

**CAMILA IDELÍ MORALES FÉNERO**

**Papel da microbiota na inflamação de baixo grau  
induzida por dieta hiperlipídica no *zebrafish* adulto**

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Versão Corrigida

São Paulo  
2020

## RESUMO

Morales Fénero CI. Papel da microbiota na inflamação de baixo grau induzida por dieta hiperlipídica no *zebrafish* adulto [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2020.

O consumo de dietas ricas em gorduras e carboidratos, e um estilo de vida sedentário são fatores que podem levar ao desenvolvimento da obesidade. A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal e está associada a um estado de inflamação crônica de baixo grau, com participação de infiltrado inflamatório no tecido adiposo e liberação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias. A microbiota tem sido apontada como um dos principais fatores na patogênese da obesidade, pois animais *germ-free* (GF) apresentam menor capacidade de captação de energia no intestino do que animais convencionais (CV), participando da indução do ganho de peso. A disbiose gerada durante a obesidade está ligada ao aumento da permeabilidade da parede intestinal, levando a um maior influxo de lipopolissacarídeos (LPS) no sangue, causando endotoxemia e inflamação sistêmica. A via do fator induzível por hipóxia (HIF) tem sido relacionada à manutenção da inflamação durante a obesidade e pode ter induzida pela microbiota através de *Toll-like receptors* (TLRs). O *zebrafish* (*Danio rerio*) surge como um modelo interessante para o estudo de doenças imuno-metabólicas e da microbiota, devido ao seu pequeno tamanho e fácil manipulação, capacidade de gerar animais *germ-free* e resposta metabólica semelhante à dos mamíferos. Desta forma nós propomos a hipótese de que a microbiota de animais sujeitos a uma dieta hiperlipídica induz inflamação de baixo grau nestes animais através da ativação da via do HIF no intestino. Neste estudo, estabelecemos um novo protocolo do modelo de obesidade induzida por dieta no *zebrafish* adulto. O impacto da microbiota na inflamação de baixo grau foi analisado nestes animais. Ao final de um período de 6 semanas, observamos um aumento significativo de peso nos animais com dieta hiperlipídica (high fat diet - HFD) comparados com animais do grupo controle (normal diet - ND), bem como maior glicemia basal, acúmulo de lipídios no fígado e aumento da gordura visceral e subcutânea, assim como aumento de triglicerídeos e valores de colesterol. O grupo HFD apresentou aumento do infiltrado de células imunes no intestino e aumento de citocinas inflamatórias em comparação ao ND. *Zebrafish knockout* para *myd88*

submetidos a dieta hiperlipídica apresentaram maior ganho de peso que animais selvagens. Peixes HFD mostraram diminuição de genes de proteínas de junções oclusivas, translocação bacteriana no intestino e disbiose intestinal com aumento dos Firmicutes. Análise de expressão gênica *in silico* de animais GF vs CV, indicou ativação da via do HIF induzida pela microbiota, o que também foi observado em aumento em animais HFD comparados com ND. Comprovação da participação da microbiota na ativação dessa via será estabelecida em experimentos de transplante da microbiota fecal em animais GF. Em conclusão, a administração de uma dieta hiperlipídica por 6 semanas reproduz um modelo de obesidade no *zebrafish* com características de síndrome metabólica, inflamação de baixo grau e disbiose da microbiota intestinal com ativação da via do HIF no intestino dos animais HFD.

**Palavras-chave:** Inflamação. Obesidade. Metabolismo. Microbiota. Peixes.

## ABSTRACT

Morales Fénero CI. Role of the microbiota in low-grade inflammation induced by a high-fat diet in adult *zebrafish* [thesis (Ph. D. thesis in Immunology)]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; 2020.

The consumption of diets rich in fats and carbohydrates, and a sedentary lifestyle are factors that can lead to the development of obesity. Obesity is characterized by excessive accumulation of body fat and is associated with a state of low-grade chronic inflammation, with the participation of inflammatory infiltrate in adipose tissue and systemic release of pro-inflammatory cytokines. The microbiota has been identified as one of the main factors in the pathogenesis of obesity, since germ-free (GF) animals have less capacity to capture energy in the intestine than conventional animals (CV), participating in the induction of weight gain. The dysbiosis generated during obesity is linked to increased permeability of the intestinal wall, leading to a greater influx of lipopolysaccharides (LPS) in the blood, causing endotoxemia and systemic inflammation. The hypoxia-inducible factor (HIF) pathway has been linked to the maintenance of inflammation during obesity and could be induced by the microbiota through Toll-like receptors (TLRs). The zebrafish (*Danio rerio*) emerges as an interesting model for the study of immuno-metabolic and microbiota diseases, due to its small size and easy manipulation, ability to generate germ-free animals and metabolic response similar to mammals. Thus we propose the hypothesis that the microbiota of animals subjected to a hyperlipidic diet induces low-grade inflammation through activation of the HIF pathway in the intestine. In this study, we established a new protocol of diet induced obesity model in adult zebrafish. The impact of the microbiota on low-grade inflammation was analyzed in animals. At the end of a 6-week period, we observed a significant increase in weight in animals with a high-fat diet (HFD) compared with animals in the control group (normal diet - ND), as well as higher basal glycemia, lipid accumulation in the liver and increased visceral and subcutaneous fat, as well as increased triglycerides and cholesterol values. The HFD group shows an increase in the infiltration of immune cells in the intestine and an increase in inflammatory cytokines compared to ND. Zebrafish knockout for *myd88* showed greater weight gain than wild-type animals. HFD fish showed decreased expression of genes of tight junction proteins, bacterial translocation in the intestine and intestinal dysbiosis with increased Firmicutes. *In silico* gene expression analysis

