CAMILA IDELÍ MORALES FÉNERO

**ESTUDO DO MODELO DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL
INDUZIDA POR TNBS EM LARVAS DE
*ZEBRAFISH (Danio rerio)***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

CAMILA IDELÍ MORALES FÉNERO

**ESTUDO DO MODELO DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL
INDUZIDA POR TNBS EM LARVAS DE
*ZEBRAFISH (Danio rerio)***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Niels Olsen Saraiva Câmara

Versão Corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Fénero, Camila Ideli Morales.

Estudo do modelo de inflamação intestinal induzida pelo TNBS em Larvas de *Zebrafish* (*Danio rerio*) / Camila Ideli Morales Fénero. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Inflamação intestinal.

Versão do título para o inglês: Study of the intestinal inflammation model induced by TNBS in *Zebrafish* Larvae (*Danio rerio*).

1. Inflamação 2. Colite 3. Intestino de animal 4. Modelos animais de doenças 5. Peixes 6. Doença de Crohn I. Câmara, Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0103/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Camila Ideli Morales Fénero.

Título da Dissertação: Estudo do modelo de inflamação intestinal induzida pelo TNBS em Larvas de *Zebrafish* (*Danio rerio*).

Orientador(a): Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **119** nas fls. **11** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Niels Olsen Saraiva Camara**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Avaliação do modelo de colite com TNBS no Zebrafish*" do qual participam o(s) aluno(s) **Camila Morales Fénero** e os pesquisadores **Vanessa Marais Freitas, Monica Lopes Ferreira, Carla Lima da Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **07.10.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 08 de outubro de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

“All we have to decide is what to do with the time that is given to us”.

Gandalf, the Gray.

AGRADECIMENTOS

Em este trabalho quero agradecer primeiro a minha família, que sempre tem sido minha fonte de forças e apoio constante mesmo quando longe, e estão sempre presente nas minhas decisões. A Raphael, que me acompanha dia a dia, e suportou comigo os bons e os maus momentos durante este tempo. A meus amigos lá no Chile, principalmente Catalina que sempre é um pilar científico e um apoio para mim.

Agradeço ao Professor Niels pela oportunidade de apostar em um projeto totalmente desconhecido partindo de zero, e pelas constantes ajudas a cada conflito ou problema que tive que enfrentar para progredir no meu projeto. À Professora Alicia pela boa disponibilidade sempre para colaborar com a sua experiência. Ao pessoal do laboratório pelas ajudas e conselhos técnicos, em especial a Izabella que tem sido minha mão direita e minha maior companhia em este último tempo.

Agradeço também a todas as pessoas que participaram de alguma forma nos começos e durante este projeto: a Professora Patricia Castelucci, pela doação de anticorpos para alguns experimentos e por seus conselhos e experiência; a Meire, por sempre dar uma ajuda; a Profa. Vanessa Freitas e Heydi Noriega, que nunca fecharam as portas quando precisei; a Leda, pela confiança e o apoio; a Mônica Lopes Ferreira e Carla Lima, por disponibilizar os animais para a realização dos experimentos; a Victor Avila e a Profa. Clarice, que disponibilizaram o seu laboratório para a técnica histológica; a Mario Cruz, pela ajuda no confocal (CEFAP); ao pessoal da biblioteca que revisou este manuscrito. Também agradeço à FAPESP e a CNPq (134660/2013-7) pela ajuda econômica para realizar este trabalho. E aos peixinhos que doaram sua vida para cada experimento.

RESUMO

Morales C. Estudo do Modelo de Inflamação Intestinal Induzida por TNBS em Larvas de *Zebrafish* (*Danio rerio*) [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

As doenças inflamatórias intestinais (IBDs) são caracterizadas por uma desregulação na resposta imune inata e adaptativa com a produção elevada de diversas citocinas e quimiocinas. Essa sinalização molecular promove a infiltração e ativação de diversas células do sistema imune, provocando uma reação inflamatória na mucosa intestinal. Nos últimos anos, há uma intensa busca por terapias efetivas que modulem especificamente a inflamação e a resposta imune envolvida nas IBD. O *zebrafish*, um animal de experimentação usado principalmente pela área da biologia do desenvolvimento, tem emergido como um novo modelo para o estudo de doenças inflamatórias e autoimunes, devido a sua alta fertilidade e curto período de desenvolvimento, além de sua fácil manipulação e indução de doenças por incubação de drogas na água, o que diminui o estresse na manipulação do animal e os custos de testes farmacológicos. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) são produtos liberados a partir da fermentação de carboidratos complexos pela microbiota intestinal, que possuem papéis anti-inflamatórios e ação inibitória sobre histona deacetilases, e aparecem como uma das possíveis terapias contra doenças inflamatórias. Nosso laboratório implementou o modelo de inflamação intestinal induzido pelo ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) em larvas de *zebrafish* como o objetivo de avaliar alterações morfofuncionais e o microambiente inflamatório causados pelo químico, e posteriormente, usar os AGCCs como recurso terapêutico para tratar a inflamação. Larvas selvagens de 3 dpf foram submersas em três concentrações de TNBS (20-40-60 µg/ml) até os 4, 6, 8 e 10 dpf, onde foram coletadas para ensaios funcionais, processamento histológico, imunofluorescência e extração de RNA/DNA. Também foi utilizada a linhagem Tg (*Lys:DSRED*) para avaliação *in vivo* da resposta imunológica inata. A administração do TNBS provocou aumento da mortalidade de forma dose-dependente e em direta relação ao tempo de exposição. Análise funcional com coloração de *alcian blue* não detectou mudanças na produção de muco nem no número de células caliciformes, enquanto, a coloração *in vivo* com *neutral red* resultou em uma diminuição da intensidade e da área colorida no intestino médio dos tratados com TNBS em relação ao controle. O efeito no intestino incluiu dilatação do lúmen com diminuição da espessura da parede intestinal e alisamento das vilosidades intestinais. No perfil inflamatório observou-se um aumento de células mielóides infiltrantes e um aumento de citocinas pró-inflamatórias após exposição ao reagente, assim como disbiose da microbiota. Finalmente, teve uma tendência ao aumento da apoptose e à diminuição na proliferação no intestino dos animais expostos ao TNBS. O tratamento com ácidos graxos de cadeia curta em coadministração ao TNBS induz alta mortalidade em concentrações acima de 10 mM, mas se observa ação anti-inflamatória nesta mesma concentração e uma modificação a microbiota. Portanto, a administração de TNBS em larvas de *zebrafish* produz uma inflamação intestinal aguda e serve como modelo de inflamação da imunidade inata para o estudo de novas terapias. Os AGCCs têm um efeito tóxico a altas concentrações e só induz um efeito anti-inflamatório em concentrações menores.

Palavras-chave: Inflamação. Colite. Intestino de animal. Modelos animais de doenças. Peixes. Doença de Crohn. Colite ulcerativa.

ABSTRACT

Morales C. Study of the Intestinal Inflammation Model Induced by TNBS in Zebrafish Larvae (*Danio rerio*) [Masters Thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

The inflammatory bowel diseases (IBDs) are characterized by a dysfunction in the innate and adaptive immune response with high production of cytokines and chemokines. This molecular signals promotes the infiltration and activations of many cells of the immune system, causing an inflammatory reaction in the intestinal mucosa. Nowadays, there is an intensive search for effective therapies that specifically modulate inflammation and the immune response involved in IBDs. The zebrafish, an experimental animal used mainly in developmental biology it has emerged as a new model for the study of inflammatory and autoimmune diseases, this because its high fertility and fast development, and its easy handling and induction of disease by incubating drugs in water, which decrease stress in the animal's manipulation and pharmacological testing costs. The Short Chain Fat Acids (SCFAs) are products released from the fermentation of complex carbohydrates by the intestinal microbiota, which have anti-inflammatory roles and inhibitory action on histone deacetylases, and appear as one of the possible therapies for inflammatory diseases. Our lab implemented the intestinal inflammation model induced by trinitrobenzenesulfonic (TNBS) in zebrafish larvae with the objective of evaluate morphological changes and the inflammatory micro-environment caused by the chemical, and subsequently use the SCFAs as therapeutic resource to treat inflammation. Wild-type 3 dpf (days post fertilization) larvae were submerged in three concentrations of TNBS (20-40-60 mg/ml) to 4, 6, 8 and 10 dpf, when were collected for functional assays, histological analysis, immunofluorescence and RNA/DNA extraction. It was also used the Tg(*Lys:DSRED*) transgenic line for *in vivo* assessment of the innate immune response. The administration of TNBS caused increased mortality in a dose-dependent manner and in direct relation to the exposure time. Functional analysis with alcian-blue staining did not detect changes in the production of mucus or in goblet cells number, while the *in vivo* staining with neutral-red resulted in a decrease in the intensity and the colored area in the mid-intestine of TNBS-treated in relation to control animals. The effect in the gut included lumen dilation with reduced thickness of the intestinal wall and straightening the intestinal folds. In the inflammatory profile was observed an increase in infiltrating myeloid cells and increased proinflammatory cytokines following exposure to the reagent, and dysbiosis of the microbiota. Finally, there was a trend towards increased apoptosis and decreased proliferation in the gut of animals exposed to TNBS. Co-administration of SCFA induces mortality in concentrations above 10 mM, but is possible to observer anti-inflammatory action by this concentration. Therefore, the administration of TNBS in zebrafish larvae produces an acute intestinal inflammation and serves as inflammation model of innate immunity for the study of new therapies. The SCFAs has a toxic effect at high concentrations but induces an anti-inflammatory effect at lower concentrations.

Keywords: Inflammation. Colitis. Animal intestine. Animal models of disease. Fish. Crohn's disease. Ulcerative colitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - O zebrafish contém basicamente a mesma estrutura anatômica que os animais superiores.	22
Figura 2 - Hematopoiese tardia no Zebrafish	23
Figura 3 - O intestino do Zebrafish	26
Figura 4 - Efeito do ácido 2,4,6- trinitrobenzenossulfônico (TNBS) na taxa de sobrevivência de larvas de zebrafish.	40
Figura 5 - Análisis in vivo de larvas tratadas com TNBS.....	41
Figura 6 - Exame histopatológico de larvas tratadas com TNBS	43
Figura 7 - Exposição ao TNBS origina uma perda da função endocítica no intestino médio sem mudanças na produção de muco.	44
Figura 8 - O TNBS não altera o número de neurônios entéricos, mas sim sua distribuição.....	45
Figura 9 - O TNBS induz apoptose e perda da proliferação no intestino de larvas de zebrafish	46
Figura 10 - Administração de TNBS induz aumento de citocinas inflamatórias.	47
Figura 11 - A exposição ao TNBS produz um maior recrutamento de células mielóides.....	48
Figura 12 - A exposição ao TNBS muda a composição da microbiota	49
Figura 13 - Tratamento com ácidos graxos de cadeia curta melhora a sobrevida de animais expostos ao TNBS	50
Figura 14 - Tratamento com ácidos graxos de cadeia curta induz efeitos anti-inflamatórios e modifica a microbiota	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistema de score de enterocolite para avaliação histológica...	42
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AGM - Aorta-Gônadas-Mesonefro
ALM - Mesodermo latera-anterior
ANOVA - Analysis of Variance
APC - Células Apresentadoras de Antígeno
ATF6 - Activating Transcription Factor 6
CCFA - Cronh's & Colitis Foundation of America
CD - Crohn's Disease
CHT - Tecido Hematopoietico Caudal
COX-2 - Ciclooxygenase-2
DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole
DEPC - Diethylpyrocarbonate
DMSO - Dimethyl Sulfoxide
DNA - Deoxyribonucleic acid
dpf - Dias pós-fertilização
DSS - Dextran Sodium Sulfate
DTT - Dithiothreitol
ECL - Enhanced Chemiluminescence
EDTA - Ethylene-diamine-tetraacetic acid
ELAV - Embryonic lethal abnormal visual
FOXP3 - Forkhead box P3
gata1 - Erythroid transcription factor
GF - Germ Free
GPR43 - G-protein coupled receptor 43
HDAC - Histona desacetilase
hpf - Horas pós-fertilização
HSCs - Hematopoietic Stem Cells
IB - Immuno-Blocking

IBD - Inflammatory Bowel Diseases
IECs – Intestinal Epithelial Cells
ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular
ICM - Massa Celular Intermediária
Ig - Imunoglobulina
IL - Interleucina
INF- γ - Interferon-gamma
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
I κ B α - Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
LMP - Low Melting Point
MHC – Complexo Maior de Histocompatibilidade
MMLV - Moloney Murine Leukemia Virus
NEMO - NF-kappa-B essential modulator
NF κ B - Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK - Natural Killer
NOD2 - Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
NSAID - Nonsteroidal anti-inflammatory drug
PBS - Tampão Fosfato Salino
PFA - Paraformaldeído
PLM - Mesodermo lateral-posterior
PTU - Phenylthiourea
qPCR - Real-time polymerase chain reaction
Rag - Recombination-activating gene
RIPA - Radioimmunoprecipitation assay buffer
ROS - Espécies reativas de oxigênio
rRNA - Ribosomal ribonucleic acid
rTdT - Terminal deoxynucleotidyl transferase
runx1 - Runt-related transcription factor
SFB - Soro Fetal Bovino
SNE - Sistema Nervoso Entérico
spf - Semanas pós-fertilização
STAT - Signal Transducer and Activator of Transcription
TBST - Tris-Buffered Saline Tween 20 buffer

Tbx21 - T-box 21

TCR - T-cell receptor

Th1/2/17 - T-helper 1/2/17

TNBS - Ácido 2,4,6- trinitrobenzenossulfônico

TNF α - Fator de necrose tumoral alpha

TUNEL - Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling

UC - Ulcerative Colitis

UPR - Unfolded protein response

VCAM-1 - Molécula de adesão celular-1

WB - Western Blott

XPB1 - X-box binding protein 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Doenças Inflamatórias Intestinais	19
2.2 O Zebrafish	21
2.2.1 Sistema Imune no Zebrafish.....	23
2.2.2 Organização do Trato Intestinal do Zebrafish.....	24
2.2.3 Microbiota Intestinal no Zebrafish	25
2.3 O Zebrafish como Modelo de Doença Inflamatória Intestinal.....	27
2.4 Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs).....	29
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Embriões.....	33
4.2 Indução da colite.....	33
4.3 Visualização <i>in vivo</i>	33
4.4 Curva de Sobrevida	34
4.5 Análise Histológica	34
4.6 Análise da Função Intestinal	34
4.6.1 Produção de muco e atividade endocítica.....	34
4.6.2 Sistema Nervoso Entérico	35
4.6.3 Detecção de Proliferação Celular e Apoptose.....	36
4.7 Quantificação de Moléculas Pró e Anti-Inflamatórias.....	36
4.8 Estudo da Microbiota.....	37
4.9 Tratamento com Ácidos Graxos de Cadeia Curta	38
4.10 Análise Estatística	39

5 RESULTADOS	40
5.1 Padronização da concentração do TNBS e análise da ação direta em larvas de <i>zebrafish</i>.....	40
5.2 Avaliação do estado histopatológico e funcional do intestino de larvas de <i>zebrafish</i> expostas a TNBS.	42
5.3 Determinação do estado inflamatório das larvas de <i>zebrafish</i> expostas a TNBS.	47
5.4 Análise da microbiota em peixes tratados com TNBS	49
5.5 Tratamento com Ácidos Graxos de Cadeia Curta	49
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS*	58
ANEXOS	71
A – Artigos Publicados.....	71
B - Artigos em Revisão	71
C – Artigos em Redação	71

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As doenças inflamatórias intestinais, do inglês *inflammatory bowel diseases* (IBDs), são um grupo de condições inflamatórias crônicas remitentes do intestino delgado e do cólon(1), que são resultado de interações desreguladas entre a microbiota comensal e o sistema imune, desencadeadas pela susceptibilidade genética do indivíduo afetado e por fatores externos, como dieta, estresse, entre outros (2, 3). A CCFA (*Cronh's & Colitis Foundation of America*)(4) estima que as IBDs afetem tanto a homens quanto mulheres, e são prevalentes nas etnias caucásicas comprometendo cerca de 1,4 milhões de americanos.

