronal-glia-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(2):90-100.
12. Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(9):1075-1083.
13. Günzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*. 2013;93(2):525-569.
14. Kolosov D, Bui P, Chasiotis H, Kelly SP. Claudins in teleost fishes. *Tissue Barriers*. 2013;1(3):e25391.
15. Miele L, Valenza V, La Torre G, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2009;49(6):1877-1887.
16. Schnabl B, Brenner DA. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1513-1524.
17. Kawaratani H, Tsujimoto T, Douhara A, et al. The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:495156.
18. Bruha R, Dvorak K, Petrtyl J. Alcoholic liver disease. *World J Hepatol*. 2012;4(3):81-90.
19. O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ, Diseases PGCotAAftSoL, Gastroenterology PPCotACo. Alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2010;51(1):307-328.
20. Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*. 2011;141(5):1572-1585.
21. Yan AW, Schnabl B. Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome associated with alcoholic liver disease. *World J Hepatol*. 2012;4(4):110-118.

22. Lu XL, Luo JY, Tao M, et al. Risk factors for alcoholic liver disease in China. *World J Gastroenterol*. 2004;10(16):2423-2426.
23. Sato N, Lindros KO, Baraona E, et al. Sex difference in alcohol-related organ injury. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001;25(5 Suppl ISBRA):40S-45S.
24. Leevy CM, Moroianu SA. Nutritional aspects of alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis*. 2005;9(1):67-81.
25. Buzzetti E, Kalafateli M, Thorburn D, et al. Pharmacological interventions for alcoholic liver disease (alcohol-related liver disease): an attempted network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;3:CD011646.
26. WHO. Status report on alcohol and health in 35 European countries 2013. In. Geneva, Switzerland: World Health Organization.2013.
27. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol*. 2013;58(3):593-608.
28. Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med*. 2009;360(26):2758-2769.
29. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol*. 2006;44(1):217-231.
30. Yang LS, Shan LL, Saxena A, Morris DL. Liver transplantation: a systematic review of long-term quality of life. *Liver Int*. 2014;34(9):1298-1313.
31. Duffy JP, Kao K, Ko CY, et al. Long-term patient outcome and quality of life after liver transplantation: analysis of 20-year survivors. *Ann Surg*. 2010;252(4):652-661.
32. Schoening WN, Buescher N, Rademacher S, et al. Twenty-year longitudinal follow-up after orthotopic liver transplantation: a single-center experience of 313 consecutive cases. *Am J Transplant*. 2013;13(9):2384-2394.
33. Yin M, Wheeler MD, Kono H, et al. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology*. 1999;117(4):942-952.
34. Donohue TM. Alcohol-induced steatosis in liver cells. *World J Gastroenterol*. 2007;13(37):4974-4978.
35. Song Z, Zhou Z, Deaciuc I, Chen T, McClain CJ. Inhibition of adiponectin production by homocysteine: a potential mechanism for alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2008;47(3):867-879.
36. Park B, Lee HR, Lee YJ. Alcoholic liver disease: focus on prodromal gut health. *J Dig Dis*. 2016;17(8):493-500.
37. Szabo G. Gut-liver axis in alcoholic liver disease. *Gastroenterology*. 2015;148(1):30-36.
38. Wang H, Lafdil F, Kong X, Gao B. Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: a novel therapeutic target. *Int J Biol Sci*. 2011;7(5):536-550.
39. Mottaran E, Stewart SF, Rolla R, et al. Lipid peroxidation contributes to immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(1):38-45.
40. Thiele GM, Freeman TL, Klassen LW. Immunologic mechanisms of alcoholic liver injury. *Semin Liver Dis*. 2004;24(3):273-287.
41. Tilg H, Day CP. Management strategies in alcoholic liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2007;4(1):24-34.
42. Louvet A, Mathurin P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(4):231-242.
43. Akriviadis E, Botla R, Briggs W, Han S, Reynolds T, Shakil O. Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 2000;119(6):1637-1648.