of GF vs CV animals, indicated activation of the HIF pathway induced by the microbiota, which was also observed increased in HFD animals compared with ND. Proof of the microbiota's participation in the activation of this pathway will be analyzed in faecal transplantation experiments in GF animals. In conclusion, the administration of a hyperlipidic diet for 6 weeks reproduces a model of obesity in zebrafish with characteristics of metabolic syndrome, low grade inflammation and dysbiosis of the intestinal microbiota with activation of the HIF pathway in the intestines of HFD animals.

**Keywords:** Inflammation. Obesity. Metabolism. Microbiota. Fishes.

## INTRODUÇÃO

A obesidade é uma condição que tem aumentado a nível mundial nos últimos 50 anos (1). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, em 2016 mais de 1,9 bilhões de adultos no mundo têm sobrepeso e, destes mais de 650 milhões são obesos (2). A obesidade, representa um risco para a saúde devido à aparição de comorbilidades como diabetes tipo 2, hipertensão, esteatose hepática, doenças cardiovasculares, entre outros (1). Por causa disso, estudos que ajudem a esclarecer a etiopatologia e conexões dessa doença são ainda necessários.

Atualmente, a obesidade é definida como uma doença imunometabólica com acúmulo excessivo de gordura corporal e aumento do estado inflamatório basal (3). A microbiota tem aparecido como um dos fatores desencadeantes da obesidade, com apresentação de mudanças nas populações bacterianas que levariam a maior absorção de nutrientes e aumento da permeabilidade intestinal a moléculas inflamatórias (4). Porém os mecanismos exatos de como isso acontece ainda estão em estudo.

Nos últimos anos o *zebrafish* tem ganho espaço na pesquisa como modelo de doenças humanas devido a características como fácil manipulação, facilidade de edição genética e baixo custo de manutenção (5, 6). Além disso, este peixe tropical possui 70% de similaridade genética com os humanos e vias metabólicas altamente conservadas, o que fazem dele um grande candidato para estudos metabólicos (7, 8). Ademais, a possibilidade de criar animais gnotobióticos têm sido crucial na pesquisa de interações microbiota-hospedeiro, possibilitando a observação de efeitos da microbiota intestinal *in vivo* (9-11).

Este estudo teve o intuito de usar estes atributos do *zebrafish* com o objetivo de estabelecer um modelo de obesidade e ter uma nova ferramenta para o estudo de doenças metabólicas, além da utilização de animais GF para uma análise isolada do efeito inflamatório da microbiota de animais com dieta hiperlipídica. Esperamos que os resultados desta pesquisa possam contribuir ao conhecimento da relação do eixo microbiota – inflamação - doenças metabólicas.

## Obesidade e Inflamação

Sobrepeso e obesidade têm sido definidas como o acúmulo excessivo de gordura no corpo, podendo afetar a saúde do indivíduo (2). A OMS tem considerado um índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 25 para o sobrepeso e 30 para a obesidade em humanos (2). Estas condições têm se tornado um problema de saúde pública visto que o aumento do IMC é um dos fatores de risco para condições como doenças cardiovasculares, diabetes, distúrbios músculo-esqueléticos e alguns tipos de câncer (2). A síndrome metabólica é um conjunto de condições que aumentam o risco de contrair doenças não-comunicáveis e a obesidade é um dos principais componentes. Outros fatores incluem altos níveis de triglicerídeos, baixos níveis de colesterol HDL (*high-density lipoprotein*), pressão arterial alta e altos níveis de açúcar no sangue (12).