Dada a importância de estas doenças no mundo inteiro, hoje em dia estão sendo realizadas inúmeras pesquisas tentando responder as perguntas não respondidas sobre a fisiopatologia, vias envolvidas e novas terapias para tratar estas condições inflamatórias. Embora os modelos mais utilizados são, principalmente, modelos de mamíferos, como coelhos, ratos e camundongos(5, 6), existem outros modelos que têm vindo a ganhar terreno no domínio das doenças inflamatórias(7-9). O *zebrafish* é um pequeno peixe tropical de água doce usado principalmente como um modelo vertebrado em biologia do desenvolvimento, por causa de sua característica alta fecundidade e tempo curto de desenvolvimento, que acontece *ex vivo*, claridade óptica em estados embrionários e larval, manipulação genética relativamente fácil e baixo custo de produção. Além disso, o genoma do *zebrafish* está totalmente mapeado (<http://www.sanger.ac.uk/resources/zebrafish/>)(10), tendo ao redor de 70% de ortólogos de genes humanos e possui características anatômicas comumente encontradas em mamíferos. Tem um sistema imune inato funcional às 48 horas pós-fertilização (hpf) e um sistema imune adaptativo maduro ao redor das 4-6 semanas pós-fertilização (spf). Todas estas características fazem o *zebrafish* um excelente modelo para o estudo de patologias inflamatórias.

Este estudo quis usar estes atributos do *zebrafish* com o objetivo de estabelecer um modelo de inflamação intestinal e ter uma nova ferramenta para o estudo da inflamação e para avaliar produtos e fármacos/drogas em busca de novas terapias para o tratamento de doenças inflamatórias. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) acetato, propionato e butirato, são conhecidos como produtos metabólicos da

fermentação de bactérias anaeróbicas ([11](#)), e tem um papel importante como combustível para as células epiteliais intestinais ([11](#), [12](#)). Nos últimos anos estes AGCCs tem sido estudados por suas capacidades imunomoduladoras, agindo em leucócitos e células endoteliais, regulando a produção de citocinas (TNF- α , IL-2, IL-6 and IL-10), eicosanóides e quimiocinas (e.g., MCP-1 and CINC-2)([13](#)), além de induzir a produção de células T reguladoras (Tregs)([14](#), [15](#)). Porém, não existe evidência do uso dos AGCCs no *zebrafish*, de modo que adotamos estes compostos como possível tratamento para a inflamação intestinal gerada pelo TNBS.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doenças Inflamatórias Intestinais

As *inflammatory bowel diseases* (IBDs), são uma série de condições inflamatórias crônicas do intestino delgado e do cólon ([1](#)), que é resultado de interações de quatro fatores principais: desequilíbrio na resposta do sistema imune frente à microbiota comensal, susceptibilidade genética do indivíduo e ação de fatores externos ([2](#), [3](#)). A Doença de Crohn (CD) e a Colite Ulcerativa (UC) são as principais formas de IBDs, sendo a primeira uma doença inflamatória crônica que cobre todo o trato gastrointestinal que pode afetar desde a boca até o ânus, mas frequentemente ataca o íleo, deixando zonas normais entre áreas lesionadas (lesões salteadas), no entanto, pode comprometer a espessura completa da parede intestinal (lesão transmural). Em contraste, a UC está limitada ao cólon, afetando somente a mucosa, de forma contínua. Ambas podem apresentar sintomas como dor abdominal, vômitos, diarreia, sangramento retal e perda de peso. Além disso, podem apresentar manifestações extra-intestinais, incluindo anemia, anomalias no fígado, artrite, manifestações cutâneas, entre outras ([16](#), [17](#)).

Embora a etiologia da CD e da UC não seja completamente compreendida, existem várias anormalidades do sistema imune que podem contribuir ao desenvolvimento dessas enfermidades:

- **Defeitos na Imunidade Inata:** Expressão defeituosa de moléculas como as defensinas, que resulta em um aumento da carga comensal de bactérias que invadem o epitélio intestinal([18-20](#)). Além disso, polimorfismos do receptor de reconhecimento de padrões NOD2 estão associados a alguns tipos de CD ([21](#), [22](#)).
- **Respostas Th17 e Th1 anormais:** Polimorfismos do receptor IL-23 estão associados a um risco maior de desenvolver IBD, o que é consistente com a ativa resposta Th17 nas partes afetadas do intestino, porque IL-23 é requerido para a diferenciação e manutenção da resposta Th17([23](#), [24](#)). A CD é também caracterizada por uma inflamação granulomatosa induzida pelo INF- γ , produzido pelas células Th1([25](#)).

- **Função defeituosa das células T reguladoras:** Camundongos deficientes em células T reguladoras por deleção dos genes IL-2 ou IL-2R, ou o gene FOXP3, desenvolvem IBD. Deficiência do fator de transcrição Tbx21 (T-bet em camundongo) no sistema imune inato leva a uma exagerada produção do fator de necrose tumoral (TNF) pelas células dendríticas que junto à ausência das células T reguladoras cria um estado de inflamação crônica similar à colite ulcerativa ([26](#), [27](#))
- **Polimorfismos de genes associados com macro autofagia e a resposta a proteínas mal enoveladas (*Unfolded Protein Response - UPR*) ao estresse do retículo endoplasmático são fatores de risco para IBD:** Evidência experimental sugere uma conexão ente as IBD, variantes de UPR e genes de autofagia relacionados a uma secreção diminuída de enzimas antimicrobianas e defensinas por parte das células de Paneth ([28](#), [29](#)).

Existe uma grande lista de modelos químicos e abordagens genéticas, que foram criados para o estudo de estas doenças, baseados principalmente no uso de mamíferos como animais de experimentação. Esses modelos mimetizam vários aspectos da doença como quebra da barreira epitelial e repostas imunes debilitadas ([30](#), [31](#)). Entre os mais usados ou conhecidos dentro dos modelos químicos está o hapteno oxazolona, a qual é administrada em uma dose única por via retal dissolvida em etanol, resultando em uma colite aguda de uma duração de 10 dias. O perfil imunológico desse modelo é semelhante à UC, caracterizado por uma resposta dependente de Th2 na qual as células T do tecido lesado são estimuladas a uma grande produção de IL-4 e IL-5, e que pode ser tratado com anticorpos anti-IL-4 ([32](#), [33](#)).

Outro modelo de IBD muito utilizado envolve a administração de sulfato de sódio dextrano (DSS) de baixo peso molecular na água de beber de camundongos, levando a dano epitelial e uma robusta resposta inflamatória no colón de vários dias de duração. Variações nos tempos e na dose de administração podem ser usadas para gerar modelos de lesão aguda, lesão aguda seguida de reparo, e lesão crônica. No exame *post-mortem*, na lesão aguda, se observam múltiplas erosões e manifestações inflamatórias incluindo abscessos crípticos. Enquanto os animais que desenvolvem a doença crônica, apresentam sinais de erosão, regeneração da mucosa, displasia, encurtamento do intestino grosso e formação de folículos linfóides. As populações da

microbiota comensal aumentam consideravelmente, em ambos os tipos de lesão (34-36).

Um último modelo químico conhecido de colite em mamíferos é induzido pela administração de 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS) que leva ao desenvolvimento de vários aspectos da inflamação crônica intestinal, incluindo uma alta infiltração de células imunes, como linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, macrófagos, granulócitos e mastócitos, criptas irregulares e perda de células caliciformes. Além disso, é observado um elevado nível sérico de citocinas pró-inflamatórias como a IL-17, INF- γ , IL-1 β , e MIP-1 α , implicado na resposta Th1/Th17 característica da CD(37, 38).

Dentro das aproximações genéticas existe uma lista muito longa para discorrer, camundongos *Tbx21*^{-/-} *Rag2*^{-/-} desenvolvem uma forma espontânea de UC (39, 40). A deleção específica do modulador essencial de NF- $\kappa\beta$ (NEMO) ou dos genes I $\kappa\beta$ -cinase- α (IKK α) e I $\kappa\beta$ -cinase- β (IKK β) conduz a apoptose espontânea das células epiteliais intestinais e inflamação massiva do intestino (39). O camundongo transgênico para STAT4 desenvolve uma colite mediada por células Th1 após a imunização que ativa as células apresentadoras de antígenos e a células TCD4⁺, indicando a participação dessas células na patogênese da enfermidade (40). A deleção direcionada do gene da IL-10 em camundongos desenvolve espontaneamente inflamação crônica intestinal, caracterizado por uma alta produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e TNF- α , como também IL-12 e INF- γ indicativos de uma resposta tipo Th1 (38).

Embora os modelos murinos de IBD são os mais estudados, existem novos organismos que estão surgindo como modelos de experimentação em Imunologia, devido a características que lhe dão vantagens na manipulação de experimentos *in vivo*. O *zebrafish* (*Danio rerio*) é um desses organismos e será analisado a seguir.

2.2 O *Zebrafish*

Hoje em dia muitos estudos na área da Imunologia têm sido realizados usando modelos experimentais de sistemas maiores como camundongo e rato, porém, nos últimos 15 anos tem emergido uma apreciação crescente pelo *zebrafish* como ferramenta para estudar as doenças humanas. No início, o *zebrafish* foi usado na biologia do desenvolvimento devido a características que incluem, alta fertilidade e reprodução rápida (uma fêmea pode produzir más de 200 ovos na semana), além disso,

a fertilização e o desenvolvimento dos embriões ocorrem *ex vivo*, e as larvas são transparentes até 7 dpf (dias pós-fertilização), mas pode ser mantido até 9-14 dpf com a adição de *phenylthiourea* (PTU) ao meio (41). Este último atributo permite a aplicação de técnicas de imagem, onde pode ser monitorada a expressão de distintos genes com sondas específicas utilizando a técnica de hibridização *in situ* em embriões fixados ou seguidos em tempo real em peixes transgênicos que expressam fluorocromos que marcam distintas moléculas ou tecidos (41). Nos últimos anos, a geração de uma linha de peixes adultos transparentes (*Casper*) está abrindo novas possibilidades na utilização de este organismo (42).

O *zebrafish* possui atributos fisiológicos e anatômicos como os de mamíferos (Fig.1), mas é de fácil manipulação como os vertebrados pequenos (9). Possui um genoma completamente mapeado, com uma homologia bastante significativa com o genoma humano (43). Ensaios de genética direta e reversa estão bem estabelecidos e são comumente usados para manipular e caracterizar a função dos genes no *zebrafish*.

Figura 1 - O *zebrafish* contém basicamente a mesma estrutura anatômica que os animais superiores. Desenho que descreve os órgãos internos do *zebrafish* no estado larval, de 3-5 dpf (A) e no adulto (B). Modificado de Santoriello & Zon, 2012 (9).