44. Force ABoDatCGT. Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2002;26(1 Suppl):1SA-138SA.

45. Plauth M, Cabré E, Riggio O, et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Liver disease. *Clin Nutr.* 2006;25(2):285-294.
46. Satapathy SK, Sanyal AJ. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis.* 2015;35(3):221-235.
47. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology.* 2012;55(6):2005-2023.
48. Leite NC, Villela-Nogueira CA, Pannain VL, et al. Histopathological stages of nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: prevalences and correlated factors. *Liver Int.* 2011;31(5):700-706.
49. Asrih M, Jornayvaz FR. Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? *Mol Cell Endocrinol.* 2015;418 Pt 1:55-65.
50. Angulo P. Long-term mortality in nonalcoholic fatty liver disease: is liver histology of any prognostic significance? *Hepatology.* 2010;51(2):373-375.
51. Treeprasertsuk S, Lopez-Jimenez F, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease and the coronary artery disease. *Dig Dis Sci.* 2011;56(1):35-45.
52. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 1998;114(4):842-845.
53. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med.* 1999;107(5):450-455.
54. Brea A, Puzo J. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *Int J Cardiol.* 2013;167(4):1109-1117.
55. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(1):59-69.
56. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 2002;420(6913):333-336.
57. Cai D, Yuan M, Frantz DF, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med.* 2005;11(2):183-190.
58. Del Ben M, Baratta F, Polimeni L, Angelico F. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease: epidemiological, clinical and pathophysiological evidences. *Intern Emerg Med.* 2012;7 Suppl 3:S291-296.
59. WHO. Non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis In. Geneva, Switzerland: World Health Organization 2012.
60. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2010;52(1):79-104.
61. Sanyal AJ. ACP Journal Club: vitamin E, but not pioglitazone, improved nonalcoholic steatohepatitis in nondiabetic patients. *Ann Intern Med.* 2010;153(6):JC3-12.
62. Cotrim HP, Parise ER, Figueiredo-Mendes C, Galizzi-Filho J, Porta G, Oliveira CP. NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE BRAZILIAN SOCIETY OF HEPATOLOGY CONSENSUS. *Arq Gastroenterol.* 2016;53(2):118-122.
63. Chen E, Ekker SC. Zebrafish as a genomics research model. *Curr Pharm Biotechnol.* 2004;5(5):409-413.
64. Schneider AC, Machado AB, de Assis AM, et al. Effects of Lactobacillus rhamnosus GG on hepatic and serum lipid profiles in zebrafish exposed to ethanol. *Zebrafish.* 2014;11(4):371-378.
65. McGrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discov Today.* 2008;13(9-10):394-401.
66. Wallace KN, Akhter S, Smith EM, Lorent K, Pack M. Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mech Dev.* 2005;122(2):157-173.

67. Wang Z, Du J, Lam SH, Mathavan S, Matsudaira P, Gong Z. Morphological and molecular evidence for functional organization along the rostrocaudal axis of the adult zebrafish intestine. *BMC Genomics*. 2010;11:392.
68. Hinton DE, Couch JA. Architectural pattern, tissue and cellular morphology in livers of fishes: relationship to experimentally-induced neoplastic responses. *EXS*. 1998;86:141-164.
69. Hampton JA, Lantz RC, Hinton DE. Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) liver: III. Morphometric analysis of parenchyma, stroma, and component cell types. *Am J Anat*. 1989;185(1):58-73.
70. Weis P. Hepatic ultrastructure in two species of normal, fasted and gravid teleost fishes. *Am J Anat*. 1972;133(3):317-331.
71. Goessling W, Sadler KC. Zebrafish: an important tool for liver disease research. *Gastroenterology*. 2015;149(6):1361-1377.
72. Howarth DL, Vacaru AM, Tsedensodnom O, et al. Alcohol disrupts endoplasmic reticulum function and protein secretion in hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res*. 2012;36(1):14-23.