Atualmente a obesidade tem sido considerada não só como uma condição de desbalanço metabólico, mas também inflamatória. Pesquisadores têm correlacionado a etiologia de doenças metabólicas relacionadas à obesidade a um estado inflamatório crônico de baixo grau ou “meta-inflamação” (13). Este estado é caracterizado pela produção anormal de citocinas, aumento de proteínas de fase aguda, ativação de vias de sinalização inflamatórias bem como alteração das células imunes residentes (13, 14). A primeira relação entre inflamação e metabolismo foi descoberta por Hotamisligil et al. que, em 1993, observou aumento da citocina Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  – TNF $\alpha$ ) no sangue e no tecido adiposo branco (*white adipose tissue* – WAT) de camundongos obesos (15). Posteriormente, estudos foram revelando a produção endócrina de moléculas e hormônios pelo WAT, que foram chamadas de adipocinas (16). As adipocinas têm papéis diversos no metabolismo, quimiotaxia, crescimento, vascularização e inflamação, e sua liberação está regulada pela gordura acumulada nos adipócitos (17). Várias adipocinas se encontram alteradas na obesidade, e acredita-se que estejam envolvidas na geração de patologias metabólicas relacionadas à ela (18).

Mais tarde, estudos em humanos e modelos animais de obesidade apontaram um aumento de leucócitos no tecido adiposo, principalmente macrófagos, com um desbalanço na relação de M1/M2, sendo M1 aumentados em detrimento dos macrófagos M2 (19-21). Macrófagos têm sido catalogados em fenótipos pró-

inflamatórios/classicamente ativados (M1) e anti-inflamatórios/alternativamente ativados (M2), porém acredita-se que *in vivo* existe um *continuum* nessa polarização, com macrófagos tendendo a um fenótipo mais do que outro, ou mostrando funções mistas (22). Macrófagos M2 são encontrados em maior quantidade em WAT de camundongos magros mas diminuem em comparação a macrófagos M1 em camundongos obesos (23). Além de macrófagos, é possível observar alteração de outras células imunes no tecido adiposo de animais e pacientes com obesidade, incluindo eosinófilos, mastócitos, neutrófilos, células dendríticas e células T (13).

Muitos pesquisadores acreditam que a inflamação de baixo grau na obesidade se origina no tecido adiposo. A morte celular de adipócitos hipertróficos e hipóxicos poderia ser o gatilho para o recrutamento de macrófagos iniciando a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF $\alpha$ , interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e *C-C motif chemokine 2* (CCL2), recrutando mais macrófagos e influenciando também a insulino-resistência (13, 24-26). No entanto, uma outra hipótese aponta o papel da microbiota como ponto inicial da inflamação na obesidade (4).

## **Microbiota e Obesidade**

Na última década, a microbiota intestinal tem demonstrado sua importância na etiologia da obesidade e da resistência à insulina (27). Estudos em camundongos evidenciaram que a transferência da microbiota de animais convencionais (CONV) para GF resulta em um aumento de 60% da gordura corporal e resistência à insulina, além de promover a lipogênese hepática *de novo* (28). De forma similar, Turnbaugh et al. mostrou que a transferência da microbiota de camundongos magros e obesos (*ob/ob*) para camundongos GF, incentivou o ganho de peso e o acúmulo de gordura naqueles animais transplantados com a microbiota de obeso (29). Além disso, a microbiota intestinal muda significativamente em humanos e modelos animais de obesidade, mostrando diminuição da diversidade e modificação das populações bacterianas (30, 31). A microbiota intestinal de humanos é abundante em Firmicutes e Bacteroidetes, seguido de Proteobacterias e Actinobacterias, com menos exemplares de Verrucomicrobia e Fusobacteria (32). Porém, na obesidade se observa



diminuição do filo Bacteroidetes com um aumento de Firmicutes (33, 34). Outros estudos têm observado aumento de Actinobacterias em humanos (35).

Diversos estudos demonstraram que durante a obesidade a permeabilidade intestinal é aumentada, permitindo a passagem de moléculas bacterianas como o lipopolissacarídeo (LPS), característico da parede celular de bactérias gram-negativas (4). Este processo é conhecido como endotoxemia metabólica e poderia ser o causador da inflamação observada na obesidade (36, 37). A administração de baixas doses de LPS induziu obesidade similar em animais alimentados com HFD por 4 semanas (38). Também tem sido observado que níveis de LPS estão correlacionados com níveis de insulina no sangue em humanos (39). LPS é o ligante canônico do *Toll-like receptor 4* (TLR4) e animais deficientes deste receptor apresentam uma melhora na resistência à insulina e diminuição do fenótipo inflamatório quando são alimentados com uma dieta hiperlipídica (40). Em conjunto, estes estudos apontam que mudanças na microbiota ocasionadas durante a obesidade produzem alterações no metabolismo bacteriano afetando as populações que influenciam a propagação de sinais inflamatórios no intestino, que estariam associados ao ganho de peso (41).