2.2.1 Sistema Imune no Zebrafish

O *zebrafish*, por ser um organismo que se desenvolve fora do útero materno, precisa de um sistema imune ativo nas primeiras horas de nascido. Este animal possui desenvolvimento diferencial do sistema imune, com aparecimento da imunidade inata a partir das 48 hpf (horas pós-fertilização), e um sistema imune adaptativo completamente funcional desde as 4-6 spf (semanas pós-fertilização) (44). Estudos de hematopoiese revelaram que a maioria das células de linhagem eritróide, trombocítica, mielóide e linfóide do sistema imune humano têm sua contraparte no *zebrafish*; não obstante, os locais de maturação diferem (45). Em mamíferos, o primeiro local de geração de células-tronco hematopoiéticas (*Hematopoietic Stem Cells* - HSCs) é no saco vitelino, dando origem aos primeiros eritrócitos e macrófagos (46), para logo se desenvolverem na região da Aorta-Gônadas-Mesonefro (AGM). As HSCs do AGM migram até o fígado fetal, onde já são multipotentes, e podem gerar todas as linhagens do sangue, e finalmente chegam no lugar da hematopoiese definitiva na medula óssea(47). No *zebrafish*, a hematopoiese primitiva acontece na Massa Celular Intermediária (*Intermedial Cell Mass* – ICM), derivada do mesodermo lateral-anterior (ALM) e do mesodermo lateral-posterior (PLM) (Fig. 2), que dão origem principalmente a células mielóides e eritrócitos, respectivamente. Ao redor das 30 hpf as HSCs definitivas serão produzidas na parede ventral da aorta dorsal, equivalente à AGM, para logo migrar a uma região chamada de Tecido Hematopoiético Caudal (CHT). A partir daqui, migrarão no timo e no pronefros, para estabelecer os locais definitivos de hematopoiese dos adultos (48) (Fig. 2). Apesar destas diferenças, o *zebrafish* compartilha os mesmos programas genéticos que outros vertebrados,

Figura 2 - Hematopoiese tardia no Zebrafish. Desenho representando longitudinalmente uma larva de *zebrafish* de 48 hpf e as diferentes regiões de hematopoiese durante o desenvolvimento. Em verde, a zona da aorta dorsal equivalente à região Aorta-Gônadas-Mesonefro (AGM) de onde migram as HSCs até o Tecido Hematopoiético Caudal (CHT), em vermelho, para logo fixar-se nos órgãos hematopoiéticos definitivos, o rim (rosa) e o timo (azul). A: anterior; P: posterior; D: dorsal; V: ventral.

incluindo a participação dos fatores de transcrição *gata1*, *pu.1*, *runx1*, *c-myb* e *ikaros* (49-51). O desenvolvimento de linfócitos T no timo do *zebrafish* é marcadamente similar ao processo em mamíferos, com o timo separado em duas estruturas bilaterais e completamente maduro às 3 spf (52) (53). O mecanismo de geração do TCR é conservado e apresenta recombinação V(D)J dependente de *rag1-2* (54), com a linfopoiese começando em torno das 92 hpf (55). Linfócitos T apresentam receptores de superfície CD3, CD4 e CD8 (56, 57), embora existam recursos escassos para serem isolados. Também existe evidência da presença de células *foxp3* positivas com ação imunorreguladora, no entanto, a existência de linfócitos T reguladores não tem sido confirmada (58). As células B igualmente estão presentes no *zebrafish* e se desenvolvem a partir dos 4 dpf no pâncreas e mais tarde são geradas no rim (59, 60). Os linfócitos B também experimentam rearranjo V(D)J dependente de *rag1* e *rag2*, não sofrem “class switching” de imunoglobulina, somente possuindo os subtipos IgM e IgD (61, 62). As células B são encontradas em vários órgãos e tecidos com preferência no baço, rim e intestino (63). No caso das células apresentadoras de antígenos (APCs), como nos mamíferos, também apresentam peptídeos ao TCR, sendo identificados genes MHC classe I, II e III (64, 65). Por outro lado, em contraste aos vertebrados maiores, o *zebrafish* carece de um sistema linfático e não possui linfonodos distinguíveis, nem Placas de Peyer no intestino, ou centros germinativos esplênicos (66).

Evidência adicional de homologia com o sistema imune dos mamíferos inclui um sistema do complemento bem desenvolvido e uma alta conservação nas citocinas inflamatórias. Também existe evidência da presença de células NK (Natural Killer), mesmo que os receptores clássicos não estejam presentes no *zebrafish*, existe uma grande família de receptores que codificam proteínas com grande semelhança com alguns receptores NK (67, 68). Tomando em consideração estes dados, pode-se concluir que o sistema imune do *zebrafish* pode servir como um excelente modelo do sistema imune dos mamíferos.

2.2.2 Organização do Trato Intestinal do Zebrafish

O intestino do *zebrafish* tem sido descrito por alguns autores como semelhante em anatomia e arquitetura ao intestino delgado dos mamíferos (64). Trata-se de uma estrutura tubular compartimentada em três segmentos principais: o bulbo, o intestino-médio e o intestino posterior, definidos pela morfologia das vilosidades intestinais e

pela distribuição de diferentes tipos celulares (Fig. 3). O esôfago conecta diretamente ao intestino, sem a presença de um estômago, no entanto a porção anterior do intestino, o bulbo, funciona como reservatório de alimentos. A camada mucosa do intestino está formada por um epitélio colunar simples composto por enterócitos absorptivos, células caliciformes distribuídas ao longo de todo o intestino predominantemente no intestino médio, e células enteroendócrinas, localizadas principalmente no intestino anterior (bulbo). Esta primeira camada de tecido carece de submucosa e esta diretamente rodeada por uma camada circular e uma longitudinal de músculo liso, com neurônios entéricos que formam um único plexo entre as duas capas de músculo, com fibras nervosas innervando o tecido conjuntivo por baixo do epitélio ([64](#), [65](#), [67](#)) (Fig. 3). O zebrafish também possui um complemento de Células Intersticiais de Cajal (ICC), envolvidas na motilidade intestinal ([69](#)).

Como a maioria dos vertebrados, os precursores dos neurônios entéricos no *zebrafish* se originam na crista neural, os quais migram para o intestino posterior e começam sua diferenciação às 54 hpf. Durante o terceiro dia de embriogênese, a diferenciação de neurônios entéricos é coordenada com a diferenciação do músculo liso, gerando diferentes subtipos de neurônios. Já às 98 hpf, 36% dos neurônios expressam nNOS, responsáveis por dar o tono inibitório no músculo liso intestinal ([70](#)) se encontram uniformemente distribuídos pelo intestino. Por outro lado, só 8% são neurônios produtores de serotonina, envolvida em reflexos excitatórios descendentes ([70](#)). Embora os amniotes desenvolvem mais neurônios que o *zebrafish*, os eventos básicos do desenvolvimento do SNE são conservados. Por tanto, o *zebrafish* pode ser um interessante modelo para o estudo do SNE. Além destas características, a particularidade do *zebrafish* ser transparente e o intestino ser de fácil acesso por encontrar-se na parede ventral separado simplesmente por uma camada de pele e tecido conjuntivo, fazem este sistema um modelo excelente para o estudo da função e desenvolvimento intestinal, assim como para análises da microbiota.

2.2.3 Microbiota Intestinal no Zebrafish

Um dos fatores mais importantes na patologia da IBD é a microbiota comensal, que parece desempenhar um papel em iniciar, manter e determinar o fenótipo da IBD ([3](#), [68](#)). Durante a IBD podem acontecer quatro mecanismos que relacionam a microbiota com a doença: 1) disbiose da microbiota comensal, definido como a proporção desbalanceada entre espécies bacterianas agressivas e benéficas; 2) indução

Figura 3 - O intestino do *Zebrafish*. Imagem estereoscópica de uma larva de 10 dpf com ampliação do intestino, sinalizando em linhas pontilhadas coloridas o bulbo (amarelo), o intestino médio (azul) e o intestino posterior (vermelho), em verde representação do plexo mientérico. A: anterior; P: posterior; D: dorsal; V: ventral.

de inflamação intestinal por patógenos e microbiota comensal alterada; 3) defeitos genéticos do hospedeiro relacionados à microbiota comensal; e 4) imunorregulação defeituosa do hospedeiro. Todos estes aumentam a exposição dos antígenos bacterianos às células imunes inatas e linfócitos T, residentes da mucosa intestinal, gerando uma resposta alterada do hospedeiro frente à microbiota comensal (3, 20, 68).

Em pacientes com IBD, pode-se constatar uma disbiose com aumento total do número de bactérias associadas à mucosa, assim como um desequilíbrio nos diferentes filos bacterianos, observando-se diminuição dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, e contrariamente, aumento das Actinobacterias e Proteobacterias, comparados com pacientes controles saudáveis (71). Em modelos murinos de IBD, a participação da microbiota também tem sido comprovada na ausência de colite em camundongos e ratos *germ-free* (GF), geneticamente susceptíveis à doença, que na presença da microbiota desenvolvem uma colite crônica mediada por células T (72); também em modelos de transferência de células T, as bactérias da microbiota comensal proveem a estimulação antigênica para as células T-*helper* 1 e 17 (73); por outro lado, defeitos nos receptores tipo-*Toll* e na via de sinalização do NFκB pode levar a alterações na barreira epitelial, expondo os antígenos bacterianos às células imunes e provocando uma resposta inflamatória (74). Por fim, a inflamação intestinal pode ser transmitida através de transplante fecal entre indivíduos doentes e saudáveis (75).

No *zebrafish*, a microbiota coloniza o intestino após de o embrião sair do córion, entre as 48 e 72 hpd, e aumenta consideravelmente a partir dos 4 dpf (75). O papel da

microbiota no *zebrafish* tem sido relacionado ao controle de vários processos fisiológicos, incluindo o próprio desenvolvimento do intestino. A ausência da microbiota afeta a atividade da fosfatase alcalina no epitélio intestinal, causa expressão de padrões imaturos de glicanos, e escassez de células caliciformes e enteroendócrinas, além de afetar a absorção de proteínas na porção distal do intestino (75). Também tem sido vinculada com a regulação espacial e temporal da atividade transcricional de NFκB, e com a migração de neutrófilos e expressão da mieloperoxidase, no intestino (76, 77). Estudos recentes, tem identificado no *zebrafish* um núcleo (*core*) de microbiota intestinal, compartilhado por animais criados em laboratório e animais recentemente capturados de seu ambiente natural, no entanto, a microbiota dos animais domesticados co-varia conforme as conexões históricas entre instalações e laboratórios (78). Sequenciamento do rRNA 16S em intestinos de *zebrafish* revelou uma presença predominante dos filos Firmicutes, Proteobacteria e Bacteroidetes, grupos compartilhados também pela microbiota humana e de camundongo (79, 80). Curiosamente, o filo das Gammaproteobacterias parece estar relacionado com doenças intestinais, como as IBDs (81). Finalmente, a capacidade de manipular a microbiota mediante sistemas GF, foi desenvolvida faz uns anos no *zebrafish*, gerando uma nova opção para o estudo dos processos nos que participa (82). Desta forma, podemos evidenciar que a microbiota desempenha um papel fundamental no *zebrafish* tanto como nos humanos, no entanto, as repercussões funcionais das interações microbiota-hospedeiro apenas começaram a ser investigadas.

2.3 O *Zebrafish* como Modelo de Doença Inflamatória Intestinal

Na última década, várias patologias gastrointestinais foram modeladas no *zebrafish* incluindo as IBDs. Os modelos atuais testados em *zebrafish* são adaptações de modelos murinos de indução da inflamação. Uns dos mais conhecidos é o mencionado modelo do hapteno oxazolona, que está sendo aplicado para gerar colite em peixes adultos, embora a administração retal de cada indivíduo representa um grande desafio técnico. Apesar disso, os peixes conseguem reproduzir uma lesão aguda, com dano epitelial intestinal e depleção das células caliciformes, acompanhado da infiltração de eosinófilos no intestino com aumento na produção dos genes *il1b*, *tnf* e *il10*, assim como disbiose da microbiota (83).

O DSS é usado comumente na água de beber de camundongos, induzindo uma inflamação intestinal semelhante à UC (5). Oehlers et al.(84) desenvolveu o modelo larval de DSS no *zebrafish*, onde se desenvolve um fenótipo produtor de muco, com infiltração neutrofílica microbiota-dependente, e responsivo a tratamento farmacológico (85).

Por último, foi estabelecido um modelo de lesão epitelial usando uma droga anti-inflamatória não esteróide (*nonsteroidal anti-inflammatory drug* – NSAID) chamada glafenina, baseando-se na idéia de que os NSAIDs perturbam a barreira epitelial intestinal, incrementando a permeabilidade aos antígenos bacterianos da microbiota comensal (86, 87). A glafenina foi adicionada em larvas de *zebrafish* de 5 dpf por 12 horas, resultando em um aumento na apoptose da célula epitelial, mediado por indução de estresse no RE (retículo endoplasmático) e um enfraquecimento da UPR associado a uma ativação errônea dos mediadores da UPR, ATF6 e *spliced-XBP-1* (87). Coincidentemente a perda de XBP1 em camundongos resulta no desenvolvimento de enterocolite espontânea e os polimorfismos desse gene estão associados à IBD humana (88, 89).

Outro modelo popular em mamíferos, o hapteno ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS), empregado para o estudo da inflamação intestinal aguda e crônica, foi também desenvolvido no *zebrafish*. Com a imersão de larvas de 3 dpf por 3-5 dias no TNBS em concentrações entre 50-75 µg/mL, observou-se expansão do lúmen intestinal, alisamento das dobras epiteliais e perda das vilosidades, assim como aumento na expressão de transcritos de citocinas como *il1b* e *tnfa*, alteração do metabolismo intestinal dos lipídeos, hipertrofia das células caliciformes e encurtamento intestinal. As vantagens desse modelo incluem um fenótipo dose-dependente, sensibilidade ao tratamento com antibióticos e resposta a agentes anti-inflamatórios; enquanto as desvantagens pode-se mencionar a restrição de este modelo para estudar o sistema adaptativo e a baixa sobrevivência a altas concentrações do químico, onde as alterações no intestino são mais evidentes (84, 90, 91). O uso do TNBS também se aplica a um modelo em peixe adulto onde se administra o químico por via retal, gerando uma inflamação aguda em poucas horas, com efeito dose-dependente, e dependente da microbiota visto que o tratamento prévio com vancomicina desenvolve uma colite menos severa, além disso, se observou infiltrado

inflamatório o intestino e incremento de citocinas tanto pró-inflamatórias como anti-inflamatórias (92).

O modelo de TNBS mencionado em larva é o mais estudado na literatura, no entanto, não existem trabalhos em *zebrafish* que analisem as alterações do sistema nervoso entérico durante a inflamação intestinal. Por outro lado, o tratamento com anti-inflamatórios comuns foi efetivo para tratar a inflamação em este modelo, porém produtos próprios da microbiota como os ácidos graxos de cadeia curta nunca tem sido estudados em este modelo.

2.4 Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs)

Nos últimos anos os estudos e discussões sobre os efeitos dos AGCCs como uma nova estratégia para combater doenças intestinais e extra intestinais vem ganhando cada vez mais destaque. AGCCs são produzidos pela microbiota intestinal por meio da fermentação de carboidratos alimentares, como o amido não digerido pelo intestino delgado e fibras alimentares, e também de proteínas advindas da dieta (93, 94). AGCCs são ácidos orgânicos, constituídos por cadeia alifática contendo até 6 carbonos, incluídos o acetato (2C), o propionato (3C) e o butirato (4C), entre outros.