73. Braunbeck T, Gorge G, Storch V, Nagel R. Hepatic steatosis in zebra fish (*Brachydanio rerio*) induced by long-term exposure to gamma-hexachlorocyclohexane. *Ecotoxicol Environ Saf*. 1990;19(3):355-374.
74. Noel ES, Reis MD, Arain Z, Ober EA. Analysis of the Albumin/alpha-Fetoprotein/Afamin/Group specific component gene family in the context of zebrafish liver differentiation. *Gene Expr Patterns*. 2010;10(6):237-243.
75. Hampton JA, Lantz RC, Goldblatt PJ, Lauren DJ, Hinton DE. Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) liver: II. The biliary system. *Anat Rec*. 1988;221(2):619-634.
76. Yin C, Evason KJ, Maher JJ, Stainier DY. The basic helix-loop-helix transcription factor, heart and neural crest derivatives expressed transcript 2, marks hepatic stellate cells in zebrafish: analysis of stellate cell entry into the developing liver. *Hepatology*. 2012;56(5):1958-1970.
77. Sakaguchi TF, Sadler KC, Crosnier C, Stainier DY. Endothelial signals modulate hepatocyte apicobasal polarization in zebrafish. *Curr Biol*. 2008;18(20):1565-1571.
78. Passeri MJ, Cinaroglu A, Gao C, Sadler KC. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. *Hepatology*. 2009;49(2):443-452.
79. Tsedensodnom O, Vacaru AM, Howarth DL, Yin C, Sadler KC. Ethanol metabolism and oxidative stress are required for unfolded protein response activation and steatosis in zebrafish with alcoholic liver disease. *Dis Model Mech*. 2013;6(5):1213-1226.
80. Semova I, Carten JD, Stombaugh J, et al. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. *Cell Host Microbe*. 2012;12(3):277-288.
81. Matthews RP, Lorent K, Maoral-Mobias R, et al. TNFalpha-dependent hepatic steatosis and liver degeneration caused by mutation of zebrafish S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Development*. 2009;136(5):865-875.
82. Landgraf K, Schuster S, Meusel A, et al. Short-term overfeeding of zebrafish with normal or high-fat diet as a model for the development of metabolically healthy versus unhealthy obesity. *BMC Physiol*. 2017;17(1):4.
83. Hammes TO, Pedrosa GL, Hartmann CR, et al. The effect of taurine on hepatic steatosis induced by thioacetamide in zebrafish (*Danio rerio*). *Dig Dis Sci*. 2012;57(3):675-682.
84. Schneider AC, Gregorio C, Uribe-Cruz C, et al. Chronic exposure to ethanol causes steatosis and inflammation in zebrafish liver. *World J Hepatol*. 2017;9(8):418-426.
85. Laale HW. Ethanol induced notochord and spinal cord duplications in the embryo of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Exp Zool*. 1971;177(1):51-64.

86. Schneider AC, Rico EP, de Oliveira DL, et al. Lactobacillus rhamnosus GG Effect on Behavior of Zebrafish During Chronic Ethanol Exposure. *Biores Open Access*. 2016;5(1):1-5.
87. Holmes RS, Duley JA, Algar EM, Mather PB, Rout UK. Biochemical and genetic studies on enzymes of alcohol metabolism: the mouse as a model organism for human studies. *Alcohol Alcohol*. 1986;21(1):41-56.
88. Brandon-Warner E, Schrum LW, Schmidt CM, McKillop IH. Rodent models of alcoholic liver disease: of mice and men. *Alcohol*. 2012;46(8):715-725.
89. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2008;48(6):993-999.
90. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, et al. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol*. 2014;14:189.
91. Cummings JH, Antoine JM, Azpiroz F, et al. PASSCLAIM--gut health and immunity. *Eur J Nutr*. 2004;43 Suppl 2:II118-II173.
92. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*. 2012;489(7415):231-241.
93. Scaldaferri F, Pizzoferrato M, Gerardi V, Lopetuso L, Gasbarrini A. The gut barrier: new acquisitions and therapeutic approaches. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46 Suppl:S12-17.
94. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):799-809.
95. Barbara G, Feinle-Bisset C, Ghoshal UC, et al. The Intestinal Microenvironment and Functional Gastrointestinal Disorders. *Gastroenterology*. 2016.
96. Manresa MC, Taylor CT. Hypoxia Inducible Factor (HIF) Hydroxylases as Regulators of Intestinal Epithelial Barrier Function. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2017;3(3):303-315.
97. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(1):3-20; quiz 21-22.
98. Wada M, Tamura A, Takahashi N, Tsukita S. Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na⁺ flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition. *Gastroenterology*. 2013;144(2):369-380.
99. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(4):285-293.
100. Balda MS, Matter K. Tight junctions as regulators of tissue remodelling. *Curr Opin Cell Biol*. 2016;42:94-101.
101. FARQUHAR MG, PALADE GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*. 1963;17:375-412.
102. Diamond JM. Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist*. 1977;20(1):10-18.
103. Stuckenholz C, Lu L, Thakur P, Kaminski N, Bahary N. FACS-assisted microarray profiling implicates novel genes and pathways in zebrafish gastrointestinal tract development. *Gastroenterology*. 2009;137(4):1321-1332.
104. Bagnat M, Cheung ID, Mostov KE, Stainier DY. Genetic control of single lumen formation in the zebrafish gut. *Nat Cell Biol*. 2007;9(8):954-960.
105. Colegio OR, Van Itallie CM, McCrean HJ, Rahner C, Anderson JM. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283(1):C142-147.
106. Inai T, Kamimura T, Hirose E, Iida H, Shibata Y. The protoplasmic or exoplasmic face association of tight junction particles cannot predict paracellular permeability or heterotypic claudin compatibility. *Eur J Cell Biol*. 2010;89(7):547-556.
107. Van Itallie CM, Fanning AS, Anderson JM. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(6):F1078-1084.

108. Powell GT, Wright GJ. Genomic organisation, embryonic expression and biochemical interactions of the zebrafish junctional adhesion molecule family of receptors. *PLoS One*. 2012;7(7):e40810.
109. Scheiermann C, Meda P, Aurrand-Lions M, et al. Expression and function of junctional adhesion molecule-C in myelinated peripheral nerves. *Science*. 2007;318(5855):1472-1475.
110. Rahman K, Desai C, Iyer SS, et al. Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol. *Gastroenterology*. 2016.
111. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, et al. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):773-786.e771-777.
112. Thorleifsson G, Holm H, Edvardsson V, et al. Sequence variants in the CLDN14 gene associate with kidney stones and bone mineral density. *Nat Genet*. 2009;41(8):926-930.
113. Weber CR, Nalle SC, Tretiakova M, Rubin DT, Turner JR. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab Invest*. 2008;88(10):1110-1120.
114. Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 2007;56(1):61-72.
115. Weber CR, Raleigh DR, Su L, et al. Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity. *J Biol Chem*. 2010;285(16):12037-12046.
116. Ménard S, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol*. 2010;3(3):247-259.
117. Lambertz J, Weiskirchen S, Landert S, Weiskirchen R. Fructose: A Dietary Sugar in Crosstalk with Microbiota Contributing to the Development and Progression of Non-Alcoholic Liver Disease. *Front Immunol*. 2017;8:1159.
118. Mouzaki M, Allard JP. The role of nutrients in the development, progression, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46(6):457-467.
119. Hartmann P, Chen P, Wang HJ, et al. Deficiency of intestinal mucin-2 ameliorates experimental alcoholic liver disease in mice. *Hepatology*. 2013;58(1):108-119.
120. Rao RK, Seth A, Sheth P. Recent Advances in Alcoholic Liver Disease I. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286(6):G881-884.
121. Wang Y, Kirpich I, Liu Y, et al. Lactobacillus rhamnosus GG treatment potentiates intestinal hypoxia-inducible factor, promotes intestinal integrity and ameliorates alcohol-induced liver injury. *Am J Pathol*. 2011;179(6):2866-2875.