### **Zebrafish como modelo metabólico**

O *zebrafish* (*Danio rerio*) surgiu como modelo experimental nos anos 70 introduzido por George Streisinger como um vertebrado para estudos de biologia do desenvolvimento e genética (42). Muitos dos atributos pelos quais Streisinger escolheu o *zebrafish* como organismo experimental são considerados na atualidade para estudar doenças humanas (5, 8). A larva possui um corpo translúcido que em conjunto com o uso de transgênicos, facilita o exame não invasivo de órgãos e processos biológicos (43). O *zebrafish* compartilha 70% de identidade genética com os humanos e possui um genoma completamente sequenciado (7). Além disso, é relativamente econômico de manter, não precisando de muito espaço e produzindo uma grande quantidade de ovos que se desenvolvem rapidamente, o que reduz os custos e o tempo de pesquisas *in vivo*. Sua manipulação genética é mais simples

comparado com mamíferos, portanto ensaios de genética direta e reversa têm sido aplicados no *zebrafish* para definir o papel de diferentes genes envolvidos em doenças humanas (43) .

Com relação ao sistema imunológico, o *zebrafish* possui maturação diferenciada dos seus componentes. O sistema imune inato é completamente funcional às 48 horas pós-fertilização (hpf) enquanto que o sistema imune adaptativo finaliza sua maturação em torno de 3 semanas pós-fertilização (*weeks post-fertilization*- wpf) (44). A maioria das células do sistema imune dos mamíferos têm sido identificadas no *zebrafish*, incluindo neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células NK-like, células T-CD4<sup>+</sup>, células T-CD8<sup>+</sup> e células B. Hoje em dia existe disponibilidade de várias linhagens transgênicas com marcadores para estas células no *zebrafish* (45-51)

O *zebrafish* possui atributos fisiológicos e anatômicos similares aos mamíferos incluindo os órgãos-chave requeridos para o controle do metabolismo em humanos, desde os circuitos neuronais no hipotálamo até órgãos metabólicos periféricos (pâncreas, fígado, gordura branca, etc.) assim como conservação funcional em metabolismo de lipídeos, biologia do adipócito, estrutura do pâncreas e homeostase da glicose (8, 43, 52, 53). No entanto, esses animais não possuem depósitos de gordura marrom, o que não tem sido impedimento para a criação de uma variedade de modelos metabólicos genéticos e induzidos (53).

No caso específico da obesidade, pesquisadores têm desenvolvido tanto modelos genéticos quanto induzidos. Modelos genéticos incluem a super-expressão do gene *Agouti-related peptide* (AgRP), gerando um peixe com ganho de peso, aumento dos triglicerídeos totais, adipócitos viscerais hipertrofiados e crescimento linear aumentado, comparado com animais selvagens (54). O transgênico Tg(*krt4:Hsa.myrAkt1*)cy18 expressa Akt1 humana constitutivamente ativa (*myrAkt1*) desencadeando a ativação de alvos endógenos *downstream* de mTOR, GSK-3 $\alpha/\beta$  e 70S6K, na pele, tecido adiposo, tecido ósseo e músculo, desenvolvendo obesidade espontânea. Os adultos exibem aumento de peso, do IMC, acúmulo de lipídeos, hiperplasia de adipócitos, entre outros (55). Os modelos de obesidade induzida por dieta disponíveis na literatura se baseiam na superalimentação de peixes adultos aumentando a frequência de alimentação. A superalimentação com *Artemia nauplii*

causa aumento do IMC, dos triglicerídeos plasmáticos e esteatose hepática (56). Uma variação deste modelo utiliza a superalimentação com ração comercial de peixe, que incrementa o peso dos animais e provoca esteatose hepática (57). Outros autores têm usado rações suplementadas com óleo de milho ou banha de porco, induzindo um aumento considerável de peso e aumento dos depósitos de gordura visceral e subcutânea (58). A alimentação de larvas com uma dieta rica em colesterol (HCD) por duas semanas induziu o acúmulo de gordura visceral, esteatose hepática, inflamação intestinal com infiltrado mieloide e alteração da motilidade intestinal (59). A exposição de camundongos e larvas de *zebrafish* a creme de leite ou uma HCD induziu uma resposta inflamatória aguda horas após a ingestão, representada pelo acúmulo de células mieloides no intestino e expressão de IL-1 $\beta$  pela ativação do inflamassoma em células epiteliais (59). Por outro lado, Landgraf e colaboradores demonstraram que diferenças na composição da dieta de peixes adultos induzem o desenvolvimento de um perfil obesogênico metabolicamente mais “saudável” ou mais “doente”. O perfil obesogênico “doente” estaria associado à alterações metabólicas incluindo diminuição de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos e aumento de marcadores inflamatórios no tecido adiposo (60). Estes estudos demonstram o potencial do *zebrafish* para o estudo da inflamação intestinal durante a obesidade.