Os AGCCs são metabolizados pelas células epiteliais do cólon do intestino grosso e absorvidos pela membrana apical através de mecanismos como difusão não iônica, contraporte de AGCC/HCO₃⁻ e por transporte ativo (95). Um dos receptores específicos para AGCC, o GPR43, é expresso em células imunes, incluindo neutrófilos, monócitos e linfócitos, sugerindo que os AGCCs podem estar envolvidos na ativação de leucócitos. Sabe-se que os neutrófilos têm um importante papel no início do processo inflamatório no trato gastrointestinal, incluindo gastrite e UC (96). Após migrarem da circulação sistêmica para a mucosa intersticial, eles sofrem ativação e produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) e quimiocinas, agravando as respostas inflamatórias (97-99). É possível que altos níveis de AGCCs, como acetato e butirato, via GPR43, afete a biossíntese de ácidos graxos endógenos que modulem a função leucocitária (100, 101).

A utilização de propionato, em curto prazo, oferece evidências na prevenção de doenças cardíacas associadas à resistência à insulina e efeitos benéficos diretos no tecido adiposo visceral, reduzindo a inflamação por meio da diminuição de TNF- α , IL-

4, IL-10 e da diminuição de IL-8, responsável pela quimioatração de células imunes da circulação para o tecido adiposo ([102](#), [103](#)). O butirato, dentre os AGCCs, tem sido o centro de interesse de muitos estudos por modular respostas inflamatórias nas células epiteliais do cólon. É a maior fonte de energia para os colonócitos e está envolvido na manutenção da mucosa do cólon ([95](#)). A atividade NF- κ B está frequentemente desregulada nas IBD como UC e CD, e a atividade anti-inflamatória do butirato é atribuída à diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatória por meio da inibição da ativação de NF- κ B e degradação de I κ B α ([104](#), [105](#)). Muitos fatores contribuem à ativação transcricional de NF- κ B, entre eles, as modificações pós-tradução da subunidade RelA (p65) do complexo NF- κ B. Uma de estas modificações são as acetilações e desacetilações que regulam diversas funções de NF- κ B, incluindo sua união ao DNA, sua atividade transcricional e sua capacidade de união com I κ B α . A acetilação de diferentes lisinas resulta em mecanismos distintos de regulação, afetando, por exemplo, a conformação de RelA que permitirá uma melhor ou pior união a suas proteínas parceiras, ou neutralizando lisinas carregadas positivamente o que pode reduzir sua união ao DNA ([106](#)). O butirato é conhecido por inibir a histona desacetilase (HDAC), e dessa maneira, está relacionada à modulação da atividade transcricional do NF- κ B, interagindo com a subunidade p65 e exercendo função repressora da transcrição ([107](#)). Em consequência, ele acaba por regular muitos genes celulares envolvidos na resposta imune imediata, incluindo IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2), molécula de adesão intercelular (ICAM-1), e molécula de adesão celular-1 (VCAM-1) ([108](#), [109](#)). Trabalhos recentes ainda mostram o butirato na modulação da atividade antioxidante da glutathione-S-transferase, restaurando os níveis da enzima e diminuindo nível de espécies reativas de oxigênio por controle da via NF- κ B ([110](#)).

Atualmente, as terapias disponíveis para as IBD são baseadas em medicamentos anti-inflamatórios e imunossupressores, que não são específicos para a doença, resultando em múltiplos efeitos adversos. Hoje em dia, há uma intensa busca por terapias efetivas para o tratamento das IBD que modulem especificamente a inflamação crônica e a resposta imune envolvida, proporcionando assim a regeneração tecidual. Com os dados anteriormente expostos, este trabalho tem como objetivo principal analisar um novo modelo para o estudo da inflamação intestinal no contexto da uma imunidade inata isolada, que serão úteis para compreender o funcionamento

do microambiente imunológico intestinal durante o processo da colite, para o posterior teste do tratamento com AGCCs. A hipótese deste trabalho é que a administração do TNBS consegue induzir uma enterocolite, embora o animal só possua imunidade inata, e que esta inflamação pode ser revertida com o tratamento com AGCC, preservando a função e estrutura intestinal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer e analisar o modelo de inflamação intestinal por indução com TNBS, em larva de *zebrafish*, avaliando a resposta imunológica inata (células imunes, citocinas e quimiocinas), no microambiente inflamatório, para uma posterior utilização do modelo em terapia com AGCC.

3.2 Objetivos Específicos

- 1.** Estabelecer o modelo de IBD em larva de *zebrafish* mediante indução química com TNBS;
- 2.** Analisar o estado da função intestinal *in vivo* na larva completa e modificações na inervação entérica, assim como as condições proliferativas e apoptóticas das células intestinais;
- 3.** Quantificar citocinas pró- e anti-inflamatórias, assim como mediadores da resposta inflamatória e alterações das diferentes populações celulares da resposta imune inata na lâmina própria do intestino do *zebrafish*;
- 4.** Verificar o estado da microbiota mediante quantificação do rRNA 16S; e
- 5.** Padronizar o tratamento com os AGCC acetato, propionato e butirato frente aos parâmetros de função intestinal e produção de citocinas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Embriões

Os embriões, foram fornecidos pelo Biotério de *Zebrafish* do Laboratório de Imunorregulação do Instituto Butantan [Wild type] e pelas instalações de *zebrafish* do Laboratório de Ontogênese Experimental da Universidad de Chile [Tg (*Lys: DSRED*)], e foram obtidos por desova natural, coletados em placas de petri com meio de embrião E3 (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, pH 7.2) com azul de metileno e mantido em incubadora a 28,5 °C. A partir das 24 horas pós-fertilização (hpf) se adicionou 0,003% de N-feniltiourea (Sigma, Sigma-Aldrich Co. LLC, Saint Louis, MO, United States) ao meio para evitar a melanização e manter a transparência dos embriões. Todos os procedimentos foram submetidos à aprovação junto ao Comitê de Ética para Uso de Animais em experimentação da Universidade de São Paulo (nº 119 fls. 11 livro 03) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, protocolo nº 1142/13.

4.2 Indução da colite

Embriões de 3 dpf foram decorionados manualmente e grupos de 30 larvas foram colocados em placas petri com 25 mL de meio E3 1 X. A colite experimental foi inicialmente induzida pela adição de TNBS (ácido 2,4,6- trinitrobenzenossulfônico), (Sigma), em concentrações de 20-40-60 µg/mL no meio dos peixes aos 3 dpf e mantidos até 4-6-8-10 dpf. No dia indicado as larvas foram anestesiadas com 3-aminobenzóico (Tricaína) 120-140 µg/mL, (Fluka, Sigma-Aldrich Co. LLC, Saint Louis, MO, United States) ([111](#)) para as visualizações *in vivo* ou eutanasiadas com sobredose de anestésico (250 µg/mL) e colocadas em gelo por 5-10 minutos, para a coleta de tecido.

4.3 Visualização *in vivo*

Para a análise do estado intestinal e posterior medição do comprimento, larvas de 4-6-8-10 dpf foram anestesiadas com tricaína e visualizadas no Microscópio Intravital de Fluorescência (Axio Imager A.1, Carl-Zeiss) e fotografadas com o *software* AxioVision SE64 Rel.4.9.1. Para a análise morfométrica se mediu o comprimento longitudinal do animal completo; o comprimento longitudinal do intestino desde o

começo do bulbo até a cloaca; e a área total do bulbo selecionada manualmente mediante o software Fiji.

4.4 Curva de Sobrevida

Para o exame da sobrevivência dos animais, estudamos grupos de 30 embriões por condição em um total de 30 mL de meio E3 (controles) ou TNBS, em diferentes concentrações. Diariamente se registrou o número de indivíduos mortos. O experimento foi repetido três vezes e os dados analisados estatisticamente no programa GraphPad Prism 5.03.

4.5 Análise Histológica

No dia da coleta, grupos de 20 larvas foram separados em tubos eppendor e eutanasiadas com sobredose de anestésico e gelo por 10 minutos. Posteriormente, foram lavadas uma vez com PBS 1 X e fixados em paraformaldeído 4% a 4 °C por toda a noite. No dia seguinte foram feitas três lavagens de 10 minutos com PBS 1 X e montados em agarose LMP 2% (Promega, Promega Corporation, Madison, WI, United States) em um disco de silicone como suporte. O disco de agarose com as larvas dentro foi colocado em cassete histológico e as amostras foram processadas normalmente até sua inclusão em parafina. Mais tarde, os blocos foram cortados a uma espessura de 7 µm e as lâminas foram coloridas com Hematoxilina/Eosina e PAS/*Alcian Blue*. Mais tarde, as lâminas foram examinadas no Microscópio Nikon Eclipse Ti-S e imagens foram tomadas com o *software* NIS-Elements AR. Para avaliar o estado morfológico, incluindo integridade epitelial, criptas expandidas e projeções reduzidas, expansão do lúmen e aparência das células caliciformes, foi aplicado um score semi-quantitativo modificado de He et.al. 2013 ([112](#)).

4.6 Análise da Função Intestinal

4.6.1 Produção de muco e atividade endocítica

Para a análise da função intestinal foi realizada uma coloração de montagem completa com *alcian blue* (Sigma) para visualizar a produção de muco pelo intestino do *zebrafish*, e uma coloração com *neutral red* para visualizar a atividade endocítica dos enterócitos do intestino-médio do *zebrafish* ([84](#)).

Alcian Blue: Larvas foram eutanasiadas como descritas anteriormente (111) e logo fixadas em paraformaldeído 4% *overnight* à 4 °C. No seguinte dia, foram lavados em etanol ácido (1% de ácido clorídrico concentrado em 70% de etanol), incubados em solução de *alcian blue* (0,1% de *alcian blue* em 80% de etanol e 20% de ácido acético glacial) durante 3 horas à temperatura ambiente e lavados repetidamente com etanol ácido. Posteriormente foram lavados em PBS 1 X e colocados em glicerol 70% para geração de imagens em Lupa Stéreo de Fluorescência (Lumar V12 Zeiss). Para a quantificação de células caliciformes os intestinos foram dissecados e colocados em lâminas de vidro para sua visualização no Microscópio Nikon Eclipse Ti-S e tomada de imagens com ajuda do *software* NIS-Elements AR. A contagem de células foi feita manualmente com o *software* Fiji (Is Just Image J).

Neutral Red: No dia anterior à coleta se adicionou ao meio de embrião E3 contendo as larvas de *zebrafish*, a solução de *neutral red* a uma concentração final de 5 µg/mL da solução stock (2,5 mg/mL) e foi incubado até o dia seguinte. Após 18 hs, o excesso de corante foi lavado com meio E3 e as larvas foram anestesiadas e montadas em agarose 1% + tricaína para geração de imagens *in vivo* com luz transmitida no Microscópio Intravital de Fluorescência (Axio Imager A.1, Carl-Zeiss).

4.6.2 Sistema Nervoso Entérico

Para o estudo do sistema nervoso entérico durante a indução da colite, foi realizada uma imunofluorescência contra o marcador pan-neuronal HuC/D. As larvas foram coletadas, anestesiadas e fixadas em paraformaldeído (PFA) 4%/DMSO 1% toda a noite à 4 °C. No dia seguinte, foram lavadas três vezes PBS 1 X e armazenadas em metanol à -20 °C. Para a aplicação da técnica de imunofluorescência, as larvas fixadas foram permeabilizadas com acetona à -20 °C e logo com collagenase IA (Sigma) 1 mg/mL, deixando logo em solução de bloqueio “Immuno-Blocking” (IB: SFB 10%, DMSO 1%, PBS-Tritón 1%) *overnight*. Ao dia seguinte foi adicionado o anticorpo primário anti-HuC/D (camundongo) 1:100 (doação da Dra. Patricia Castelucci), incubado toda a noite e logo lavado com PBS-Tritón 1%, e incubado novamente *overnight* com anticorpo secundário Alexa Fluor-594 anti-camundongo 1:200 (doação da Dra. Patricia Castelucci), e DAPI 1:1000 (Sigma). Finalmente, as larvas foram lavadas e montadas em agarose 1% (Promega) para ser visualizadas no Microscópio

Confocal Zeiss LSM 780-NLO. A quantificação do número de neurônios foi feita manualmente com o programa Fiji (Is Just ImageJ).

4.6.3 Detecção de Proliferação Celular e Apoptose

Para o ensaio de proliferação celular grupos de 10 larvas foram fixadas em PFA 4%/DMSO 1% e foi aplicado o mesmo procedimento acima descrito para imunofluorescência. Foi usado um anticorpo primário anti-fosfo histona H3 (*mouse*) 1:750 (Abcam, Biotech Company, Cambridge, UK), e um anticorpo secundário Alexa Fluor-488 *goat anti-mouse* 1:200 (Ab) + DAPI 1:1000 (Abcam). Finalmente as larvas foram montadas em agarose 1% para sua visualização em Microscópio Confocal Zeiss LSM 780-NLO.

Para o ensaio de apoptose, as larvas foram fixadas em PFA 4%/DMSO 5% *overnight* à 4 °C, lavados com PBS 1 X e guardados em metanol à -20 °C . Posteriormente, foram permeabilizadas com acetona fria e Proteinase K 20 µg/mL (Promega). Logo re-fixado em PFA 4%, lavado em PBS 1 X, e incubado toda à noite com uma mistura de 50 µL de solução da enzima rTdT mais 450 µL do *Label Solution do kit In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red* (Roche, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, United States). No dia seguinte foi incubado mais 1 hora à 37 °C, lavado com PBS 1x e incubado com corante nuclear DAPI 1/1000 por 1 hora à temperatura ambiente. Logo lavado em montado em agarose 1%, para sua visualização no microscópio confocal. Para cada caso, a quantificação das células positivas foi feita manualmente com o *software* Fiji (Is Just ImageJ).

4.7 Quantificação de Moléculas Pró e Anti-Inflamatórias

A análise de moléculas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (*inf-γ*, *tnf-α*, *il-6*, *il-1β*, *il-8*, *il-12* e *il-10*) foi quantificada mediante PCR quantitativo. A extração do RNA total foi feita em amostras de 20 larvas de cada grupo experimental através do método de purificação com TRIzol LS (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States). A síntese de cDNA foi feita com a enzima transcriptase reversa MMLV (Promega) e as amostras foram diluídas 1:4. Os primers Taqman para o qPCR foram obtidos da base de primers para *Danio rerio* da Applied Biosystems (*tnfa*:Dr03126850_m1; *infg1-2*: Dr03081923_m1; *il1b*: Dr03114371_m1; *il10*: Dr03103209_m1; *il12a*: Dr03127928_m1; *il6st*: Dr03431399_m1; *myd88*: Dr03075674_m1; *nfkb2*: Dr03425684_m1; *gapdh*: Dr03436842_m1) e o qPCR foi

realizado com o Taqman PCR Master Mix (Applied Biosystems - Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States).