122. Ochoa M, Lallès JP, Malbert CH, Val-Laillet D. Dietary sugars: their detection by the gut-brain axis and their peripheral and central effects in health and diseases. *Eur J Nutr*. 2015;54(1):1-24.
123. Sabaté JM, Jouët P, Harnois F, et al. High prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in patients with morbid obesity: a contributor to severe hepatic steatosis. *Obes Surg*. 2008;18(4):371-377.
124. Bellot P, Francés R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int*. 2013;33(1):31-39.
125. Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, et al. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology*. 2010;139(4):1246-1256, 1256.e1241-1245.
126. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol*. 2014;60(1):197-209.

127. Szabo G, Bala S. Alcoholic liver disease and the gut-liver axis. *World J Gastroenterol*. 2010;16(11):1321-1329.
128. Spruss A, Bergheim I. Dietary fructose and intestinal barrier: potential risk factor in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem*. 2009;20(9):657-662.
129. Volynets V, Louis S, Pretz D, et al. Intestinal Barrier Function and the Gut Microbiome Are Differentially Affected in Mice Fed a Western-Style Diet or Drinking Water Supplemented with Fructose. *J Nutr*. 2017;147(5):770-780.
130. Yan AW, Fouts DE, Brandl J, et al. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2011;53(1):96-105.
131. Elamin E, Masclee A, Troost F, et al. Ethanol impairs intestinal barrier function in humans through mitogen activated protein kinase signaling: a combined in vivo and in vitro approach. *PLoS One*. 2014;9(9):e107421.
132. Dornas WC, de Lima WG, Pedrosa ML, Silva ME. Health implications of high-fructose intake and current research. *Adv Nutr*. 2015;6(6):729-737.
133. Pendyala S, Neff LM, Suárez-Fariñas M, Holt PR. Diet-induced weight loss reduces colorectal inflammation: implications for colorectal carcinogenesis. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(2):234-242.
134. Busserolles J, Gueux E, Rock E, Demigné C, Mazur A, Rayssiguier Y. Oligofructose protects against the hypertriglyceridemic and pro-oxidative effects of a high fructose diet in rats. *J Nutr*. 2003;133(6):1903-1908.
135. Cani PD, Everard A. Keeping gut lining at bay: impact of emulsifiers. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(6):273-274.
136. Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, et al. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*. 2015;519(7541):92-96.
137. Tulstrup MV, Christensen EG, Carvalho V, et al. Antibiotic Treatment Affects Intestinal Permeability and Gut Microbial Composition in Wistar Rats Dependent on Antibiotic Class. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144854.
138. Utzeri E, Usai P. Role of non-steroidal anti-inflammatory drugs on intestinal permeability and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2017;23(22):3954-3963.
139. Brandtzaeg P. The gut as communicator between environment and host: immunological consequences. *Eur J Pharmacol*. 2011;668 Suppl 1:S16-32.
140. Lima AA, Soares AM, Lima NL, et al. Effects of vitamin A supplementation on intestinal barrier function, growth, total parasitic, and specific *Giardia* spp infections in Brazilian children: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;50(3):309-315.
141. Maciel AA, Oriá RB, Braga-Neto MB, et al. Role of retinol in protecting epithelial cell damage induced by *Clostridium difficile* toxin A. *Toxicon*. 2007;50(8):1027-1040.
142. Kong J, Zhang Z, Musch MW, et al. Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;294(1):G208-216.
143. Guarner F, Khan AG, Garisch J, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics October 2011. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46(6):468-481.
144. Ford AC, Quigley EM, Lacy BE, et al. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2014;109(10):1547-1561; quiz 1546, 1562.
145. Pachikian BD, Essaghir A, Demoulin JB, et al. Prebiotic approach alleviates hepatic steatosis: implication of fatty acid oxidative and cholesterol synthesis pathways. *Mol Nutr Food Res*. 2013;57(2):347-359.