### **Microbiota e *Zebrafish***

O intestino do *zebrafish* é uma estrutura tubular compartimentada em três segmentos principais: o bulbo, o intestino médio e o intestino posterior. O esôfago se conecta diretamente ao intestino, sem a presença de um estômago, porém o bulbo, a porção anterior do intestino, funciona como um reservatório de alimentos e produz enzimas digestivas (61). O intestino do *zebrafish* se encontra maduro aos 5 dias pós-fertilização (dpf) visto que possui todas as células necessárias para sua função (61). O processo de colonização intestinal pela microbiota começa entre as 48 e 72 hpf após o embrião sair do córion, onde o peixe é colonizado principalmente por microrganismos presentes no meio ambiente aquático (62). Estudos de sequenciamento do rRNA 16S tem revelado que a diversidade da microbiota intestinal diminui significativamente da larva ao adulto (10, 63). Estas mudanças são

acompanhadas por diferenças a nível de filo bacteriano, as Proteobacterias são o filo predominante em todos os estágios do peixe com representantes dos gêneros *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Vibrio* (63, 64). No estágio larval (4 e 10 dpf),  $\gamma$ -proteobacterias e Firmicutes são os mais abundantes (63). Estágios juvenis (21 dpf), caracterizados por mudanças nutricionais, possuem um aumento na abundância de  $\alpha$ -proteobacterias e diminuição de  $\beta$ -proteobacterias (63). Já em adultos os filós mais abundantes são Proteobacterias, Firmicutes e Fusobactérias (63). Analisando *zebrafish* de diferentes instalações e animais capturados do ambiente natural, pesquisadores identificaram *core* ou grupo central de 14 membros da microbiota intestinal que é compartilhado entre todos os *zebrafish* (65). Estes membros incluem *Aeromonas*, *Shewanella*, *Vibrio*, *Cetobacterium*, *Bacillus*, entre outros, e têm sido identificados em outros estudos utilizando o *zebrafish* (63, 65). Estes estudos poderiam auxiliar na produção de *specific-pathogen-free* (SPF) *zebrafish*, como existe atualmente em modelos murinos (66).

A criação de *zebrafish* gnotobióticos é uma técnica refinada há poucos anos porém os requerimentos estruturais e metodológicos necessários para seu desenvolvimento são factíveis pela maioria dos laboratórios (9, 67). O uso desta técnica possibilitou a análise comparativa entre animais GF e convencionais (CV), ou seja criados de forma padrão em presença da microbiota, ou convencionalizados (CVZ), que foram submetidos ao processo de derivação GF e foram re-colonizados com microbiota parental, além de estudar interações microrganismo-hospedeiro *in vivo* (10, 11). O papel da microbiota no *zebrafish* tem sido relacionado com o controle de vários processos fisiológicos, incluindo o próprio desenvolvimento do intestino. A ausência da microbiota afeta a atividade da fosfatase alcalina no epitélio intestinal, causando a desregulação na expressão de glicanos, e escassez de células calciformes e entero-endócrinas, além de afetar a absorção de proteínas na porção distal do intestino (62). A colonização do intestino pela microbiota também tem sido vinculada com a regulação espacial e temporal da atividade transcricional do fator de transcrição *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF $\kappa$ B), bem como a migração de neutrófilos e expressão da mieloperoxidase no intestino (68, 69). Em relação ao metabolismo pesquisas utilizando *zebrafish* gnotobiótico revelaram que a microbiota estimula a absorção de ácidos graxos e a formação de gotículas de lipídeo no epitélio intestinal e no fígado (70). Ademais, foi mostrado que a presença

de comida permite o enriquecimento bacteriano do filo Firmicutes, evidenciando desta forma, que alterações na composição da microbiota podem influenciar a absorção de gordura no intestino (70). Outro estudo observou que a composição de diferentes lipídeos na dieta altera a estrutura da microbiota reduzindo sua diversidade, e conseqüentemente alterando o metabolismo de triglicerídeos (71). A administração de *Lactobacillus rhamnosus* como probiótico atenuou o ganho de peso e diminuiu os níveis de colesterol e triglicerídeos em animais HFD, além de induzir a expressão de genes anorexígenos e diminuir a expressão de genes orexígenos (71).

Os dados mostrados evidenciam a capacidade do *zebrafish* como modelo de interações microbiota-hospedeiro.

## Via do HIF

Os *hypoxia-inducible factors* (HIFs) são fatores de transcrição que respondem à diminuição do oxigênio disponível no ambiente celular promovendo a adaptação à hipóxia pela regulação positiva de genes envolvidos em angiogênese, eritropoiese e metabolismo (72). Vertebrados possuem três isoformas da subunidade  $\alpha$  de HIF (HIF $\alpha$ ): HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  e HIF3 $\alpha$ ; e duas isoformas da subunidade  $\beta$  (HIF1 $\beta$ ), também chamada de *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* (ARNT), *arnt1a* e *arnt1b*, constitutivamente expressa (73). Devido à duplicação no genoma, o *zebrafish*, assim como outros ciprinidos, possui dois parálogos de cada HIF $\alpha$ : *hif1aa*, *hif1ab*, *hif2aa*, *hif2ab*, *hif3aa*, e *hif3ab*, mas só uma versão do *arnt* (74). De modo geral, HIF $\alpha$  é regulado pós-transcricionalmente: em situações de normoxia a subunidade  $\alpha$  é hidroxilada por *prolyl-hydroxylases* (PHDs) e ubiquitinada pela proteína *von Hippel-Lindau* (VHL) para logo ser degradada. Em situações de hipóxia, as PHDs são inativadas e HIF $\alpha$  é estabilizado, formando um complexo com o ARNT e ativando *HIF response elements* (HREs) no núcleo (75).