Também foi examinada a expressão protéica de *Tnfa* mediante *western blotting* (WB). Larvas de 6 dpf foram anestesiadas em uma solução fria de triclaína 30 mg/mL-PBS 1 X (2:3) e imediatamente, o intestino foi dissecado baixo lupa estereoscópica e colocado em tubos de Precellys com esferas de óxido de zircônio mais 450 µL de tampão RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 1%, SDS 1%, Tris pH 8.0 50 mM, NaF 10 mM) mais inibidores de protease e fosfatase e mantido em gelo até o fim do procedimento. Logo o tecido foi homogeneizado no aparelho Precellys 24 (Bertin Technologies) num ciclo de 5000 rpm duas vezes por 20 segundos, e centrifugados por 15 minutos a 12.000 x g em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi retirado em tubos eppendorf novos e guardados à -80 °C. A dosagem de proteínas foi feita mediante ensaio colorimétrico com o kit Proteínas Totais (Labtest Diagnóstica SA) e a absorbância foi quantificada pelo aparelho SYNERGY Mx Biotek e o *software* Gen 5. Para a preparação das amostras para WB foi utilizada uma mistura de 100 µL de *Buffer Laemmle* 6 x mais 0,015 g de DTT para 400 µL de amostra, e foram aquecidas por 10 min a 95 °C. Foram adicionados 10 µL do marcador de peso *Rainbow Broad Range* (ThermoScientific) e 50 µg/mL de proteína de cada amostra foram carregadas num gel de acrilamida 12% em condições denaturantes, e corridas a 80 V até o passar o gel de empacotamento e logo 110 V por 2,5 horas. A transferência do gel à membrana de nitrocelulose foi feita a 110 V por 1 hora para mais tarde aplicar o pré-tratamento de membrana *Antigen Pretreatment Solution* do kit *SuperSignal® Western Blot Enhancer* (Pierce, Thermo Scientific) e bloquear a membrana com 5% de leite desnatado (Molico) por 1 hora. O anticorpos primários *mouse* anti-*Tnfa* 1:250 (Abcam.) e *rabbit* β-actina 1:1000 (Abcam) foram diluídos no *Primary Antibody Diluent* do kit mencionado anteriormente e incubados toda a noite em agitação à 4 °C. Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBST 1 X e incubadas por 1 hora com os anticorpos anti-*mouse* e anti-*rabbit*- HRP 1:5000 e revelados com *Pierce®ECL Western Blotting Substrate* no aparelho ImageQuant LAS500.

4.8 Estudo da Microbiota

Para a análise da microbiota, os animais foram anestesiados e os intestinos dissecados como antes descrito. Um pool de 40 intestinos foi colocado em 500 µL de PBS 1 X estéril ao qual foi adicionado 70 µL de lisozima 10 mg/mL e incubado à 37 °C

toda à noite. No dia seguinte foram adicionados 500 µL de buffer de extração (Tris pH 8.0 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 200 mM, SDS 0.5%, Proteinase K 200 µg/mL) e incubados à 55 °C por 3 horas. Mais tarde, foi acrescentado um volume igual de Fenol:Clorofórmio (1:1), agitado em vórtex por 2 minutos e centrifugado 10 minutos a 14000 rpm. A fase aquosa superior foi recuperada em outro tubo e o passo anterior foi repetido. Logo se adicionou 60 µL de acetato de sódio 3M e 600 µL de isopropanol frio, homogeneizando por inversão, e incubando *overnight* à -20 °C, até a formação de um pellet. Depois os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 14000 rpm, descartando o sobrenadante, e lavando com etanol 70% frio e repetindo, para logo deixar secando totalmente o etanol e resuspending o pellet em 20 µL de água DEPC, deixando eluir toda a noite à 4 °C.

A quantificação do DNA foi feita no aparelho NanoDrop 1000 Spectrophotometer, no *software* ND-100 a 230 nm e 10 ng de DNA foram usados para a reação de PCR quantitativo, onde se usou o rRNA 16S total como gene de referência e primers para regiões do rRNA 16S de diferentes filos bacterianos: Fusobacteria (5'-CGAGGAACCTTACCAGCGTT-3'/ 5'-ATCTCACGACACGAGCTGAC-3'), Firmicutes (5'-CAGCAGTAGGGAATCTTC-3'/5'-ACCTACGTATTACCGCGG-3'), Bacteroidetes (5'-CCGGATTTATTGGGTTTAAAGGG-3'/5'-GGTAAGGTTCTCGCGTA-3'), Alphaproteobacteria (5'-CGGTAATACGGAGGGGGTT-3'/5'-CGAATATCTACGAATTTACCT-3'), Betaproteobacteria (5'-CGAAAAACCTTACCTACC-3'/5'-GTATGACGTGTGAAGCC-3'), Gammaproteobacteria (5'-CCATGCCGCGTGTGTGAA-3'/5'-ACTCCCCAGGCGGTCAACTTA-3'), Actinobacteria (5'-GAGACTGCCGGGGTCAACT-3'/5'-TCTGCGATTACTAGCGAC-3').

4.9 Tratamento com Ácidos Graxos de Cadeia Curta

Os AGCCs, acetato, propionato e butirato foram preparados a partir de ácido acético, butírico e propiônico (Sigma), gerando soluções mãe de 1 M com pH ajustado a 7.4, esterilizados por filtração, aliquotados e guardados à -20 °C. Para testar seu efeito no tratamento da colite, foram adicionados os três juntos na mesma concentração ao meio com TNBS 40 µg/mL, em três grupos de concentrações diferentes (10 mM, 30 mM e 50 mM) a partir dos 3 dpf até os 10 dpf, onde o tecido foi coletado para análise.

4.10 Análise Estatística

Os dados são apresentados com média e desvio padrão. A diferença entre os grupos experimentais entre dois grupos foi determinada com teste de *t-student* e para três ou mais grupos com o teste de ANOVA, com pós-teste de Dunnet. A curva de sobrevida foi avaliada utilizando o teste de long-rank (Mantel-Cox) e Gehan-Breslow-Wilcoxon. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo para todas as análises. Todos os gráficos e análises estatísticas foram realizados utilizando o programa GraphPad PRISM® 5.03.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização da concentração do TNBS e análise da ação direta em larvas de *zebrafish*.

Atualmente existem poucos trabalhos referentes à indução de colite no *zebrafish* (83-86, 90-92, 112), e a maioria estão baseados principalmente nos modelos já conhecidos em camundongos. Porém, o modelo de indução de colite por TNBS em larva de *zebrafish* é tecnicamente mais fácil de aplicar que o gerado em camundongos com a diferença de que o animal ainda não possui imunidade adaptativa circulante. Nosso grupo quis avaliar como acontece esta inflamação nestas condições, de modo que, resolvemos iniciar nossos estudos testando três diferentes concentrações de TNBS baseados no que já se descreveu na literatura. Inicialmente, tratamos os embriões a partir de 3 dpf com 20-40-60 µg/ml de TNBS e registramos o número de animais mortos por dia. Como se observa na Figura 4, os níveis de mortalidade estão diretamente relacionados às concentrações crescentes do TNBS e ao tempo de exposição ao reagente, sendo que a partir dos 40 µg/ml de TNBS em torno de 40% dos animais sobrevivem após os 9 dpf.

Figura 4 - Efeito do ácido 2,4,6- trinitrobenzenossulfônico (TNBS) na taxa de sobrevivência de larvas de *zebrafish*. **A.** Desenho experimental da curva de sobrevivida. O TNBS foi aplicado aos 3 dias pós-fertilização (dpf). **B.** Curva de sobrevivida de larvas de *zebrafish* selvagens que foram expostas a concentrações de TNBS de 20, 40 e 60 µg/ml, desde os 3 dpf até 10 dpf. *p < 0.0001 log-rank (Mantel-Cox) test. Representativo de três experimentos independentes.

No exame direto com auxílio de uma lupa, observamos que as larvas expostas ao TNBS apresentavam uma coloração amarelada no lúmen intestinal, que infere que os animais estão ingerindo o reagente, da mesma cor. Pode-se ver claramente a dilatação do lúmen intestinal enquanto maiores são a concentração do TNBS e os dias de tratamento (Fig. 5 B, D).

Sabe-se na literatura ([113](#), [114](#)) que tanto o modelo murino com DSS quanto o com TNBS produzem uma redução significativa do comprimento do cólon. No caso do *zebrafish*, tanto o comprimento total da larva quanto o comprimento total do intestino foram afetados pela exposição ao TNBS e apresentaram redução significativa principalmente aos 60 µg/ml nos dias 6 e 8 pós-fertilização (Fig. 5 C).

Figura 5 - Análisis in vivo de larvas tratadas com TNBS. **A.** Desenho experimental indicando exposição ao TNBS 20-40-60 µg/mL, a partir dos 3 dpf e análises aos 4-6-8-10 dias **B.** Imagens de microscopia intravital de larvas de 4, 6, 8 e 10 dpf expostas ao TNBS. Cabeça de seta indica ingestão do TNBS e expansão do bulbo após tratamento. Barra de escala 100 µm. **C.** Comprimento total da larva vs comprimento do intestino de larvas de 6 dpf em tratamento com TNBS (20, 40 e 60 µg/mL) **p<0.05 (One-way ANOVA). **D.** Área interior total do bulbo de animais de 6 dpf expostos a diferentes concentrações de TNBS. **p<0.05 one-way ANOVA.

Foi impossível obter dados de concentrações iguais e superiores a 40 µg/mL para os 10 dpf devido à alta mortalidade das larvas após os 9 dpf.

5.2 Avaliação do estado histopatológico e funcional do intestino de larvas de *zebrafish* expostas a TNBS.

As características histológicas das IBD são bem evidentes em humanos, e em geral se apresentam como anormalidades na arquitetura das criptas (distorção, ramificações, encurtamento, diminuição da densidade) e irregularidades na superfície mucosa, com rasgos inflamatórios como aumento da celularidade da lâmina própria com acumulação de linfócitos, células plasmáticas e neutrófilos, assim como mudanças no conteúdo de mucinas (115). Baseados num score semi-quantitativo utilizado por He. et al. 2013 (112) (Tabela 1), constatamos que características como expansão do lúmen intestinal e redução das vilosidades intestinais se intensificavam quanto maior era a concentração do TNBS usada (Fig. 6B).

Tabela 1 - Sistema de score de enterocolite para avaliação histológica.

Score Numérico	Perda da arquitetura das vilosidades intestinais		
	Integridade epitelial comprometida	Fendas expandidas/projeções reduzidas	Lúmen intestinal expandido
0	Normal	Normal	Normal
1	Dano leve	Dano leve	Expansão leve
2	Dano moderado	Dano moderado	Expansão moderada
3	Dano severo	Dano severo	Expansão severa

O modelo de indução de colite por TNBS no *zebrafish*, mostrou expansão do lúmen intestinal, predominantemente no bulbo, perda considerável das vilosidades intestinais e aplanamento do epitélio (Fig. 6C). Não se observaram mudanças drásticas no intestino médio-posterior. No entanto, não se observou a presença de infiltrado de células imunes.

Figura 6 - Exame histopatológico de larvas tratadas com TNBS. **A.** Desenho experimental indicando exposição ao TNBS 20-40-60 $\mu\text{g/mL}$ a partir dos 3 dpf e análise aos 8 dpf. **B.** Score total de enterocolite de animais expostos ao TNBS em concentrações de 20, 40 e 60 $\mu\text{g/mL}$ aos 4, 6, 8 e 10 dpf. O score foi quantificado com método cego, 4-8 intestinos foram analisados para cada condição. * $p < 0.05$ (Kruskal–Wallis one-way ANOVA) cada coluna com o seu respectivo controle. **C.** Seções longitudinais de larvas de 8 dpf coloridas com alcian blue e zoom das vilosidades. As alterações histológicas após expor ao TNBS observadas incluíram: dilatação do lúmen intestinal, disrupção da arquitetura das vilosidades intestinais (setas vermelhas) e alisamento da parede intestinal. Barra de escala 50 μm .

Mudanças na organização e composição do tecido carregam conjuntamente alterações funcionais. O intestino médio do *zebrafish* exibe proeminentes características associadas à função imune incluindo expressão de genes antimicrobianos, infiltração de neutrófilos e endocitose (116). A aplicação da técnica de *neutral red* demonstrou que a administração do TNBS produz uma diminuição da capacidade endocítica deste segmento intestinal, evidenciado por uma redução na área e intensidade da coloração (Fig. 7 B, C).

Por outro lado, é sabido que as mucinas desempenham um papel importante na manutenção da homeostase imune intestinal, sendo que a depleção de muco é um dos fenômenos observados nas IBDs (117). Para saber se a produção de mucinas está alterada, a coloração de montagem completa com *alcian blue* é uma proveitosa técnica

para visualizar as mucinas ácidas produzidas pelas células caliciformes. Como se apresenta na Figura 7 B e 7 D, nenhuma das concentrações do TNBS muda a produção de muco quando comparadas ao controle, nem é modificada a quantidade de células caliciformes após a exposição ao TNBS, indicando que a função muco secretora não se vê alterada pelo químico.

Estudos sugerem que a inflamação intestinal pode levar a mudanças persistentes na função do Sistema Nervoso Entérico (SNE) e do músculo liso, causando alterações na motilidade do cólon, hipersensibilidade, e disfunção intestinal ([118](#)). As transformações que podem acontecer no SNE por causa da inflamação podem afetar a estrutura morfológica ou a produção/secreção/captação de neurotransmissores ([119](#)). Para saber se existe alguma modificação no SNE induzida pelo TNBS, realizamos uma imunofluorescência para a molécula HuC/D, um marcador neuronal que reconhece proteínas da família ELAV ([120](#)) na maioria dos vertebrados (Fig. 8).