146. Plöger S, Stumpff F, Penner GB, et al. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1258:52-59.

147. Verna EC, Lucak S. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Therap Adv Gastroenterol*. 2010;3(5):307-319.
148. Karczewski J, Troost FJ, Konings I, et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;298(6):G851-859.
149. Benson K, Cramer S, Galla HJ. Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond. *Fluids Barriers CNS*. 2013;10(1):5.
150. Li N, Lewis P, Samuelson D, Liboni K, Neu J. Glutamine regulates Caco-2 cell tight junction proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287(3):G726-733.
151. De Santis S, Cavalcanti E, Mastronardi M, Jirillo E, Chieppa M. Nutritional Keys for Intestinal Barrier Modulation. *Front Immunol*. 2015;6:612.
152. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;11(9):821-834.
153. van Wijck K, Verlinden TJ, van Eijk HM, et al. Novel multi-sugar assay for site-specific gastrointestinal permeability analysis: a randomized controlled crossover trial. *Clin Nutr*. 2013;32(2):245-251.
154. Bates DW, Parsonnet J, Ketchum PA, et al. Limulus amoebocyte lysate assay for detection of endotoxin in patients with sepsis syndrome. AMCC Sepsis Project Working Group. *Clin Infect Dis*. 1998;27(3):582-591.
155. Bergheim I, Weber S, Vos M, et al. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *J Hepatol*. 2008;48(6):983-992.
156. Thuy S, Ladurner R, Volynets V, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *J Nutr*. 2008;138(8):1452-1455.
157. Strutz F, Heller G, Krasemann K, Krone B, Müller GA. Relationship of antibodies to endotoxin core to mortality in medical patients with sepsis syndrome. *Intensive Care Med*. 1999;25(5):435-444.
158. Bennett-Guerrero E, Barclay GR, Weng PL, et al. Endotoxin-neutralizing capacity of serum from cardiac surgical patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2001;15(4):451-454.
159. Lewis K, Lutgendorff F, Phan V, Söderholm JD, Sherman PM, McKay DM. Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(7):1138-1148.
160. Wang HB, Wang PY, Wang X, Wan YL, Liu YC. Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription. *Dig Dis Sci*. 2012;57(12):3126-3135.
161. Johansson ME, Gustafsson JK, Holmén-Larsson J, et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2014;63(2):281-291.
162. Sellmann C, Priebs J, Landmann M, et al. Diets rich in fructose, fat or fructose and fat alter intestinal barrier function and lead to the development of nonalcoholic fatty liver disease over time. *J Nutr Biochem*. 2015;26(11):1183-1192.
163. Wilson JM, Bunte RM, Carty AJ. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2009;48(6):785-789.
164. Kottra G, Frömter E. Functional properties of the paracellular pathway in some leaky epithelia. *J Exp Biol*. 1983;106:217-229.
165. Rao R. Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2009;50(2):638-644.
166. Mason CM, Dobard E, Kolls J, Nelson S. Effect of alcohol on bacterial translocation in rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998;22(8):1640-1645.

167. Fleming S, Toratani S, Shea-Donohue T, Kashiwabara Y, Vogel SN, Metcalf ES. Pro- and anti-inflammatory gene expression in the murine small intestine and liver after chronic exposure to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001;25(4):579-589.
168. Rao RK. Acetaldehyde-induced increase in paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998;22(8):1724-1730.
169. Ma TY, Nguyen D, Bui V, Nguyen H, Hoa N. Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol*. 1999;276(4 Pt 1):G965-974.
170. Wang Y, Tong J, Chang B, Wang B, Zhang D. Effects of alcohol on intestinal epithelial barrier permeability and expression of tight junction-associated proteins. *Mol Med Rep*. 2014;9(6):2352-2356.
171. Jin R, Willment A, Patel SS, et al. Fructose induced endotoxemia in pediatric nonalcoholic Fatty liver disease. *Int J Hepatol*. 2014;2014:560620.