A ativação dos HIFs têm sido relacionada ao controle do metabolismo e função celular de células imunes (75, 76). Em mamíferos, HIF-1 $\alpha$  é expresso em praticamente todas as células imunes inatas e adaptativas (77-80). Por outro lado HIF2 $\alpha$ , é expresso

em células endoteliais e algumas células imunes (81). A expressão e estabilização de HIF em células imunes pode ser desencadeada tanto por hipóxia quanto por estímulos estressores, tais como inflamação, microrganismos, e câncer (75). Estudos têm revelado efeitos da microbiota na indução de HIF $\alpha$  no intestino e em células do sistema imune (82, 83). A presença de LPS bacteriano ou moléculas inflamatórias como o TNF $\alpha$  e NF- $\kappa$ B são capazes de estabilizar HIF-1 $\alpha$  (75). A ativação de HIF-1 $\alpha$  via NF- $\kappa$ B em macrófagos induz aumento da agregação celular, invasão, motilidade e poder antimicrobiano (77). Também incrementa a sobrevivência de macrófagos e a capacidade inflamatória (78). Além disso, HIF-1 $\alpha$  tem sido relacionado com ativação do metabolismo glicolítico em células mielóides, resultando num maior consumo de glicose e aumento da taxa glicolítica, e limitando a fosforilação oxidativa (OXPHOS). Este tipo de metabolismo é observado em macrófagos tipo M1, que tem por característica ser mais inflamatórios (75, 84).

A revisão da literatura demonstra que dependendo do tipo celular ou a via de ativação, o papel de HIF-1 $\alpha$  pode ser de indutor da inflamação ou indutor da homeostase. No entanto, na atualidade não existem estudos que relacionem a disbiose da microbiota durante a obesidade com a indução de inflamação no intestino via HIF-1 $\alpha$ . Desta forma, nós propomos a hipótese de que a exposição crônica à uma dieta com elevado conteúdo de gorduras induz alterações na microbiota que seriam à causa da inflamação na obesidade. Consideramos que a via do HIF-1 $\alpha$  pode estar participando da indução da inflamação pela microbiota de animais HFD através da ativação do eixo TLR/MyD88/NF- $\kappa$ B/HIF no intestino.

## CONCLUSÃO

Com este trabalho podemos concluir que:

- 1) A dieta hiperlipídica (HFD) a base de óleo de palma, administrada por 6 semanas, induz ganho de peso, acúmulo de gordura e altera parâmetros metabólicos no *zebrafish* adulto;
- 2) O tempo e a composição da dieta hiperlipídica são suficientes para induzir inflamação de baixo grau, com aumento de marcadores inflamatórios como *il6* e *tnfa* em intestino, fígado e tecido adiposo, além de aumentar o infiltrado inflamatório no intestino;
- 3) A microbiota de peixes HFD possui componentes diferentes dos peixes ND, além de induzir aumento da permeabilidade intestinal e translocação bacteriana; e
- 4) A via do HIF tem expressão aumentada no intestino e é um grande candidato no mecanismo de indução de inflamação pela microbiota intestinal;

Deste modo, este trabalho contribuiu ao conhecimento da interação microbiota – sistema imune – metabolismo no *zebrafish* adulto.

## REFERÊNCIAS\*

1. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(5):288-98.
2. WHO. Fact Sheet - Obesity and Overweight 2018 [Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>].
3. Ray I, Mahata SK, De RK. Obesity: An Immunometabolic Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:157.
4. Chakraborti CK. New-found link between microbiota and obesity. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2015;6(4):110-9.
5. Dooley K, Zon LI. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2000;10(3):252-6.
6. Morales Fénero CI, Colombo Flores AA, Câmara NO. Inflammatory diseases modelling in zebrafish. *World J Exp Med*. 2016;6(1):9-20.
7. 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.
8. Seth A, Stemple DL, Barroso I. The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. *Dis Model Mech*. 2013;6(5):1080-8.
9. Melancon E, Gomez De La Torre Canny S, Sichel S, Kelly M, Wiles TJ, Rawls JF, et al. Best practices for germ-free derivation and gnotobiotic zebrafish husbandry. *Methods Cell Biol*. 2017;138:61-100.
10. 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.
11. Stagaman K, Sharpton TJ, Guillemin K. Zebrafish microbiome studies make waves. *Lab Anim (NY)*. 2020;49(7):201-7.
12. NIH. Metabolic Syndrome [Available from: <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/metabolic-syndrome>].
13. Kammoun HL, Kraakman MJ, Febbraio MA. Adipose tissue inflammation in glucose metabolism. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014;15(1):31-44.
14. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7.
15. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.
16. Balistreri CR, Caruso C, Candore G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:802078.
17. Trayhurn P, Drevon CA, Eckel J. Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Arch Physiol Biochem*. 2011;117(2):47-56.
18. Leal VeO, Mafra D. Adipokines in obesity. *Clin Chim Acta*. 2013;419:87-94.
19. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796-808.