Figura 7 - Exposição ao TNBS origina uma perda da função endocítica no intestino médio sem mudanças na produção de muco. A. Desenho experimental indicando exposição ao TNBS 20-40-60 $\mu\text{g/mL}$ a partir dos 3 dpf e análise aos 8 dpf **B.** Fotografia in vivo da corante neutral red (esquerda) e alcian blue (direita) em animais de 8 dpf tratados com diferentes concentrações de TNBS. Barra de escala 100 μm . **C.** Intensidade da área colorida por neutral red em animais tratados com diferentes concentrações de TNBS * $p < 0.05$ one-way ANOVA. **D.** Fotografia de intestinos coloridos com alcian blue e dissecados, e sua respectiva quantificação do número de células caliciformes * $p < 0.05$ t-test.

Figura 8 - O TNBS não altera o número de neurônios entéricos, mas sim sua distribuição. **A.** Desenho experimental indicando exposição ao TNBS 60 µg/mL a partir dos 3 dpf e análise aos 6 dpf **B.** Imagem em foco estendida de larvas de 6 dpf tratadas ou não com TNBS. Barra de escala 100 µm. **C.** Número de neurônios totais no intestino (área pontilhada em A) N=5 por grupo. *p<0.05 *t*-test. **D.** Número de neurônios por região (definida em Fig. 3). N=5 por grupo *p<0.05 *two-way* ANOVA.

A quantificação do número total de neurônios dos controles comparados com animais expostos ao TNBS não teve diferença estatística (Fig. 8 B,C). No entanto, podemos observar que os neurônios entéricos nos controles estão uniformemente distribuídos ao longo do intestino, enquanto animais com colite apresentaram uma distribuição neuronal mais centralizada no intestino médio (Fig. 8 B,D).

Sabemos pela literatura, que a exposição ao TNBS ocasiona um dano direto na célula epitelial, pelo que poderia causar um aumento da mortalidade das células do epitélio intestinal. Por esse motivo, decidimos estudar o estado apoptótico e proliferativo das células epiteliais intestinais. Mediante a técnica de TUNEL, analisamos larvas de 6 dpf (3 dias de tratamento) e não observamos diferença significativa entre os grupos, mas sim uma tendência ao aumento da apoptose no grupo exposto ao TNBS (Fig. 9 B, C).

As histonas são proteínas nucleares que participam do empacotamento e organização do DNA. Estas proteínas sofrem variadas modificações pós-traducionais que influenciam no grau de empacotamento do DNA. A histona H3 é fosforilada na serina 10 (Ser10) durante a mitose e o uso de um anticorpo que reconhece esta forma fosforilada nos permite distinguir claramente células no ciclo proliferativo. A imunofluorescência contra a fosfohistona H3 não mostrou diferença estatística mas sim uma tendência a diminuição no número de células em mitose em animais expostos ao TNBS por 3 dias quando comparados com os controles (Fig. 8 D, E)

Figura 9 - O TNBS induz apoptose e perda da proliferação no intestino de larvas de *zebrafish*. **A.** Desenho experimental indicando exposição ao TNBS 60 μg/mL a partir dos 3 dpf e análise aos 6 dpf. **B,C.** Detecção de células apoptóticas por meio da técnica de TUNEL. Observa-se um aumento não significativo no número de células apoptóticas com respeito ao controle. **D,E.** Imunofluorescência anti-fosfo histona H3, determina células em mitose. Observa-se diminuição não significativa da proliferação quando os animais são tratados com TNBS. Barra de escala 100 μm. * $p < 0.05$ t-test.

5.3 Determinação do estado inflamatório das larvas de *zebrafish* expostas a TNBS.

Para caracterizar melhor o efeito da exposição ao TNBS, nós avaliamos as citocinas inflamatórias desses animais por PCR quantitativo e *western blot*. Observou-se, que a nível transcricional o tratamento com o hapteno aumentou entre 3 a 15 vezes a expressão das moléculas inflamatórias *tnfa*, *il1b*, *infy1-2* e *il8*, e levemente a citocina anti-inflamatória *il10* (Fig. 10 B). Não se constatarem diferenças na expressão de *il6*,

Figura 10 - Administração de TNBS induz aumento de citocinas inflamatórias. A. Desenho experimental indicando exposição ao TNBS 60 $\mu\text{g/mL}$ a partir dos 3 dpf e análise aos 6 dpf **B.** Larvas expostas ao TNBS apresentam um leve aumento de transcritos das citocinas *tnfa* (TNBS Mean=17.95), *il1b* (TNBS Mean=9.06), *infy1-2* (TNBS Mean=12.90), *il12* (TNBS Mean=3.39), *il8* (TNBS Mean=1.63), e *il10* (TNBS Mean=2.40). * $p < 0.05$ t-test. **C.** Western blot de pools de intestinos de animais tratados ou não com TNBS. Representativo de quatro experimentos. * $p < 0.05$ t-test.

myd88 e *nfkB*. A expressão dos níveis protéicos de *Tnf α* demonstrou um aumento não significativo nas larvas tratadas com TNBS quando comparada com controles (Fig. 10 C).

A análise de linhagens transgênicas é de grande utilidade na hora de estudar *in vivo* o comportamento de células imunes. No *zebrafish*, as células mielóides são geradas no pronefros (Pn), o equivalente à medula óssea dos mamíferos, e são armazenadas no Tecido Hematopoiético Caudal (CHT). O transgênico de células mielóides *Lys:DSRED* mostrou um incremento no número de células infiltrantes tanto no intestino quanto em diferentes zonas da pele, assim como no CHT e no Pn (Fig. 11 B) logo após ser tratado com TNBS. A quantificação do número de células infiltrantes no intestino demonstrou um aumento significativo nos animais tratados com TNBS (Fig. 11 C).

Figura 11 - A exposição ao TNBS produz um maior recrutamento de células mielóides. **A.** Desenho experimental indicando exposição ao TNBS 60 $\mu\text{g/mL}$ a partir dos 3 dpf e análise aos 6 dpf. **B.** Larvas de 6 dpf do transgênico *Lys:DSRED* expostas a 60 $\mu\text{g/mL}$ de TNBS apresentam maior quantidade de células mielóides quando comparado aos controles. Barra de escala 100 μm . Pn: Pronefros; CHT: Tecido Hematopoiético Caudal. **C.** Gráfico do número de macrófagos infiltrantes no intestino. * $p < 0.05$ t-test.

5.4 Análise da microbiota em peixes tratados com TNBS

Um fator importante que participa na patogênese das IBD é a microbiota, e assim como as células imunes do hospedeiro podem reagir contra antígenos bacterianos comensais, a própria microbiota pode alterar em estados inflamatórios, contribuindo ainda mais à cronicidade deste. Para estudar as mudanças nos diferentes grupos bacterianos durante a inflamação por TNBS, realizamos PCR quantitativo contra o rRNA 16S específicos para cada filo em larvas de 10 dpf tratadas com 40 µg/mL de TNBS. A exposição ao TNBS induziu uma diminuição nos filos Firmicutes e Alphaproteobacteria, e um aumento de Gammaproteobacteria e Actinobacteria, enquanto as Fusobacteria não foram significativamente alteradas (Fig. 12) e os níveis de Bacteroidetes e Betaproteobacteria foram indetectáveis (não mostrado).

Figura 12 - A exposição ao TNBS muda a composição da microbiota. **A.** Desenho experimental indicando exposição ao TNBS 40 µg/mL a partir dos 3 dpf até os 10 dpf. **B.** Gráficos de expressão relativa do gen de rRNA 16S de filos e classes bacterianos de intestinos de larvas de 10 dpf expostas a 40 µg/mL de TNBS a partir dos 3 dpf. * $p < 0.05$ t-test.

5.5 Tratamento com Ácidos Graxos de Cadeia Curta

Como foi mencionado na introdução, os AGCCs são produtos do metabolismo da microbiota, e ultimamente estão sendo estudados por suas propriedades imunomoduladoras. Porém, hoje em dia não existem estudos destes compostos no *zebrafish*, pelo que seu uso como terapia contra a inflamação foi testado e padronizado em base nos tratamentos feitos em outros animais e em cultura celular.

Figura 13 - Tratamento com ácidos graxos de cadeia curta melhora a sobrevivência de animais expostos ao TNBS. A. Desenho experimental indicando exposição ao TNBS 40 µg/mL a partir dos 3 dpf e análise de sobrevivência até os 12 dpf. **B.** Curva de sobrevivência de larvas expostas a 40 µg/ml de TNBS e diferentes concentrações de acetato, propionato e butirato em conjunto (AGCC 10-30-50 mM) *p < 0.0001 log-rank (Mantel-Cox) todas as curvas foram estatisticamente diferentes entre elas.

Para começar, foram testadas três concentrações de acetato, propionato e butirato (10-30-50 mM), colocados em conjunto com TNBS 40 µg/mL e se observou a sobrevivência dos animais. A coadministração de AGCCs em concentrações acima de 10 mM mostrou uma indução de morte mais rápida em comparação ao exposto somente ao TNBS, enquanto que a concentração de 10 mM obteve uma leve melhora na sobrevivência comparado com o controle de colite (Fig. 13).

A análise da citocina inflamatória Tnfα por *western blot* em animais tratados até os 10 dpf mostrou um aumento na expressão desta em animais expostos ao TNBS e uma leve diminuição da mesma quando foi tratado em conjunto com acetato, propionato e butirato, na concentração de 10 mM de cada um (Fig. 14 B). Por último, a microbiota sofreu algumas modificações aumentando todos os grupos em comparação ao exposto ao TNBS, e significativamente só os filos Fusobacteria, Gammaproteobacteria e Actinobacteria, demonstrando que o tratamento com AGCCs têm um efeito direto na microbiota (Fig. 14 C).

Figura 14 - Tratamento com ácidos graxos de cadeia curta induz efeitos anti-inflamatórios e modifica a microbiota. **A.** Desenho experimental indicando exposição ao TNBS 40 μg/mL a partir dos 3 dpf e análise aos 10 dpf. **B.** Expressão proteica de *Tnfa* de animais expostos a TNBS 40 μg/mL e tratados com AGCCs (acetato, propionato e butirato) 10 mM. **C.** Expressão relativa de rRNA 16S de filos bacterianos em 10 ng de tecido intestinal. * $p < 0.05$ *Two-way* ANOVA. Fusob: Fusobacteria; Firm: Firmicutes; Alpha: Alphaproteobacteria; Gamma: Gammaproteobacteria; Actino: Actinobacteria.

Diante destes resultados, podemos concluir que a exposição ao TNBS induz um estado inflamatório agudo com perda da arquitetura intestinal normal, e que age afetando a sobrevivência dos animais expostos a ele dependendo do tempo e dose usada. Com uma exposição ao TNBS por 3 dias é possível visualizar alterações na capacidade endocítica do intestino, na distribuição dos neurônios entéricos ao longo do intestino, e disbiose da microbiota comensal. Não se observam mudanças na produção de muco ou no número de células caliciformes nem na quantidade de células apoptóticas e proliferativas. O tratamento com AGCCs em coadministração ao TNBS induz alta mortalidade a concentrações de 30-50 mM, porém, na concentração de 10 mM teve leve ação anti-inflamatória e ação sobre os grupos da microbiota do *zebrafish*.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, examinamos a ação do ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfônico (TNBS) como agente iniciador da inflamação, no intestino da larva do *zebrafish*. Constatamos que o TNBS tem um efeito dose-dependente na sobrevivência dos animais expostos, ele afeta o intestino do *zebrafish* incrementando o lúmen intestinal, alisando as vilosidades intestinais e afinando a parede intestinal, induzindo uma perda de função endocítica no intestino médio e uma redistribuição dos neurônios entéricos ao longo do intestino. O TNBS não afeta a produção de muco nem a quantidade de células caliciformes e produz uma tendência não significativa ao aumento da apoptose e diminuição da proliferação em células da parede intestinal. Também observamos que a exposição ao hapteno produz aumento de citocinas inflamatórias e infiltrado de células mielóides, tanto no intestino quanto em outras zonas do corpo do peixe, e que existe uma modificação da microbiota em estes animais. Por último, vimos que o tratamento com AGCCs diminuiu a inflamação só com a concentração de 10 mM e também teve influência na microbiota, modificando a quantidade de vários filos bacterianos.

As IBDs surgem da quebra da tolerância imune contra a microbiota comensal, levando a uma inflamação de tipo crônica e dano na mucosa epitelial em indivíduos geneticamente susceptíveis. Além da predisposição genética, diversos fatores etiológicos ambientais têm se relacionado com as IBD incluindo estresse, hábito de fumar, uso excessivo de alguns medicamentos como antibióticos e AINEs, má alimentação, entre outros. Apesar dos muitos estudos em andamento, ainda não se sabe exatamente em que ponto começa a doença. Assim, o exame direto de amostras humanas e/ou modelos animais é de extrema importância para esclarecer os mecanismos patológicos envolvidos nestas doenças e procurar melhores estratégias terapêuticas para elas. Parâmetros biologicamente importantes para modelar as IBD humanas incluem a necessidade da microbiota em desencadear a inflamação, a produção de citocinas pró-inflamatórias, o recrutamento de leucócitos e a perda da função intestinal ([91](#), [121](#)).

Nossas análises foram concentradas no exame de larvas entre 6 a 10 dpf, idade na qual ainda não existem células da imunidade adaptativa circulantes, pelo que a indução da colite se desenvolve em um contexto de imunidade inata isolada, por isso pensamos, que nosso modelo não chega à cronicidade. Apesar disso, conseguimos fazer um paralelo com algumas características de outros modelos de IBD em mamíferos tais

como, ação dose-dependente do TNBS, infiltração de leucócitos no intestino, e produção aumentada das citocinas *infy*, *tnfa* e *il-12*, características observadas também por Oehlers et al. (84, 91) e Fleming et al. (90). Curiosamente, as citocinas antes mencionadas são participantes do perfil Th1 resultantes de uma resposta inflamatória local aguda presentes na maioria dos experimentos de indução de colite com uma dose de TNBS em murinos (113). A partir disso, pode-se inferir que são as próprias células epiteliais intestinais e as células imunes inatas residentes no intestino que iniciam o processo inflamatório, sendo que a ausência das células T impossibilita desenvolver um curso crônico da inflamação.