---

\*De acordo com: International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. 2003 [cited 2016 May 30]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)



20. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1821-30.
21. Kraakman MJ, Murphy AJ, Jandeleit-Dahm K, Kammoun HL. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function? *Front Immunol.* 2014;5:470.
22. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol.* 2019;10:1084.
23. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117(1):175-84.
24. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 2005;46(11):2347-55.
25. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(4):E1118-28.
26. Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(3):446-62.
27. Saad MJ, Santos A, Prada PO. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology (Bethesda).* 2016;31(4):283-93.
28. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(44):15718-23.
29. Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe.* 2008;3(4):213-23.
30. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature.* 2013;500(7464):541-6.
31. Petriz BA, Castro AP, Almeida JA, Gomes CP, Fernandes GR, Kruger RH, et al. Exercise induction of gut microbiota modifications in obese, non-obese and hypertensive rats. *BMC Genomics.* 2014;15:511.
32. Sun J, Chang EB. Exploring gut microbes in human health and disease: Pushing the envelope. *Genes Dis.* 2014;1(2):132-9.
33. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006;444(7122):1022-3.
34. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464(7285):59-65.
35. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenkov T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009;457(7228):480-4.
36. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007;56(7):1761-72.
37. Ghanim H, Abuaysheh S, Sia CL, Korzeniewski K, Chaudhuri A, Fernandez-Real JM, et al. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance. *Diabetes Care.* 2009;32(12):2281-7.

38. Graham C, Mullen A, Whelan K. Obesity and the gastrointestinal microbiota: a review of associations and mechanisms. *Nutr Rev.* 2015;73(6):376-85.
39. Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher f, Da Silva NF, Khanolkar M, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292(3):E740-7.
40. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116(11):3015-25.
41. Murphy EA, Velazquez KT, Herbert KM. Influence of high-fat diet on gut microbiota: a driving force for chronic disease risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015;18(5):515-20.
42. Bradford YM, Toro S, Ramachandran S, Ruzicka L, Howe DG, Eagle A, et al. Zebrafish Models of Human Disease: Gaining Insight into Human Disease at ZFIN. *ILAR J.* 2017;58(1):4-16.
43. Santoriello C, Zon LI. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest.* 2012;122(7):2337-43.
44. Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity.* 2004;20(4):367-79.
45. Lieschke GJ, Oates AC, Crowhurst MO, Ward AC, Layton JE. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood.* 2001;98(10):3087-96.
46. Crowhurst MO, Layton JE, Lieschke GJ. Developmental biology of zebrafish myeloid cells. *Int J Dev Biol.* 2002;46(4):483-92.
47. Lugo-Villarino G, Balla KM, Stachura DL, Bañuelos K, Werneck MB, Traver D. Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(36):15850-5.
48. Carmona SJ, Teichmann SA, Ferreira L, Macaulay IC, Stubbington MJ, Cvejic A, et al. Single-cell transcriptome analysis of fish immune cells provides insight into the evolution of vertebrate immune cell types. *Genome Res.* 2017;27(3):451-61.
49. Zhang Y, Wiest DL. Using the Zebrafish Model to Study T Cell Development. *Methods Mol Biol.* 2016;1323:273-92.
50. Wan F, Hu CB, Ma JX, Gao K, Xiang LX, Shao JZ. Characterization of  $\gamma\delta$  T Cells from Zebrafish Provides Insights into Their Important Role in Adaptive Humoral Immunity. *Front Immunol.* 2016;7:675.
51. 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.
52. Zang L, Maddison LA, Chen W. Zebrafish as a Model for Obesity and Diabetes. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6:91.
53. Ka J, Pak B, Han O, Lee S, Jin SW. Comparison of transcriptomic changes between zebrafish and mice upon high fat diet reveals evolutionary convergence in lipid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;530(4):638-43.
54. Song Y, Cone RD. Creation of a genetic model of obesity in a teleost. *FASEB J.* 2007;21(9):2042-9.
55. Chu CY, Chen CF, Rajendran RS, Shen CN, Chen TH, Yen CC, et al. Overexpression of Akt1 enhances adipogenesis and leads to lipoma formation in zebrafish. *PLoS One.* 2012;7(5):e36474.