Hoje em dia se acredita que a ação do TNBS como indutor de colite é através da sua ação como hapteno, isto é, age como uma molécula que pode provocar uma resposta imune quando está ligada a um carreador, que por si só não vai produzir uma resposta imunológica. Porém, o TNBS consegue induzir colite em animais sem sensibilização prévia, e na larva de *zebrafish*, que é um organismo que não tem desenvolvido o sistema imune adaptativo para mediar uma resposta de células T contra o hapteno, pelo que o TNBS poderia estar agindo diretamente, já matando células epiteliais, evidenciado na nossa observação da tendência ao aumento da apoptose intestinal, ou desregulando diretamente a função da célula epitelial intestinal, ou indiretamente, quebrando a proteção que oferecem as mucinas ao epitélio intestinal, resultando em um contato irregular da microbiota com as células do hospedeiro. Isto concorda com o trabalho de Fleming et.al. (90), onde observaram o intestino de larvas de *zebrafish* expostas ao TNBS na microscopia eletrônica e detectaram acumulação de lisossomos na região apical da célula epitelial e perda das *tight* e *gap junctions* entre as células, porém as microvilosidades das IECs se mantiveram conservadas, indicando que o TNBS tem uma ação direta na fisiologia das IECs e não uma ação erosiva. De qualquer maneira, observamos que a gravidade e variedade da lesão causada pelo TNBS no intestino está diretamente relacionada à concentração do reagente e é também ao tempo de acumulação do TNBS no intestino da larva, por tanto, pensamos que com uma exposição prolongada ao TNBS em doses menores poderíamos observar uma ação mais crônica do reagente, incrementando a apoptose e talvez incrementando a inflamação.

No exame visual, observamos que o intestino dos animais tratados com TNBS sofreu um leve encurtamento em relação aos controles, no entanto, esse encurtamento parece ser reflexo do encurtamento da larva que está completamente imersa no líquido.

A nossa proposta inicial era que essa diminuição no comprimento era devido ao aumento da apoptose e à diminuição da proliferação evidenciados pelos ensaios de TUNEL e anti-H3 fosforilada, mas seria necessário quantificar as células apoptóticas e em proliferação de toda a larva para afirmar este fato, além disso, o número de larvas analisadas deve ser maior. Por outro lado, observamos aumento da dilatação do bulbo intestinal e podemos acreditar que alterações funcionais nas fibras musculares ou no sistema encarregado de controlar o tono do músculo (SNE, células intersticiais de Cajal) possam ter alguma influencia neste fato, porém, um estudo mais profundo destes fatores é necessário para concluir com certeza esta afirmação.

O TNBS teve também outros efeitos no intestino da larva do *zebrafish*, evidenciados pela histologia, tais como aumento do lúmen intestinal, perda da arquitetura das vilosidades intestinais levando a um achatamento do epitélio. No entanto, estas características histológicas são pouco representativas do que é observado durante a CD e a UC nos humanos, onde existe grande perda das vilosidades e se apreciam grandes acumulações de células imunes (117). O curto tempo de exposição analisado e a falta do sistema imune adaptativo neste modelo são fatores que podem afetar a aparição de estas características, pelo que seria interessante aplicar o modelo em peixes de mais de um mês de vida para comparar o efeito do TNBS com e sem participação da imunidade adaptativa.

A coloração de *neutral red* tem sido usada como marcador de dano epitelial em larvas de *zebrafish* (84). O *neutral red* é “ingerido” por células vivas através da endocitose em massa e cora fagossomos e lisossomos intracelulares, pelo que é também um indicador da função endocítica normal do intestino médio do *zebrafish* (91). Acreditamos que a capacidade do intestino médio de ingerir a corante foi afetada totalmente pela adição do TNBS, também de forma dose-dependente, e isto poderia se refletir na capacidade do intestino de absorver alimentos. Por outro lado a alteração morfologia das células caliciformes é um ponto de discorda entre autores, pois alguns alegam que as células caliciformes aumentam em número e a sua morfologia é afetada por causa do TNBS no *zebrafish* (90, 112), mas outros se referem ao modelo do TNBS como não indutor de mucinas (85). Nossa coloração de montagem completa com *alcian blue* não evidenciou diferenças na produção de muco nem no número de células caliciformes entre o controle e o tratado com TNBS. Sem embargo, as mudanças nas células caliciformes observadas por dois autores que usaram o TNBS (90, 112) podem

estar ligadas ao tempo e concentração deste, pois eles tratam por cinco dias em vez de três, como nosso caso.

Um dos pontos nunca estudados anteriormente em este modelo em *zebrafish* são as alterações do SNE. Nós observamos que a exposição ao TNBS ocasionou uma redistribuição dos neurônios entéricos no intestino médio sem diferença estatística no número total de neurônios. Podemos especular que isto pode dever-se a uma compensação do SNE pela perda de capacidade endocítica do intestino médio, de modo que melhore a captação de alimentos influenciando no peristaltismo intestinal. No entanto, pouco podemos concluir pois são necessários análises de contração peristáltica e outros parâmetros neuronais, como ramificações neuronais, neurotransmissores e células da glia para estabelecer o que realmente acontece. Em este ponto, seria interessante aprofundar nas modificações que sofre os SNE durante eventos inflamatórios como a colite no modelo de *zebrafish*, devido a que atualmente não existem trabalhos em relação ao tema.

Como falado na introdução, a colonização da microbiota começa em torno dos 4 dpf, é por isso que as análises desta foram realizadas aos 10 dpf, quando a colonização já está estabelecida. As modificações das bactérias residentes em este modelo se resumem a uma diminuição de Firmicutes e Alphaproteobacterias, e aumento das Gammaproteobacterias e Actinobactérias, que é consistente com a literatura ([112](#)) onde se observou aos 8 dpf um aumento das Proteobacterias e diminuição dos Firmicutes logo da exposição ao TNBS. Isto é de grande interesse pois nas IBDs humanas o grupo das Proteobacterias também se mantém aumentado ([81](#), [122](#)), e representantes do grupo das Bacteroidetes e Firmicutes diminuem de forma acentuada ([20](#)). Isto demonstra que a microbiota do *zebrafish* tem um comportamento semelhante à humana e pode ser um bom modelo para o estudo desta.

Por último, o tratamento com acetato, propionato e butirato coadministrados junto ao TNBS, tem melhores resultados em concentrações não superiores a 10 mM, pois acima desta concentração os animais não sobreviviam. Consequentemente, os 10 mM de AGCCs parecem ser suficientes para diminuir a expressão da citocina pró-inflamatória TNF α , sugerindo modulação da inflamação. Porém, precisa-se de uma análise mais profunda, com concentrações ainda menores e em tratamento separado para estudar o real efeito dos AGCCs em este modelo de inflamação. A ação dos AGCCs na microbiota é contraditória dado que aumentam significativamente três grupos bacterianos, Fusobacterias, Gammaproteobacterias e Actinobacterias, que têm sido

relacionados de diferentes formas às IBDs. Fusobacterias são comumente achadas no intestino do *zebrafish* (75), mas nos humanos são parte da microbiota bucal (123) e algumas espécies (*F. nucleatum*) têm sido relacionadas com pacientes com IBD (124-126) e câncer colorectal (127, 128). Gammaproteobacterias e Actinobacterias também são encontradas aumentadas em IBDs (20, 81, 129). É necessário fazer um estudo no nível de espécie para saber quais são exatamente as bactérias modificadas.

Em conclusão, este modelo surge como uma ferramenta para estudar a inflamação intestinal aguda, as alterações morfofuncionais que afetam o intestino durante a inflamação e as possíveis estratégias para seu tratamento e melhora. As características do animal e seu pequeno tamanho tornam este modelo uma plataforma fascinante para efetuar ensaios a grande escala para modificadores terapêuticos da enterocolite *in vivo*.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho, nós podemos concluir que a exposição ao TNBS:

- Provoca uma mortalidade dependente da concentração utilizada e do tempo de exposição;
- Induz alterações histológicas incluindo aumento do lúmen intestinal, aplanamento das vilosidades intestinais e afinamento da parede intestinal;
- Afeta a capacidade endocítica do intestino, mas não a produção de mucinas e quantidade de células caliciformes, e produz uma redistribuição dos neurônios entéricos;
- Produz aumento da apoptose e diminuição da proliferação das células epiteliais intestinais;
- Provoca aumento de moléculas pró-inflamatórias como *tnfa*, *infy1-2* e *il-12a*, além de um leve aumento de *il1 β* e *il10*, também incrementa o infiltrado leucocitário no intestino; e
- O tratamento com AGCCs, tem um efeito tóxico em altas concentrações e induze um efeito anti-inflamatório em concentrações menores.

Deste modo, o TNBS provoca uma inflamação aguda no intestino de larvas de *zebrafish* com elementos similares aos modelos murinos de IBD, e pode ser utilizado para ensaios terapêuticos anti-inflamatórios a grande escala.

REFERÊNCIAS*

1. Inflammatory Bowel Disease: Definition(s) from the Unified Medical Language System® Diseases Database 2011 [cited 2015 April]. Available from: <http://www.diseasesdatabase.com/umlsdef.asp?glnUserChoice=31127>.
2. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:573-621.
3. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134(2):577-94.
4. Epidemiology of the IBD CDC Centers for Disease Control and Prevention [cited 2015 April]. Available from: <http://www.cdc.gov/ibd/ibd-epidemiology.htm>.
5. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*. 2014;104:Unit 15 25.
6. te Velde AA, Verstege MI, Hommes DW. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12(10):995-9.
7. Dooley K, Zon LI. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2000;10(3):252-6.
8. Goldsmith JR, Jobin C. Think small: zebrafish as a model system of human pathology. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:817341.
9. Santoriello C, Zon LI. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest*. 2012;122(7):2337-43.
10. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013;496(7446):498-503.
11. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res*. 2013;54(9):2325-40.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

12. Kim CH, Park J, Kim M. Gut microbiota-derived short-chain Fatty acids, T cells, and inflammation. *Immune Netw.* 2014;14(6):277-88.
13. Vinolo MA, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients.* 2011;3(10):858-76.
14. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science.* 2013;341(6145):569-73.
15. Geuking MB, McCoy KD, Macpherson AJ. Metabolites from intestinal microbes shape Treg. *Cell Res.* 2013;23(12):1339-40.
16. Crohn disease: Definition(s) from the Unified Medical Language System ® Diseases Database2011 [cited 2013 Nov]. Available from: <http://www.diseasesdatabase.com/umlsdef.asp?glnUserChoice=3178>.
17. Ulcerative Colitis: Definition(s) from the Unified Medical Language System ® Diseases Database2011 [cited 2013 Nov]. Available from: <http://www.diseasesdatabase.com/umlsdef.asp?glnUserChoice=13495>. .
18. Ramasundara M, Leach ST, Lemberg DA, Day AS. Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(2):202-8.
19. Wehkamp J, Stange EF, Fellermann K. Defensin-immunology in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin Biol.* 2009;33 Suppl 3:S137-44.
20. Sartor RB, Mazmanian SK. Intestinal Microbes in Inflammatory Bowel Diseases. *Am J Gastroenterol Suppl.* 2012;1:15-21.
21. Vignal C, Singer E, Peyrin-Biroulet L, Desreumaux P, Chamaillard M. How NOD2 mutations predispose to Crohn's disease? *Microbes Infect.* 2007;9(5):658-63.
22. Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, Croitoru K, Girardin SE. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(1):9-23.
23. McGovern D, Powrie F. The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut.* 2007;56(10):1333-6.

24. Zwiers A, Kraal L, van de Pouw Kraan TC, Wurdinger T, Bouma G, Kraal G. Cutting edge: a variant of the IL-23R gene associated with inflammatory bowel disease induces loss of microRNA regulation and enhanced protein production. *J Immunol.* 2012;188(4):1573-7.
25. Okazawa A, Kanai T, Watanabe M, Yamazaki M, Inoue N, Ikeda M, et al. Th1-mediated intestinal inflammation in Crohn's disease may be induced by activation of lamina propria lymphocytes through synergistic stimulation of interleukin-12 and interleukin-18 without T cell receptor engagement. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(12):3108-17.
26. Garrett WS, Lord GM, Punit S, Lugo-Villarino G, Mazmanian SK, Ito S, et al. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell.* 2007;131(1):33-45.
27. Garrett WS, Punit S, Gallini CA, Michaud M, Zhang D, Sigrist KS, et al. Colitis-associated colorectal cancer driven by T-bet deficiency in dendritic cells. *Cancer Cell.* 2009;16(3):208-19.
28. Niederreiter L, Kaser A. Endoplasmic reticulum stress and inflammatory bowel disease. *Acta Gastroenterol Belg.* 2011;74(2):330-3.
29. Bogaert S, De Vos M, Olievier K, Peeters H, Elewaut D, Lambrecht B, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in inflammatory bowel disease: a different implication for colonic and ileal disease? *PLoS One.* 2011;6(10):e25589.
30. Saleh M, Elson CO. Experimental inflammatory bowel disease: insights into the host-microbiota dialog. *Immunity.* 2011;34(3):293-302.
31. Wirtz S, Neurath MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(11):1073-83.
32. Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med.* 1998;188(10):1929-39.
33. Wang X, Ouyang Q, Luo WJ. Oxazolone-induced murine model of ulcerative colitis. *Chin J Dig Dis.* 2004;5(4):165-8.

34. Whittem CG, Williams, A.D., Williams, C.S. Murine Colitis Modeling using Dextran Sulfate Sodium (DSS). *Journal of Visualized Experiments* 2010.
35. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990;98(3):694-702.
36. Perse M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:718617.
37. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*. 2007;2(3):541-6.
38. Mouse Models for Inflammatory Bowel Disease TNO, Knowledge for business 2010 [cited 2013 Oct]. Available from: www.tno.nl/pharma.
39. Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R, van Loo G, Danese S, et al. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature*. 2007;446(7135):557-61.
40. Wirtz S, Finotto S, Kanzler S, Lohse AW, Blessing M, Lehr HA, et al. Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN-gamma-producing CD4+ T cells that respond to bacterial antigens. *J Immunol*. 1999;162(4):1884-8.
41. Westerfield M. *The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th Ed. ed: Eugene, Univ. of Oregon Press; 2000.
42. White RM, Sessa A, Burke C, Bowman T, LeBlanc J, Ceol C, et al. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell*. 2008;2(2):183-9.
43. Zebrafish Genome Project [Internet]. Available from: http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/.
44. Amatruda JF, Zon LI. Dissecting hematopoiesis and disease using the zebrafish. *Dev Biol*. 1999;216(1):1-15.

45. Paik EJ, Zon LI. Hematopoietic development in the zebrafish. *Int J Dev Biol.* 2010;54(6-7):1127-37.
46. Palis J, Yoder MC. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol.* 2001;29(8):927-36.
47. Detrich HW, 3rd, Kieran MW, Chan FY, Barone LM, Yee K, Rundstadler JA, et al. Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(23):10713-7.
48. Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development.* 1999;126(17):3735-45.
49. Thompson MA, Ransom DG, Pratt SJ, MacLennan H, Kieran MW, Detrich HW, 3rd, et al. The cloche and spadetail genes differentially affect hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol.* 1998;197(2):248-69.
50. Willett CE, Kawasaki H, Amemiya CT, Lin S, Steiner LA. Ikaros expression as a marker for lymphoid progenitors during zebrafish development. *Dev Dyn.* 2001;222(4):694-8.
51. Burns CE, Traver D, Mayhall E, Shepard JL, Zon LI. Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway. *Genes Dev.* 2005;19(19):2331-42.
52. Lam SH, Chua HL, Gong Z, Wen Z, Lam TJ, Sin YM. Morphologic transformation of the thymus in developing zebrafish. *Dev Dyn.* 2002;225(1):87-94.
53. Mitra SvdS, A.; Alnabulsi, A.; Secombes, A.; Bird, S. Fishing for CD4 positive cells in the zebrafish. *The Journal of Immunology*; 2010.
54. Painter CAC, C., editor Adaptive immunity in a zebrafish model of melanoma. AACR 104th Annual Meeting 2013 Apr 6-10, 2013; Washington, DC.
55. Langenau DM, Zon LI. The zebrafish: a new model of T-cell and thymic development. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(4):307-17.
56. Quintana FJ, Iglesias AH, Farez MF, Caccamo M, Burns EJ, Kassam N, et al. Adaptive autoimmunity and Foxp3-based immunoregulation in zebrafish. *PLoS One.* 2010;5(3):e9478.

57. Danilova N, Steiner LA. B cells develop in the zebrafish pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(21):13711-6.
58. Page DM, Wittamer V, Bertrand JY, Lewis KL, Pratt DN, Delgado N, et al. An evolutionarily conserved program of B-cell development and activation in zebrafish. *Blood*. 2013;122(8):e1-11.
59. Willett CE, Cherry JJ, Steiner LA. Characterization and expression of the recombination activating genes (rag1 and rag2) of zebrafish. *Immunogenetics*. 1997;45(6):394-404.
60. Bingulac-Popovic J, Figueroa F, Sato A, Talbot WS, Johnson SL, Gates M, et al. Mapping of mhc class I and class II regions to different linkage groups in the zebrafish, *Danio rerio*. *Immunogenetics*. 1997;46(2):129-34.
61. Sultmann H, Sato A, Murray BW, Takezaki N, Geisler R, Rauch GJ, et al. Conservation of Mhc class III region synteny between zebrafish and human as determined by radiation hybrid mapping. *J Immunol*. 2000;165(12):6984-93.
62. Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity*. 2004;20(4):367-79.
63. Traver D, Herbomel P, Patton EE, Murphey RD, Yoder JA, Litman GW, et al. The zebrafish as a model organism to study development of the immune system. *Adv Immunol*. 2003;81:253-330.
64. Wallace KN, Akhter S, Smith EM, Lorent K, Pack M. Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mech Dev*. 2005;122(2):157-73.
65. Ng AN, de Jong-Curtain TA, Mawdsley DJ, White SJ, Shin J, Appel B, et al. Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. *Dev Biol*. 2005;286(1):114-35.
66. Berman J, Hsu K, Look AT. Zebrafish as a model organism for blood diseases. *Br J Haematol*. 2003;123(4):568-76.
67. Shepherd I, Eisen J. Development of the zebrafish enteric nervous system. *Methods Cell Biol*. 2011;101:143-60.

68. Sartor RB. Genetics and environmental interactions shape the intestinal microbiome to promote inflammatory bowel disease versus mucosal homeostasis. *Gastroenterology*. 2010;139(6):1816-9.
69. Olden T, Akhtar T, Beckman SA, Wallace KN. Differentiation of the zebrafish enteric nervous system and intestinal smooth muscle. *Genesis*. 2008;46(9):484-98.
70. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the autonomic nervous system*. 2000;81(1-3):87-96.
71. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002;122(1):44-54.
72. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(5):313-23.
73. Feng T, Elson CO. Adaptive immunity in the host-microbiota dialog. *Mucosal Immunol*. 2011;4(1):15-21.
74. Garrett WS, Gallini CA, Yatsunenkov T, Michaud M, DuBois A, Delaney ML, et al. Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell Host Microbe*. 2010;8(3):292-300.
75. Bates JM, Mittge E, Kuhlman J, Baden KN, Cheesman SE, Guillemin K. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Dev Biol*. 2006;297(2):374-86.
76. Kanther M, Sun X, Muhlbauer M, Mackey LC, Flynn EJ, 3rd, Bagnat M, et al. Microbial colonization induces dynamic temporal and spatial patterns of NF-kappaB activation in the zebrafish digestive tract. *Gastroenterology*. 2011;141(1):197-207.
77. Kanther M, Tomkovich S, Xiaolun S, Grosser MR, Koo J, Flynn EJ, 3rd, et al. Commensal microbiota stimulate systemic neutrophil migration through induction of serum amyloid A. *Cell Microbiol*. 2014;16(7):1053-67.

78. Roeselers G, Mittge EK, Stephens WZ, Parichy DM, Cavanaugh CM, Guillemin K, et al. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME J.* 2011;5(10):1595-608.
79. Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, Gordon JI. Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell.* 2006;127(2):423-33.
80. Rawls JF, Samuel BS, Gordon JI. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(13):4596-601.
81. Mukhopadhyay I, Hansen R, El-Omar EM, Hold GL. IBD-what role do Proteobacteria play? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9(4):219-30.
82. Pham LN, Kanther M, Semova I, Rawls JF. Methods for generating and colonizing gnotobiotic zebrafish. *Nat Protoc.* 2008;3(12):1862-75.
83. Brugman S, Liu KY, Lindenbergh-Kortleve D, Samsom JN, Furuta GT, Renshaw SA, et al. Oxazolone-induced enterocolitis in zebrafish depends on the composition of the intestinal microbiota. *Gastroenterology.* 2009;137(5):1757-67 e1.
84. Oehlers SH, Flores MV, Hall CJ, Okuda KS, Sison JO, Crosier KE, et al. Chemically induced intestinal damage models in zebrafish larvae. *Zebrafish.* 2013;10(2):184-93.
85. Oehlers SH, Flores MV, Hall CJ, Crosier KE, Crosier PS. Retinoic acid suppresses intestinal mucus production and exacerbates experimental enterocolitis. *Dis Model Mech.* 2012;5(4):457-67.
86. Goldsmith JRR, J. F.; Jobin, C. . The neuropeptide DALDA protects against NSAID-induced acute intestinal injury in zebrafish larvae. *Gastroenterology.* 2011;140(5):S-474.
87. Goldsmith JR, Cocchiari JL, Rawls JF, Jobin C. Glafenine-induced intestinal injury in zebrafish is ameliorated by mu-opioid signaling via enhancement of Atf6-dependent cellular stress responses. *Dis Model Mech.* 2013;6(1):146-59.

88. Kaser A, Lee AH, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*. 2008;134(5):743-56.
89. Kaser A, Martinez-Naves E, Blumberg RS. Endoplasmic reticulum stress: implications for inflammatory bowel disease pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010;26(4):318-26.
90. Fleming A, Jankowski J, Goldsmith P. In vivo analysis of gut function and disease changes in a zebrafish larvae model of inflammatory bowel disease: a feasibility study. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(7):1162-72.
91. Oehlers SH, Flores MV, Okuda KS, Hall CJ, Crosier KE, Crosier PS. A chemical enterocolitis model in zebrafish larvae that is dependent on microbiota and responsive to pharmacological agents. *Dev Dyn*. 2011;240(1):288-98.
92. Geiger BM, Gras-Miralles B, Ziogas DC, Karagiannis AK, Zhen A, Fraenkel P, et al. Intestinal upregulation of melanin-concentrating hormone in TNBS-induced enterocolitis in adult zebrafish. *PLoS One*. 2013;8(12):e83194.
93. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*. 1995;125(6):1401-12.
94. Macfarlane GT, Macfarlane S. Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. *J Clin Gastroenterol*. 2011;45 Suppl:S120-7.
95. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*. 1987;28(10):1221-7.
96. Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M, Vidal A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13(20):2826-32.
97. Vinolo MA, Ferguson GJ, Kulkarni S, Damoulakis G, Anderson K, Bohlooly YM, et al. SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor. *PLoS One*. 2011;6(6):e21205.

98. Oh DY, Lagakos WS. The role of G-protein-coupled receptors in mediating the effect of fatty acids on inflammation and insulin sensitivity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011;14(4):322-7.
99. Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael JY, Lannoy V, Decobecq ME, et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem*. 2003;278(28):25481-9.
100. Cox MA, Jackson J, Stanton M, Rojas-Triana A, Bober L, Lavery M, et al. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. *World J Gastroenterol*. 2009;15(44):5549-57.
101. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282-6.
102. Al-Lahham S, Roelofsen H, Rezaee F, Weening D, Hoek A, Vonk R, et al. Propionic acid affects immune status and metabolism in adipose tissue from overweight subjects. *Eur J Clin Invest*. 2012;42(4):357-64.
103. Li L, Hua Y, Ren J. Short-chain fatty acid propionate alleviates Akt2 knockout-induced myocardial contractile dysfunction. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:851717.
104. Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*. 2000;47(3):397-403.
105. Usami M, Kishimoto K, Ohata A, Miyoshi M, Aoyama M, Fueda Y, et al. Butyrate and trichostatin A attenuate nuclear factor kappaB activation and tumor necrosis factor alpha secretion and increase prostaglandin E2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutr Res*. 2008;28(5):321-8.
106. Huang B, Yang XD, Lamb A, Chen LF. Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway. *Cell Signal*. 2010;22(9):1282-90.

107. Ashburner BP, Westerheide SD, Baldwin AS, Jr. The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol Cell Biol.* 2001;21(20):7065-77.
108. Meijer K, de Vos P, Priebe MG. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(6):715-21.
109. Canani RB, Costanzo MD, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J Gastroenterol.* 2011;17(12):1519-28.
110. Russo I, Luciani A, De Cicco P, Troncone E, Ciacci C. Butyrate attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in intestinal cells and Crohn's mucosa through modulation of antioxidant defense machinery. *PLoS One.* 2012;7(3):e32841.
111. 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):785-9.
112. He Q, Wang L, Wang F, Wang C, Tang C, Li Q, et al. Microbial fingerprinting detects intestinal microbiota dysbiosis in Zebrafish models with chemically-induced enterocolitis. *BMC Microbiology.* 2013;13(1):289.
113. Scheiffele F, Fuss IJ. Induction of TNBS colitis in mice. *Curr Protoc Immunol.* 2002;Chapter 15:Unit 15 9.
114. Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(3):341-52.
115. Geboes K. What histologic features best differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis? *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14 Suppl 2:S168-9.
116. Oehlers SH, Flores MV, Chen T, Hall CJ, Crosier KE, Crosier PS. Topographical distribution of antimicrobial genes in the zebrafish intestine. *Dev Comp Immunol.* 2011;35(3):385-91.

117. Gersemann M, Becker S, Kubler I, Koslowski M, Wang G, Herrlinger KR, et al. Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation*. 2009;77(1):84-94.
118. Lakhan SE, Kirchgessner A. Neuroinflammation in inflammatory bowel disease. *J Neuroinflammation*. 2010;7:37.
119. Geboes K, Collins S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol Motil*. 1998;10(3):189-202.
120. Dalmau J, Furneaux HM, Cordon-Cardo C, Posner JB. The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy) antigen in human normal and tumor tissues. *Am J Pathol*. 1992;141(4):881-6.
121. Grisham MB. Do different animal models of IBD serve different purposes? *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14 Suppl 2:S132-3.
122. Hansen R, Russell RK, Reiff C, Louis P, McIntosh F, Berry SH, et al. Microbiota of de-novo pediatric IBD: increased *Faecalibacterium prausnitzii* and reduced bacterial diversity in Crohn's but not in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(12):1913-22.
123. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9(1):55-71.
124. Strauss J, Kaplan GG, Beck PL, Rioux K, Panaccione R, Devinney R, et al. Invasive potential of gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(9):1971-8.
125. Ohkusa T, Okayasu I, Ogihara T, Morita K, Ogawa M, Sato N. Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2003;52(1):79-83.
126. Sasaki M, Klapproth JM. The role of bacteria in the pathogenesis of ulcerative colitis. *J Signal Transduct*. 2012;2012:704953.

127. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012;22(2):299-306.
128. Keku TO, McCoy AN, Azcarate-Peril AM. *Fusobacterium* spp. and colorectal cancer: cause or consequence? *Trends Microbiol.* 2013;21(10):506-8.
129. Walters WA, Xu Z, Knight R. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Lett.* 2014;588(22):4223-33.

ANEXOS

A – Artigos Publicados

Colombo A, Palma K, Armijo L, Mione M, Signore IA, **Morales C**, Guerrero N, Meynard MM, Pérez R, Suazo J, Marcelain K, Briones L, Härtel S, Wilson SW, Concha ML. Daam1a mediates asymmetric habenular morphogenesis by regulating dendritic and axonal outgrowth. *Development (Cambridge, England)*. 2013;140(19):3997-4007. doi:10.1242/dev.091934.

B - Artigos em Revisão

Morales C, Colombo A, Câmara NOS. Inflammatory diseases modelling in Zebrafish. *World Journal of Experimental Medicine*. Submitted at July 28, 2015.

C – Artigos em Redação

Ignacio A, **Morales C**, Câmara NOS, Almeida RR. Innate sensing of the gut microbiota: modulation of inflammatory and autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*. Abstract accepted at June 2, 2015.