56. Oka T, Nishimura Y, Zang L, Hirano M, Shimada Y, Wang Z, et al. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC Physiol.* 2010;10:21.
57. Forn-Cuní G, Varela M, Fernández-Rodríguez CM, Figueras A, Novoa B. Liver immune responses to inflammatory stimuli in a diet-induced obesity model of zebrafish. *J Endocrinol.* 2015;224(2):159-70.
58. Meguro S, Hasumura T, Hase T. Body fat accumulation in zebrafish is induced by a diet rich in fat and reduced by supplementation with green tea extract. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120142.
59. Progzatky F, Sangha NJ, Yoshida N, McBrien M, Cheung J, Shia A, et al. Dietary cholesterol directly induces acute inflammasome-dependent intestinal inflammation. *Nat Commun.* 2014;5:5864.
60. Landgraf K, Schuster S, Meusel A, Garten A, Riemer T, Schleinitz D, et al. Short-term overfeeding of zebrafish with normal or high-fat diet as a model for the development of metabolically healthy versus unhealthy obesity. *BMC Physiol.* 2017;17(1):4.
61. Wallace KN, Akhter S, Smith EM, Lorent K, Pack M. Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mech Dev.* 2005;122(2):157-73.
62. 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.
63. Stephens WZ, Burns AR, Stagaman K, Wong S, Rawls JF, Guillemin K, et al. The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development. *ISME J.* 2016;10(3):644-54.
64. Wiles TJ, Wall ES, Schlomann BH, Hay EA, Parthasarathy R, Guillemin K. Modernized Tools for Streamlined Genetic Manipulation and Comparative Study of Wild and Diverse Proteobacterial Lineages. *mBio.* 2018;9(5).
65. 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.
66. Dobson GP, Letson HL, Biros E, Morris J. Specific pathogen-free (SPF) animal status as a variable in biomedical research: Have we come full circle? *EBioMedicine.* 2019;41:42-3.
67. Pham LN, Kanther M, Semova I, Rawls JF. Methods for generating and colonizing gnotobiotic zebrafish. *Nat Protoc.* 2008;3(12):1862-75.
68. Kanther M, Sun X, Mühlbauer M, Mackey LC, Flynn EJ, Bagnat M, et al. Microbial colonization induces dynamic temporal and spatial patterns of NF- $\kappa$ B activation in the zebrafish digestive tract. *Gastroenterology.* 2011;141(1):197-207.
69. Kanther M, Tomkovich S, Xiaolun S, Grosser MR, Koo J, Flynn EJ, et al. Commensal microbiota stimulate systemic neutrophil migration through induction of serum amyloid A. *Cell Microbiol.* 2014;16(7):1053-67.
70. Semova I, Carten JD, Stombaugh J, Mackey LC, Knight R, Farber SA, et al. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. *Cell Host Microbe.* 2012;12(3):277-88.
71. Falcinelli S, Rodiles A, Hatef A, Picchiatti S, Cossignani L, Merrifield DL, et al. Dietary lipid content reorganizes gut microbiota and probiotic *L. rhamnosus* attenuates obesity and enhances catabolic hormonal milieu in zebrafish. *Sci Rep.* 2017;7(1):5512.
72. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. HIF at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 8):1055-7.

73. Rytönen KT, Williams TA, Renshaw GM, Primmer CR, Nikinmaa M. Molecular evolution of the metazoan PHD-HIF oxygen-sensing system. *Mol Biol Evol.* 2011;28(6):1913-26.
74. Rytönen KT, Akbarzadeh A, Miandare HK, Kamei H, Duan C, Leder EH, et al. Subfunctionalization of cyprinid hypoxia-inducible factors for roles in development and oxygen sensing. *Evolution.* 2013;67(3):873-82.
75. Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, Johnson RS. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity.* 2014;41(4):518-28.
76. Taylor CT, Colgan SP. Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(12):774-85.
77. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, et al. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell.* 2003;112(5):645-57.
78. Walmsley SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. *J Exp Med.* 2005;201(1):105-15.
79. Jantsch J, Chakravorty D, Turza N, Prectel AT, Buchholz B, Gerlach RG, et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. *J Immunol.* 2008;180(7):4697-705.
80. McNamee EN, Korn Johnson D, Homann D, Clambey ET. Hypoxia and hypoxia-inducible factors as regulators of T cell development, differentiation, and function. *Immunol Res.* 2013;55(1-3):58-70.
81. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol.* 2003;23(24):9361-74.
82. Peyssonnaud C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, et al. HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest.* 2005;115(7):1806-15.
83. Kumar T, Pandey R, Chauhan NS. Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$ : The Curator of Gut Homeostasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:227.
84. Haschemi A, Kosma P, Gille L, Evans CR, Burant CF, Starkl P, et al. The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab.* 2012;15(6):813-26.